

T.C
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ
ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Çetin Hakan KARADAĞ

FARELERDE LİPOLİSAKKARİT İLE İNDÜKLENEN
BOZULMUŞ BELLEK MODELİNDE MAS RESEPTÖR
AGONİSTİ AVE0991'İN OLASI ROLÜNÜN
İNCELENMESİ

(Tıpta Uzmanlık Tezi)

Dr. Dilşat ERÜMİT

EDİRNE - 2022

TEŞEKKÜR

Tıbbi Farmakoloji eğitimim ve tez aşamamdaki destekleri ve rehberliği için her zaman örnek aldığım danışmanım Prof. Dr. Çetin Hakan KARADAĞ'a, tecrübelerinden faydalandığım kıymetli hocalarım Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL, Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ ve Doç. Dr. Ruhan Deniz TOPUZ'a, desteklerini her zaman hissettiğim arkadaşlarım Öğr. Gör. Kübra AYDEMİR, Dr. Mehmet Zahid ÇETİNKAYA ve tüm çalışma arkadaşlarıma, hayatımdaki yerleri çok büyük olan kız kardeşlerim Dr. Merve CELEP, Dr. Tümay FİLİZ, Dr. Elif Gülsüm TORUN ve Dr. Gözde KOYUNCU'ya, her iyi ve kötü anımda yanımda hissettiğim sevgili Fatih ÇAMAŞ'a, bugünlere gelmemde en büyük emeğe sahip annem Buket ERÜMİT, babam Hüseyin ERÜMİT ve bütün aileme, süreç boyunca tüm stresimi alıp bana mutluluk veren kedim Arda'ya, 2021/144 no'lu proje ile maddi destek sağlayan TÜBAP'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER	3
ALZHEIMER HASTALIĞI VE HİPOTEZLERİ.....	3
LİPOLİSAKKARİT VE NÖROİNFLAMASYON	9
SANTRAL RENİN ANJİOTENSİN SİSTEMİ.....	11
MAS RESEPTÖRÜ VE AVE0991	13
GEREÇ VE YÖNTEMLER	17
BULGULAR	26
TARTIŞMA	41
SONUÇLAR	47
ÖZET	49
SUMMARY	50
KAYNAKLAR	51
EKLER	

KISALTMALAR

Aβ	: Amiloid β
ACE	: Angiotensin Converting Enzyme
ACE 2	: Angiotensin Converting Enzyme 2
AH	: Alzheimer Hastalığı
Ang II	: Angiotensin II
APP	: Amiloid Precursor Protein
AT1R	: Angiotensin Receptor Type 1
cRAS	: classic Renin Angiotensin System
IL-1β	: Interleukin 1- β
IL-6	: Interleukin 6
LPS	: Lypopolisaccharide
NFT	: Neurofibrillary Tangles
RAS	: Renin Angiotensin System
rRAS	: regulatory Renin Angiotensin System
SSS	: Santral Sinir Sistemi
TLR-4	: Toll-Like Receptor 4
TNF-α	: Tumor Necrosis Factor- α

GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde çok önemli bir demans nedeni olan ve yaşlı nüfusun büyük kısmını etkileyen Alzheimer Hastalığı (AH), üzerinde çokça çalışma yapılsa da patofizyolojisi ve tedavisi tam olarak belirlenememiş bir problemdir. Patolojik olarak, yanlış katlanmış amiloid- β 'nın ($A\beta$) senil plaklarda hücre dışı birikimi ve hiperfosforile tau içeren nörofibriler yumakların (NFT) oluşumu ile karakterizedir (1). Çok sayıda kanıt, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE)/anjiyotensin 2/anjiyotensin reseptör alt tipi-1 (ACE/Ang2/AT1R) ekseninin AH patofizyolojisinde yer aldığını desteklemektedir. Birçok çalışma, ACE/Ang2/AT1 ekseninin aşırı aktivasyonunu, AH'de $A\beta$ ile indüklenen nörodejenerasyon ve apoptozun yapısal katkılarından biri olarak değerlendirmiştir (2). Renin-anjiyotensin sistemi (RAS), kan basıncı ve elektrolit homeostazının önemli bir düzenleyicisidir. Kardiyovasküler fonksiyonun düzenleyicisi olarak öneminin yanı sıra RAS, biliş, hafıza, depresyon ve anksiyete dahil olmak üzere daha yüksek beyin fonksiyonlarının modülasyonu ile de ilişkilendirilmiştir (3). Günümüzde RAS'ın öncelikle iki zıt koldan oluştuğu düşünülmektedir. Klasik renin-anjiyotensin sistemi (cRAS), (ACE/Ang2/AT1R), bilişsel gerileme dahil olmak üzere çeşitli organ hasarlarına neden olur. Öte yandan, ACE2/Ang-(1-7)/Mas ekseninden oluşan düzenleyici (regülatuvar) RAS (rRAS) ise, klasik RAS eksenine karşı antagonistik etkiler oluşturan bir sistem olarak vurgulanmıştır (4).

ACE2, Ang II'nin Ang-(1-7)'ye dönüşmesini katalize eder ve beyinde, çoğunlukla kardiyovasküler fonksiyonun kontrolü ile ilgili bölgelerde tanımlanmıştır (5). Hücre kültürlerinde özellikle nöronların mitokondriyal membranlarında ve astrositlerde eksprese edilen ACE2'nin ACE2/Ang-(1-7)/Mas eksenini antioksidan ve antiinflamatuvar etkiler gösterir. Bu şekilde, Mas reseptör sinyali, biliş ve hücre hayatta kalmasını kolaylaştırır (6,7). ACE2 eksikliği, farelerin beyinde pro-oksidan bir etkiye sahiptir ve kontrol hayvanlarına kıyasla otonomik işlev bozukluğu ile ilişkilendirilirken, beyin ACE2 aktivasyonu, kardiyovasküler fonksiyon, bilişsel süreçler, beyin hasarı ve sinir sisteminin gelişimi üzerinde önemli faydalı etkilerle ilişkilendirilmiştir (8). Bu etkilerin Mas reseptör antagonisti A-779 tarafından ortadan kaldırıldığını gösteren çalışmalar nedeniyle, Ang-(1-7)/Mas ekseninin aracılık ettiği yönündeki kanıtlar artmıştır (9).

ACE2 aktivatörü dimanezin asetürat'ın (DIZE) sistemik uygulamasının, transgenik AH'li farelerde davranış deneylerinde hafızayı geliştirdiği ve A β üretimini azalttığı, ayrıca asemptomatik transgenik farelerde AH oluşumunu önlediği gösterilmiştir (10). Mas reseptörü üzerine agonist etkisi olduğu bilinen non-peptid yapıdaki AVE0991'in ise, bellek ve bilişsel gelişme üzerindeki etkileri hakkında detaylı bir araştırma yapılmamıştır. Fakat sistemik uygulama yoluyla kan-beyin bariyerini geçerek nöroinflamasyonu azalttığı yönünde bulgular mevcuttur (11-13). SAMP8 farelerinde 30 gün boyunca intraperitoneal 3 ve 10 mg/kg/gün AVE0991 uygulamasının beyinde AH ile ilişkilendirilen nöroinflamasyonu gösteren IL 1 β , IL6 ve TNF seviyelerini önemli ölçüde azalttığı da tespit edilmiştir (12).

Sistemik lipopolisakkarit (LPS) uygulaması uzun zamandır nontransgenik AH hayvan modeli olarak sıkça kullanılmaktadır. LPS uygulaması hem *in vivo* hem de *in vitro* nöroinflamasyonu incelemek için mevcut standardı temsil eder (14,15). Ayrıca önceki bir çalışmada, davranış deneylerinden 7 gün önce 5 mg/kg tek doz intraperitoneal LPS uygulamasının, nöroinflamasyona yol açarak bilişsel fonksiyon bozukluğunu uyardığına dair sonuçlar elde edilmiştir (16). Bu çalışmamızda, önceki araştırmalar ışığında, LPS ile indüklenen AH modelinde Mas reseptör agonisti AVE0991'in olası rolü davranış deneyleri ve moleküler incelemelerle ortaya konmaya çalışılmıştır.

GENEL BİLGİLER

ALZHEIMER HASTALIĞI VE HİPOTEZLERİ

Alzheimer hastalığı (AH) bellek başta olmak üzere günlük işlevler ve davranışlarda bozulmaya yol açan, multifaktöriyel doğaya sahip, ilerleyici tipte, geri dönüşsüz, kişilik ve davranış bozukluğu gibi nöropsikiyatrik bozuklukların eşlik ettiği nörodejeneratif bir hastalıktır (17). AH, günümüzde demansın (bunama) en yaygın nedenidir. Çalışmalarda elde edilen ilerlemeler, hastalığın ayırt edici özellikleri olan amiloid β 'dan ($A\beta$) oluşan plakların ve hiperfosforile tau'dan oluşan yumakların moleküler patogenezinin anlaşılmasını sağlamıştır. Bunun yanında, bu konudaki bilgiler arttıkça, hastalığın patolojik karmaşıklığına yönelik fikir birliği de artmıştır (18). Ailesel Alzheimer hastalığı (*Familial Alzheimer's Disease- fAD*), her ikisi de $A\beta$ metabolizmasına bağlı Amiloid prekürsör protein (APP) ve presenilin genlerindeki (PSEN1 ve PSEN2) mutasyonların neden olduğu, erken başlangıçlı (<65 yaş), nadir görülen otozomal dominant bir hastalık iken, sporadik Alzheimer hastalığı (sAD), çoğunlukla 65 yaş üzerinde ortaya çıkan, dünya çapında 50 milyona yakın insanda görülen ve insidansı hızlı şekilde artan ciddi bir sağlık sorunudur (19).

Alzheimer hastalığının bu ilerleyici, yavaş seyirli ve yıkıcı süreci, bu hastalığın Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından insan sağlığını etkileyen öncelikli sorunlar arasında sayılmasına neden olmuştur. Bu nedenle, AH için kesin ve kalıcı bir tedavi protokolünün oluşturulması uzun yıllar araştırma konusu olmuştur (20).

1700'lü yılların sonunda Fransız Hekim Phillipe Pinel, 34 yaşındaki bir kadın hastada yavaş yavaş unutkanlık oluştuğunu ve birkaç yıl içinde hafızasını tamamen kaybetmesinin yanı sıra; konuşma, yürüme gibi günlük ihtiyaçlarını da gerçekleştiremediğini gözlemlemiştir. Hasta öldükten sonra yaptığı otopside; beyin boyut ve ağırlığının yaklaşık 2/3 oranında küçüldüğünü ve sıvı miktarının arttığını belirlemiştir. Bu vaka, Dr. Pinel tarafından, Latince 'zihinsel yeteneklerin bozulması' anlamına gelen *dementia* (demans) adıyla literatüre kaydedilen ilk vaka olma özelliğine sahiptir.

1900'lerin başlarına gelindiğinde ise, Dr. Alois Alzheimer tarafından, 51 yaşındaki başka bir kadın hastada paranoya tarzı takıntılı düşünceler, agresif davranışlar, bellek kaybı ve konuşma bozukluğu tespit edilmiş, sonrasında belirtiler gittikçe ilerlemiş ve bunlara halüsinasyon ve bilişsel bozukluklar da eklenmiştir. Birkaç yıl sonra hasta öldüğünde yapılan otopside yine beynin küçük ve sıvı dolu olduğu, korteksin incelendiği ve korteks hücrelerinin yerinde nörofibriller yumaklar ve plakların yer aldığı belirtilmiştir. Bu bulgular ışığında yapılan yayınlarda, Dr. Alzheimer ile birlikte çalışan psikiyatrist Emil Krapelin tarafından bu hastalık ilk defa 'Alzheimer tipi demans' olarak adlandırılmıştır (21).

En yaygın yaşa bağlı nörodejeneratif hastalık olan geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı demansı, klinik olarak ilerleyici bir hafıza kaybı ve diğer bilişsel işlevlerle karakterizedir. Amiloid- β anormallikleri ile doğrudan bağlantılı olan Alzheimer hastalığının erken başlangıçlı otozomal dominant formlarının aksine, geç başlangıçlı Alzheimer hastalığına yol açan patofizyolojik olaylar dizisi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Günümüzdeki kanıtlar, geç başlangıçlı Alzheimer hastalığının, çeşitli moleküler yollar arasında anormal etkileşimi içeren karmaşık bir poligenik hastalık olduğunu göstermektedir. En önemli risk faktörleri yaş ve apolipoprotein E'nin $\epsilon 4$ aleli (APOE $\epsilon 4$) olarak bilinir (22,23).

AH'nin tedavisinde kullanılan Amerikan Besin ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylı dört ilaç kolinesteraz inhibitörleri olan donepezil, rivastigmin, galantamin ile nonkompetitif NMDA reseptör antagonisti olan memantindir (24). Bunun yanı sıra bilişsel fonksiyon kaybını düzeltmek ve nörodejenerasyonu baskılamak amacıyla AH tedavisinde kullanılacak birçok bileşik, klinik faz 3 çalışmalarına kadar gelmiş, fakat nöronal kaybı ve hastalığın geri dönüşsüz ve kontrolsüz ilerleyişini durduramadıkları için henüz başarılı olamamıştır (25).

AH etyopatogenezinde kolinerjik disfonksiyon hipotezi, Amiloid- β hipotezi, tau ve nörofibriller yumak hipotezi, kalsiyum homeostazisi ve eksitotoksisite hipotezi, nörovasküler disfonksiyon hipotezi, nöroinflamasyon hipotezi, mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres hipotezi, glukoz metabolizması hipotezi, metal iyon hipotezi, lenfatik sistem hipotezi gibi pek çok teori öne sürülmektedir.

Amiloid β Hipotezi

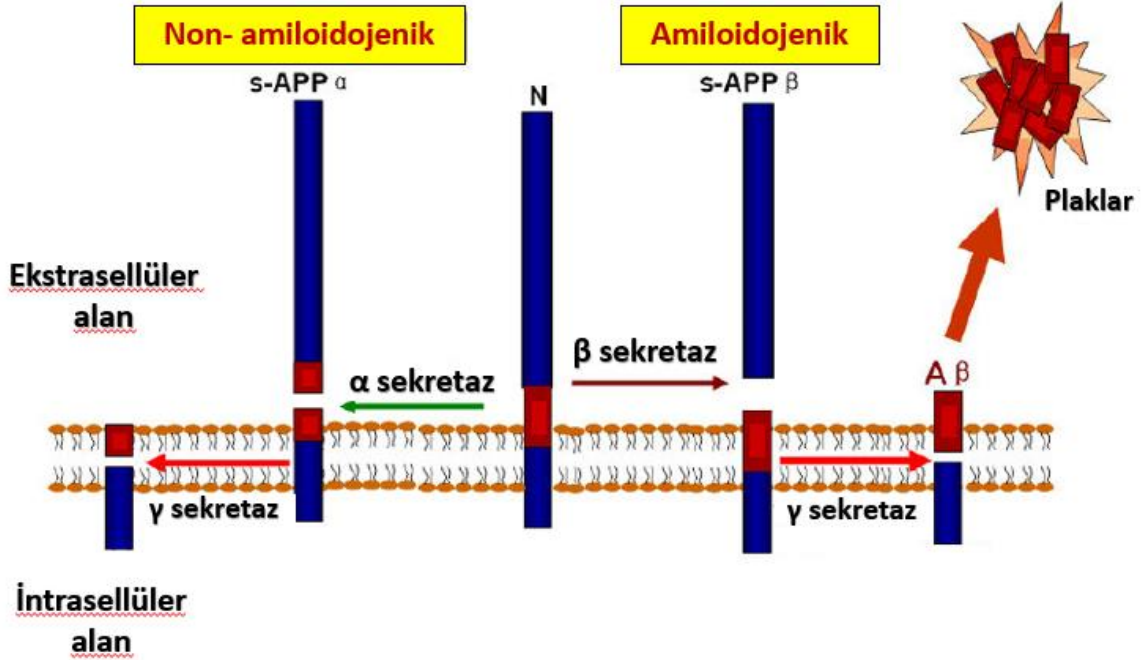
John A. Hardy ve Gerald A. Higgins tarafından 1992’de çalışılan amiloid kaskad hipotezine göre; plakların ana bileşeni olan A β , AH patolojisinde primer nedendir. Bu plaklar beynin çeşitli bölgelerinde birikip çözünmeyen yapıda fibrillerden oluşan senil amiloid plakları (SAP) oluşturur ve bu plaklara bağlı vasküler hasar, nörofibriller yumak (NFI), nöron kaybı ve demans gibi AH’nin diğer patolojik bileşenleri oluşur (26). AH’yi araştırmak amaçlı yapılan çalışmalar, bellekte bozulmayla birlikte görülen nöronal ve sinaptik kayıplarda A β peptidler ve NFI’nin rolü üzerine yoğunlaşır.

A β peptid, nöronlar tarafından üretilir ayrıca nöron yüzey reseptörü olan ve diğer hücrelerle birlikte nöronal gelişimi sağlayan amiloid beta prekürsör proteinlerin (APP) bir parçasıdır. A β peptidlerin, fizyolojik rolü tam olarak bilinmemekte ve bu peptidlerin yokluğunun da herhangi bir fizyolojik aksamaya neden olmadığı düşünülmektedir. A β , üretildikten sonra kan ve beyin omurilik sıvısına (BOS) geçerek atılır ve normal şartlarda depo edilmez. Fakat patolojik olarak biriken çözünür (*soluble*) A β oligomerleri sinaptik bağlantıya zarar verebilir ve nöron hasarına neden olabilir. Ekstrasellüler olarak biriken bu A β peptidlerin temel yapısı APP’nin parçalanması ile oluşan amiloid β 40-42’dir. Bu birikme durumu, A β ’nın çökmesi, tau proteininin toksik hale gelmesi, intrasellüler kalsiyum dengesi ve kolinerjik sinir sisteminin bozulması, NFI oluşumu gibi sonuçlar doğurur (27). AH’de nöronlar arası plak oluşumuna neden olmasının yanı sıra, A β peptidler aynı zamanda beyindeki kan damarlarında da birikerek serebral amiloid anjiyopatiye neden olmaktadır. Bir tip 1 membran glikoproteini olan APP ve oluşan bu protein parçaları, transkripsiyonun düzenlemesinden sinaptik işlevlere, nöronal homeostazdan sinyal ve iletişime kadar birçok kompleks aktiviteye sahiptir (28).

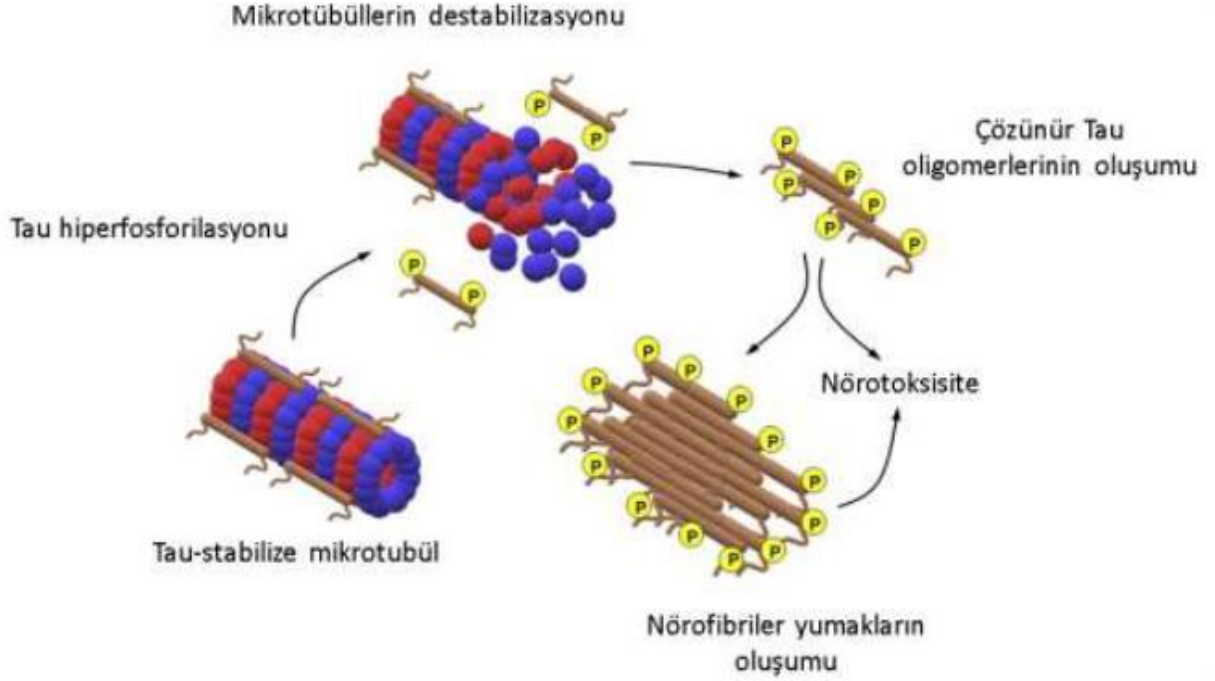
APP’nin parçalanması işlemi sırasında görev alan en önemli enzimler α ve γ sekretazdır. Bu işlemde β ve γ sekretaz enzimleri daha baskın hale gelirse, amiloid β 40-42 proteini üretilir ve bu durum amiloid plak oluşumunun temelini oluşturur (29) (Şekil 1). β -sekretaz (BACE1) ve γ -sekretaz tarafından üretilen A β fibrilleri çözünmezler ve sinaptik aralığa difüze olarak sinaptik sinyalleri engellerler (30,31). Sonuçta, çözünmeyen polimerize amiloid fibrillerin plak halinde birikmesiyle kinazlar aktive olur. Kinazların aktivasyonu sonraki bölümde anlatılacağı üzere mikrotübüllerle ilişkili tau proteininin fosforillenmesine ve nörofibriller yumakların (NFI) oluşumuna neden olur (32).

Tau ve Nörofibriller Yumak (NFY) Hipotezi

Tau proteinleri sağlıklı insan beyinde mRNA tarafından altı izoformu üretilen ve mikrotübül asosiyasyon proteinleri (MAP)'ler ailesine mensup, hücre iskelet bütünlüğünü korumakla görevli proteinlerdir (33). Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda tau proteininin nöron iletimiyle bağlantılı olarak presinaptik, postsinaptik ya da her iki kısımda da yerleşmiş olduğu görülmüştür (34). Normal tau proteinlerinden farklı olarak AH patolojisinde yer alan NFY denilen yapılar bu tau proteinlerinin hiperfosforile formlarıdır (Şekil 2). Bu formlar da mikrotübüllerin yapısını bozar ve bu şekilde nöron transportunu da bozarak hücre ölümlerine neden olurlar (35).



Şekil 1. Amiloid prekürsör proteinin (APP) sekretazlar tarafından parçalanması ve amiloid β (A- β) plaklarının oluşumu. (s-APP: soluble amiloid prekürsör proteini) (36).



Şekil 2. Tau proteinlerinin hiperfosforilasyonu ve nörofibriler yumakların oluşumu (37).

Kolinerjik Disfonksiyon Hipotezi

AH'de onaylanan ve kullanılmakta olan iki ilaç sınıfından biri asetilkolinesteraz inhibitörleridir. Hatta 2012 yılında, yan etkileri nedeniyle piyasadan çekilene kadar AH'nin semptomatik tedavisinde kullanılmış olan takrin, bu anlamda onaylanmış ilk AH ilacıdır. Kolinerjik sistemin AH tedavisinde bu kadar önemli yer edinmesinin en büyük nedeni, limbik sistem ve neokortekste bolca kolinerjik sinaps bulunması ve bu kolinerjik iletimin hafıza, öğrenme, dikkat ve diğer yüksek beyin işlevleri için kritik öneme sahip olabileceğinin düşünülmektedir. Bu nedenle, beynin kolinerjik sistemi, Alzheimer hastalığı gibi demanslar da dahil olmak üzere, normal biliş ve yaşa bağlı bilişsel gerileme ile ilgili devam eden araştırmalarda merkezi bir rol oynamaktadır. Alzheimer hastalığının kolinerjik hipotezi, ilerleyici limbik ve neokortikal kolinerjik innervasyon kaybına odaklanır (38).

Bazal ön beyindeki nörofibriler dejenerasyonun, yaygın bir presinaptik kolinerjik denervasyona yol açan ön beyin kolinerjik nöronlarının işlev bozukluğu ve ölümünün birincil nedeni olduğuna inanılmaktadır. Kolinesteraz inhibitörleri, beyindeki sinapslarda asetilkolinin mevcudiyetini artırır. Bu nedenle, Alzheimer hastalığı demansının tedavisinde klinik olarak yararlı olduğu kanıtlanmış birkaç ilaç tedavisinden biridir ve kolinerjik sistemi hastalıkta önemli bir terapötik hedef olarak doğrular. Bu konuda yapılan çalışmaların ve elde edilen kanıtların büyüklüğü, Alzheimer hastalığında standart, köşe taşı farmakolojik bir yaklaşım olarak kolinerjik ilaçların devam eden değerini desteklemektedir (39).

Nörovasküler Disfonksiyon Hipotezi

Nörovasküler hipotezde asıl durum, beyin mikrosirkülasyonunun bozulması ve buna bağlı metabolizmanın ve drenajın azalması temeline dayanır. Bununla ilgili olarak yapılan hayvan deneylerinde zamanla oluşan A β 'ların drene edilememesi ve birikip plak oluşturmasının, mikrovasküleritenin bozulmasıyla ilgili olabileceği düşünölmüştür. Ayrıca yapılan çalışmalarda görüntöleme yöntemleriyle incelenen Alzheimer hastalarında, A β oluşumundan önce nörovasküler bozukluğun etkisiyle serebral hasarın oluştuğu tespit edilmiştir (40,41).

Oksidatif Stres Hipotezi

Hücrelere gereken enerjiyi üretmek için mitokondride yapılan aerobik solunum esnasında elektron transport sistemi (ETS) ile serbest oksijen radikalleri (ROS) oluşur. Fakat yaşlanma gibi fizyolojik süreçlerde ya da AH gibi patolojik süreçlerde bu sistemin bozulması ile gereğinde fazla ROS üretilir ve uzaklaştırılmaz. Böylece dokudaki çeşitli proteinler, lipidler ve nükleik asitlerde hasarlar oluşur. Bu alanda elde edilen sonuçlara göre A β 'nın endotel hücrelerinde *süperoksit* (O₂⁻ bir ROS türü) üretimini artırıp, hücre hasarına ve ölümlerine neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca mitokondri disfonksiyonunun kendisi de AH patolojisinde yer alan önemli bir noktadır. AH'li bireylerde yapılan biyopsi çalışmalarında mitokondrinin küçöldüğu ve genetik materyalinin sitoplazma içine dağıldığı bulunmuştur (42).

Bozulmuş Glukoz Metabolizması Hipotezi

Bildiğimiz üzere insan beyni, vücut ağırlığının yaklaşık %2'sini oluşturmasına rağmen kullanılan toplam oksijen miktarının %20'sine ihtiyaç duymaktadır. Bu enerji ihtiyaçı mitokondrilerde *trikarboksilik asit döngüsü* (TCA) ve *oksidatif fosforilasyon* ile glukozun yıkımdan üretilen ATP tarafından karşılanmaktadır. Fakat yapılan araştırmalar göstermiştir ki yaşlı popölasyonda görölen AH'de, glukoz yıkımında azalma meydana gelmektedir. Bu bozulmuş glukoz metabolizması, mitokondriyal disfonksiyon ile birlikte oksidatif stres aracılı nöron hücrelerinin kaybına aracılık etmektedir (43).

Nöroinflamasyon Hipotezi

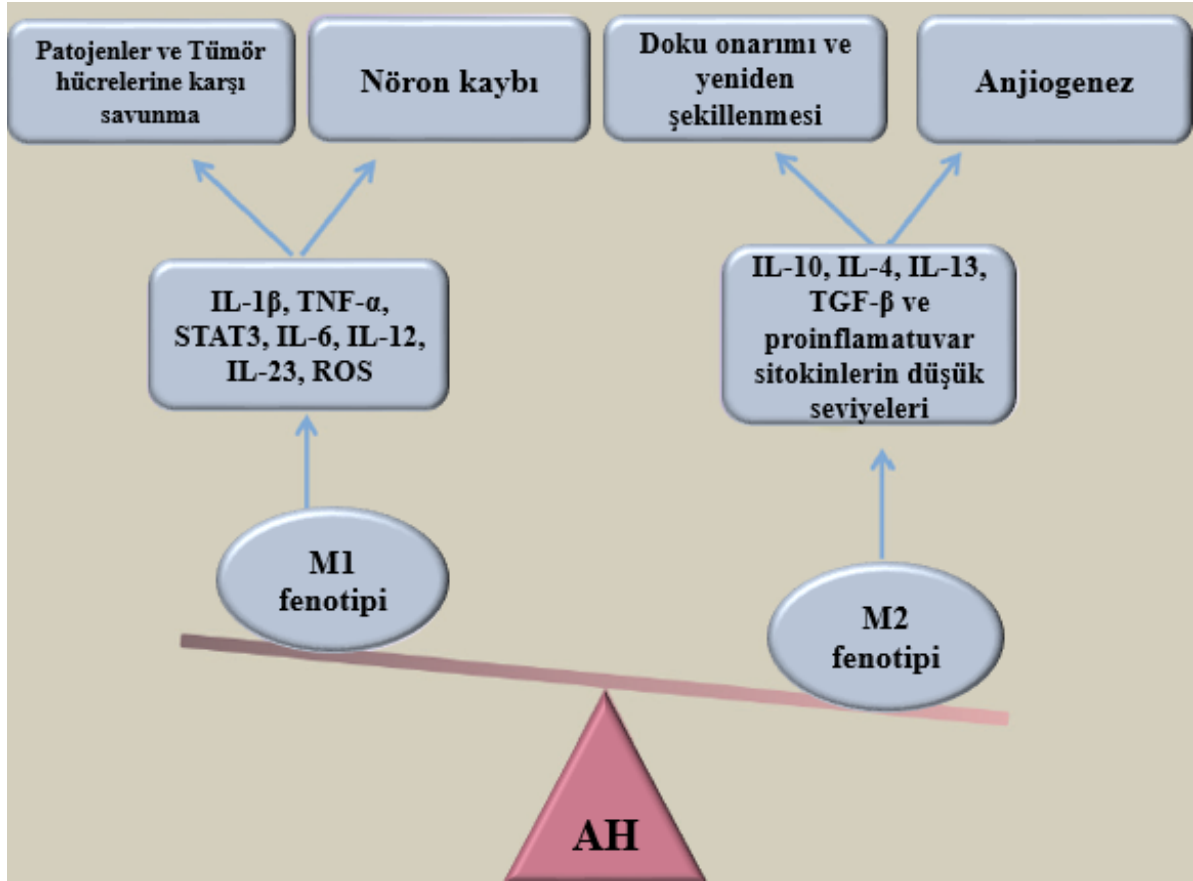
AH gibi nörodejeneratif hastalıklarda nöroinflamasyon önemli bir faktördür. Mikroglialar nöroinflamasyonla birlikte aktive olduklarında M1 (klasik -aktif- fenotip) haline gelirler. Böylelikle patojen ve tümör hücrelerine karşı proinflamatuvar sitokinler ve reaktif oksijen türleri salıverilir ve buna karşı savunma ve ardından bununla bağlantılı hücre ölümlü

gerçekleşir. Alternatif olarak M2 antiinflamatuar fenotip ise anti-inflamatuar sitokinlerin salıverilmesini artırır ve proinflamatuar sitokinlerin salıverilmesinin azaldığı doku tamiri/*remodelling* ve angiogenezi tetikler (Şekil 3). Son yıllarda bu rollerinin nörodejeneratif hastalıklardaki nöroinflamasyonda önemli olduğu saptanmıştır. *Interleukin 1 β* (IL-1 β), IL6 ve *tumor necrosis factor α* (TNF- α) gibi proinflamatuar sitokinler M1 fenotipinde salgılanıp patojenlere ve tümör hücrelerine karşı savunmadan ve sonucunda nöronlar gibi sağlıklı dokuların da kaybından sorumluyken, M2 fenotipinde salgılanan IL-4, IL-10, IL-13 ve TGF gibi sitokinler doku tamiri, yeniden yapılandırma (*remodeling*) ve angiogenezi tetikler.

İnflamasyon ve mikroglial aktivasyon, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı (PD), Huntington hastalığı, Multipl skleroz (MS) ve Amyotrofik lateral skleroz (ALS) dahil olmak üzere çoklu nörodejeneratif hastalıkların patogenezinin ortak bir bileşenidir. Beyindeki yerleşik doğuştan gelen bağışıklık hücreleri olan mikroglialar, çevrelerini aktif olarak izler ve süperoksit, nitrik oksit ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF α) gibi sitotoksik faktörler üretmek için çeşitli ipuçlarına yanıt olarak aşırı aktive olabilir. Mikroglial aktivasyon, konak savunması için gerekli ve kritik olsa da, mikroglialının aşırı aktivasyonu nörotoksiktir (44). Bu hipotez önceleri daha çok SSS'nin lokal immün hücreleri olarak bilinen mikrogliaları içeren çeşitli reaksiyonlarla ve bunun sonucunda nöronların etkilenmesi ile açıklanmaya çalışılmıştır. Daha sonra SSS'de kalabalık bir hücre grubu olan astrositlerin de bu olaylar üzerinde çeşitli etkileri olabileceği düşünülerek çalışmalar bu yöne doğru da ilerletilmiştir (45).

LİPOPOLİSAKKARİT VE NÖROİNFLAMASYON

İnflamasyon, vücudun kendi kendini doğal şekilde savunmasını sağlayan bir bağışıklık sistemi yanıtıdır. Steril durumlardan (mekanik zedelenme, doku zedelenmesiyle sonuçlanan ameliyatlar vs.) kaynaklanabileceği gibi, bakteriyel ve viral invazyon gibi steril olmayan yollardan da tetiklenebilmektedir. İnflamatuar yanıt çeşitli hücreler ve sinyal moleküllerinin etkileşimi sonucu düzenlenmektedir.



Şekil 3. Mikroglia fenotiplerinden salıverilen inflamatuvar sitokinler ve rolleri (46).

İnflamatuvar yanıtın akut döneminde dokudaki lökositler, endotelial hücreleri uyarak adezyon moleküllerine sunulmaktadır. Bu da bölgeye daha fazla lökosit göçüne neden olmaktadır. Bu adezyon molekülleri lökositleri yavaşlatarak endoteliyuma daha fazla tutunmasını sağlamaktadır. Böylece endoteliyumun yapısı değişerek lökositlere geçirgen hale gelmekte ve lökositler uyarının yakınındaki sitokinden zengin alana doğru hareket etmektedir. Bunun yanı sıra, dokudaki monositler, makrofajlara dönüşüp fagositoz yeteneği kazanarak inflamatuvar yanıtı güçlendirmektedir. Buradaki amaç inflamasyona neden olan yıkıcı durumları kontrol altına almak ve yok etmek olsa da, aşırı inflamatuvar yanıt doku hasarına ve çeşitli hastalık patolojilerine neden olmaktadır (47). İnflamasyonun bu hem olumlu hem de olumsuz rolü santralde de kendini göstermektedir (48). Beyin ve omurilikteki bu inflamatuvar yanıt nöroinflamasyon denilmektedir. Yakın zamana kadar sahip olduğumuz bilgiler, santral sinir sisteminin periferik dolaşımdaki olaylardan, kan beyin bariyeri (KBB) yoluyla tamamen ayrılmış bir bölge olduğu yönündeydi. Gerçekten de fizyolojik koşullarda immüniteden sorumlu hücreler KBB'yi geçemezler. Fakat inflamasyon durumunda endotel bütünlüğünün bozulması, KBB yapısının da hasarlanmasına ve immün hücrelere karşı geçirgen hale

gelmesine neden olmaktadır. Dahası KBB'nin sadece periferik immün sistem hücrelerine karşı geçirgen olmakla kalmayıp, kendi içinde de çeşitli sitokinlerin salıverilmesini indükleyerek santrale lökosit göçünü sağladığı bilinmektedir.

SSS'de bu sitokin salıverilmesinde ve nöroinflamasyondan sorumlu olan başlıca hücreler mikroglialar olsa da son yıllarda yapılan çalışmalar astrositlerin de aynı şekilde nöroinflamasyondan sorumlu olduğunu göstermiştir (49).

Daha önce de bahsedildiği gibi inflamasyon koruyucu bir mekanizma olarak işlese de süresine ve şiddetine bağlı olarak dokuya hasar verme potansiyeline sahiptir. İşte nöroinflamasyon sürecinin böyle kontrol dışı artışı da beyinde doku hasarına ve nörodejeneratif hastalıklara neden olmaktadır. Bunların başında da Alzheimer Hastalığı gelmektedir.

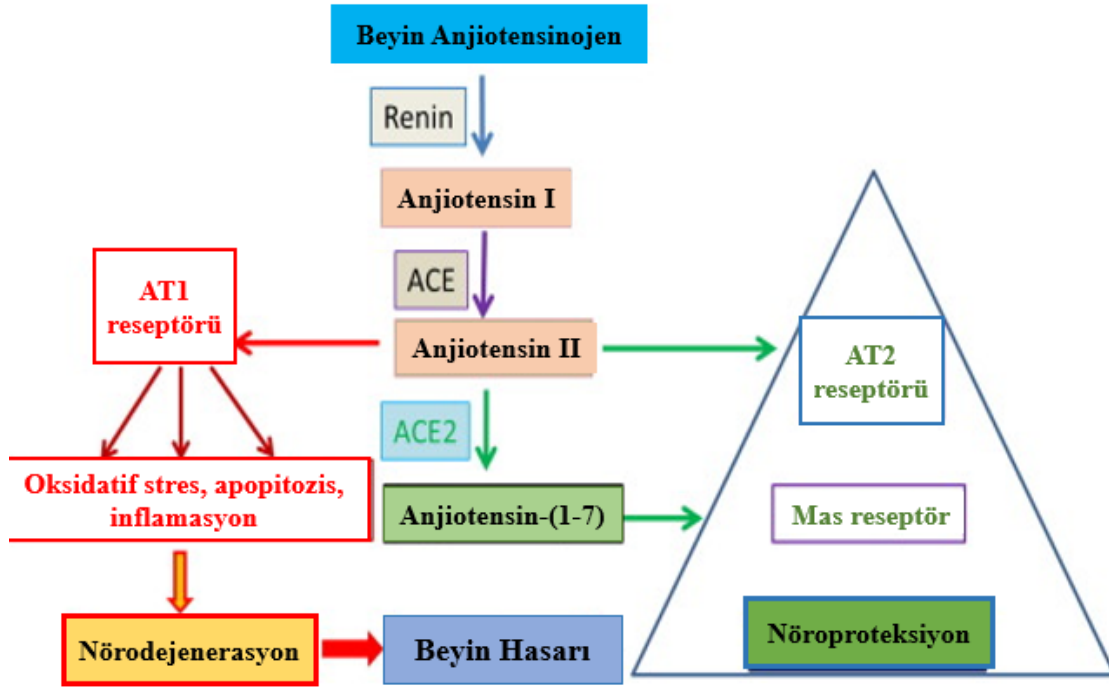
Lipopolisakkaritler (LPS), gram negatif bakterilerin lipid membranında yapısal bütünlüğün korunmasında önemli rolü olan endotoksinlerdir. Vücutta etkilerini toll-benzeri reseptörlerden (TLR) TLR-4'e bağlanarak gösterirler. TLR-4 reseptörü *pattern recognition receptors* (PRR) reseptör ailesine dahil, enfeksiyon gelişimine karşı immün sistemi uyarmakla görevli reseptörlerdendir. LPS endotoksinleri bu reseptöre bağlanarak inflamasyonda görevli sitokinlerin salıverilmesine neden olurlar. (47). Bunlar IL-6, IL-1 β , IL-12, IL-17A, IL-18 ve TNF- α gibi proinflamatuvar ve IL-10 ve *transforming growth factor- β* (TGF- β) gibi antiinflamatuvar sitokinlerdir (50). Buradan da anlaşılabacağı gibi inflamatuvar süreç hem kendini kısıtlayan hem de alevlendiren bir durumdur.

Beyindeki nöroinflamasyondan sorumlu hücreler olan mikroglialar ve astrositler membranlarında TLR-4 reseptörlerini bulundurlar. LPS, CD14'ü bu hücrelerin membranları üzerinde bağlayarak LPS-CD14 kompleksini oluşturur ve bu daha sonra TLR-4 ile etkileşime girer (50). Bakteriyel endotoksin olan LPS, TLR4 reseptörü aracılığıyla, astrositlerde NF κ B, mikroglialarda p38 α yolağıyla proinflamatuvar sitokinler IL1 β , IL6 ve TNF α 'nın ifadelerini artırarak nöroinflamatuvar sürecini başlatır (46). Bu konuda yapılan pek çok çalışmada sistemik LPS uygulamalarının özellikle hipokampusta kontrol gruplarına kıyasla IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinleri artırdığı görülmüştür (51).

LPS ile indüklenen nöroinflamasyon, hem *in vivo* hem de *in vitro* nöroinflamasyonu incelemek için mevcut standardı temsil eder (52).

SANTRAL RENİN ANJİYOTENSİN SİSTEMİ

Renin-anjiyotensin sistemi (RAS), sodyum ve su homeostazını korumak için dolaşım sisteminde önemli bir modülatör olarak kabul edilmiştir. Dolaşım sistemine ek olarak, kümülatif kanıtlar, RAS'ın kolon, akciğerler, karaciğer ve beyinde de bulunduğunu ve bu organ



Şekil 4. Klasik Ras ve düzenleyici Ras eksenlerinin etkileri. Sağlıklı durumda beyin renin anjiyotensin sistemi (RAS) bileşenlerinden biri olan anjiyotensin (1-7) vazodilatasyon, antiinflamatuvar ve anti-proliferatif etkileri ile nöroprotektif etkilere sahiptir. AH’de RAS dengesi bozulur; regülatör kol azalırken klasik Ang-II/III artar (53).

ve dokularda önemli fizyolojik işlevlere aracılık ettiğini göstermiştir. Vücudun her bölgesinde olduğu gibi beyinde de RAS anjiyotensinojenin renin etkisi ile anjiyotensin I (Ang I)’e, onun da ACE etkisi ile anjiyotensin II’ye (Ang II) dönüşmesiyle başlar. Ang II ise AT1 ve AT2 reseptörlerine bağlanarak etki gösterir. Ya da ACE2 etkisi ile anjiyotensin-(1-7)’ye (Ang-(1-7)) dönüşür ve Ang II’nin aktivitesine zıt özellikler gösterir (Şekil 4).

RAS’ın yeni tanımlanmış bir heptapeptidi olan anjiyotensin-(1-7), ACE2 ve MAS1 (Mas) reseptörü ile birlikte ACE2/Ang-(1-7)/Mas eksenini oluşturur. Ortaya çıkan kanıtlar, kolit, akciğer fibrozu, hepatik steatoz ve iskemik inme gibi durumlarda inflamatuvar yanıtları düzenlemede de bu eksenin rolünü ortaya koymuştur (12).

Renin-anjiyotensin sistemi, kan basıncını ve sıvı homeostazını modüle etmek için beyinde derin fizyolojik etkiler oluşturur. RAS’ın başlıca aktif bileşeni olan anjiyotensin-II (Ang II), ön beyin sirkümventriküler organları ve hipotalamus içindeki tip 1 reseptörleri (AT1R) aracılığıyla sempatik çıkışı ve kan basıncını, su alımını ve vazopresin sekresyonunu artırıcı yönde etki oluşturur (54-56). Bununla birlikte, beyindeki bu Ang II/AT1R ekseninin aşırı aktivitesi, belirli hastalıklara önemli derecede katkıda bulunur. Örneğin, kardiyovasküler kontrol merkezlerinde Ang II tarafından kalıcı AT1R aktivasyonu, sempatoeksitasyona ve

nörojenik kaynaklı yüksek kan basıncına sebep olabilir (57). Santral RAS bileşenlerinin kardiyovasküler etkileri, Ang II/AT1R ile sınırlı değildir. Beyindeki reseptörlerinin (Prorenin reseptörü –PRR-) kardiyovasküler ve sıvı homeostazında Ang II'ye hem bağımlı hem de bağımsız etkiler ortaya çıkardığı ve nörojenik hipertansiyonda RAS katılımına katkıda bulunduğu artık iyi bilinmektedir (58).

Renin-anjiyotensin sisteminin yeni tanımlanan eksenini olan ACE2/Ang-(1-7)/Mas eksenini, çeşitli patolojik koşullar altında inflamatuvar yanıtları modüle etmede çok önemli bir rol oynar. Beyin ACE2/Ang-(1-7)/Mas ekseninin yaşlanmaya bağlı nöroinflamasyon ile ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada, hızlandırılmış yaşlanmanın bir hayvan modeli olan “hızlandırılmış yaşlanmaya meyilli fare 8 (SAMP8)” fareleri kullanılarak, yaşlı beyindeki nöroinflamasyonun, azalmış bir Ang-(1-7) seviyesine bağlanabileceği ortaya çıkarılmıştır. Daha da önemlisi, Ang-(1-7)'nin peptit olmayan bir analogu olan AVE0991'in, Mas reseptörüne bağlı bir şekilde mikrogial aracılı inflamatuvar yanıtın baskılanması yoluyla yaşlanmaya bağlı nöroinflamasyonu azalttığına dair kanıtlar sağlanmıştır (12).

Bunun yanında yine santral RAS'da etkili olan, anjiyotensin III (Ang III)/ AT2 reseptör eksenini, anjiyotensin IV (Ang IV)/ *insülin regüle aminopeptidaz* (IRAP) eksenini ve Ang IV/AT4 reseptör eksenini de mevcuttur. Bu eksenlerden kısaca bahsedecek olursak, Ang III/ AT2 reseptörü, hücre rejenerasyonuna etki ederek, Ang IV/ IRAP, vazopressin, oksitosin, somatostatin, kolesistokinin 8 gibi bellek güçlendirici enzimlerin aktivitesini artırarak, Ang IV/ AT4 reseptörü ise serebral kan akışı ve nöroproteksiyonda rol alarak etki eder. Sonuç olarak tüm beyin RAS ile ilişkili reseptörler ve aktif moleküller düşünüldüğünde, AH'nin başlamasında en önemli sistem Ang II/AT1 reseptör eksenidir. Buradaki durumlara karşı koyacak şekilde konumlandırılmış RAS bileşenleri ise Ang III/AT2 reseptörü, Ang IV/IRAP, Ang IV/AT4 reseptörü ve Ang(1–7)/Mas reseptörüdür (59).

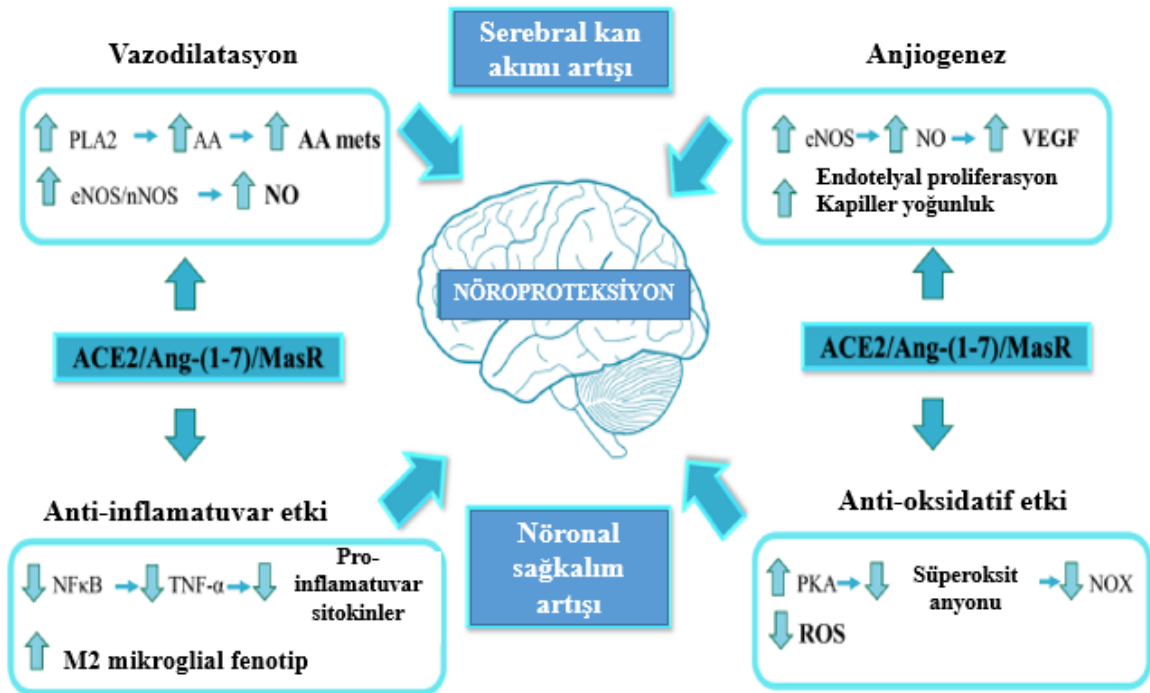
MAS RESEPTÖRÜ VE AVE0991

Renin-anjiyotensin sistemi, periferik dokularda kardiyovasküler homeostazın düzenlenmesindeki rolü ile bilinir fakat artık beynin periferik organlardan ayrı olarak kendi intrinsik RAS'ına sahip olduğu oldukça iyi bilinmektedir. ACE, anjiyotensin II (Ang II) ve Ang II tip 1 reseptörü (AT1R), AH patogenezinin katıldığı gösterilen beyin RAS'ının klasik eksenini oluşturmaktadır. AH hastalarının ölüm sonrası çalışmaları, Ang II'nin metabolik enzimi olan ACE'nin ekspresyonunun ve aktivitesinin, frontal korteks ve hipokampus dahil olmak üzere beyin bölgelerinde önemli ölçüde değiştiğini bulmuştur. Bu arada, beyindeki aşırı Ang II seviyeleri, Aβ birikimi ve tau proteininin hiperfosforilasyonu dahil olmak üzere AH ile ilişkili

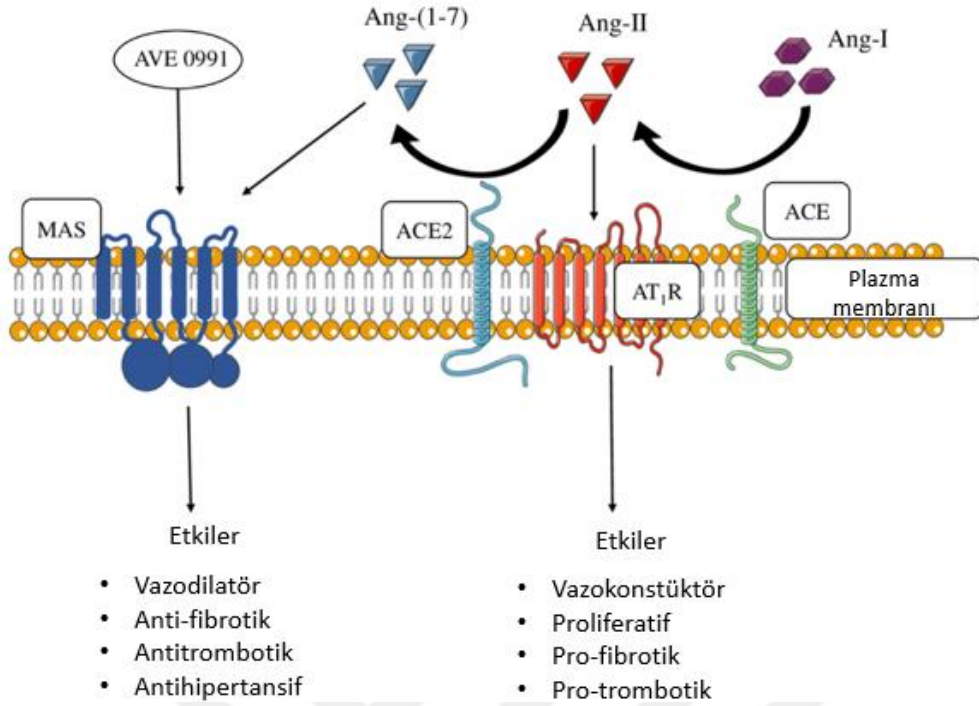
nöropatolojiyi doğrudan şiddetlendirebilir. Ek olarak, beyne nüfuz eden ACE inhibitörlerinin (ACEI'ler) veya anjiyotensin reseptör blokörlerinin (ARB'ler) uygulanmasının, AH riskinin azalması ve bu hastalığın yavaş ilerlemesi ile bağlantılı olduğu da gözlenmiştir (60).

Beyin RAS'ının yakın zamanda tanımlanmış bir heptapeptidi olarak, anjiyotensin-(1-7) [Ang-(1-7)], metabolik enzimi ACE2 ve reseptörü Mas ile birlikte ACE2/Ang-(1-7)/Mas eksenini oluşturur, hem beyin hem de periferik dokularda ACE/Ang II/AT1R ekseninin sayısız fizyolojik durumuna ters etki eder.

Başlarda Mas reseptörünün durumu detaylı olarak anlaşılamasa da 2000'lerin başında anjiyotensin-(1-7)'nin sinyallerini alan G protein bağlı reseptör (GPCR) ailesinin bir üyesi olarak açıklanmıştır (61). Biriken kanıtlar, ACE2/Ang-(1-7)/Mas ekseninin hem hayvanlarda hem de insanlarda normal bilişsel işlevlerin sürdürülmesinde önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Daha da önemlisi, bu eksenin düzensizliği, hipertansiyona bağlı nörodejenerasyon ve vasküler demans gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıkların etiyolojisine ve ilerlemesine katkıda bulunmuştur (62).



Şekil 5. ACE2/Ang-(1-7)/Mas eksenini kaynaklı nöroproteksiyonda yer alan ana sinyal yolları ve mekanizmaları (3).



Şekil 6. AVE0991'in Mas reseptörü üzerinde etkileri. Ang II'nin ACE2 etkisi ile Ang-(1-7)'ye dönüştürülmesi. Ang II'nin AT1R üzerindeki etkileri (63).

ACE2/Ang-(1-7)/Mas eksenini, renin-anjiyotensin sisteminin koruyucu kolu olarak bilir (Şekil 5). Mas reseptör uyarımı yoluyla Ang-(1-7), fosfolipaz A2 (PLA2) aktivasyonunu, araşidonik asit (AA) salınımını salıverilmesini ve nitrik oksit (NO) oluşumunu sağlar. Artan NO, AA seviyeleri ve protein kinaz-A (PKA) yolunun aktivasyonu, nöronal sağkalımı destekler. NO ve AA üretimi vazodilatasyona neden olabilirken, endotelial nitrik oksit sentazın (eNOS) aktivasyonu vazodilatasyona dahil olmasının yanı sıra anjiyogenez ile ilişkilidir. RAS'ın koruyucu eksenini, beyin nükleer faktör κ B (NF- κ B)'nin inhibisyonu yoluyla serebral oksidatif durumdaki gelişmeler ve inflamasyon yoluyla faydalı etkilere sahiptir. Mas reseptör aracılığıyla Ang-(1-7), çekirdekte ve mitokondride süperoksit anyonunun azalmasına katılır ve bu da NADPH oksidaz'ın (NOX)'in inhibisyonuna yol açar, böylece oksidatif strese azalma ve daha fazla nöronal sağkalım ve oksidatif stresin azalması sağlanır. ACE2/Ang-(1-7)/Mas eksenini de makrofaj popülasyonunun bir antiinflamatuvar fenotipe dönüşmesinde rol oynar (3).

Ang(1-7), G-protein-bağlı Mas reseptörüne bağlanır ve bu sistemin periferik organlarda inflamasyon ve fibroze karşı koyduğu, glukoz kullanımını arttırdığı ve insülin direncini azalttığı gösterilmiştir. Mas reseptörü, hipokampal ve piriform korteksler başta olmak üzere bellek ve biliş ile ilişkili beyin yapılarında bulunmuştur. Bu bilgilerle tutarlı olarak Ang(1-

7)'nin hipokampusun *Cornu Ammonis 1* (CA1) bölgesinde bellek oluşumunun yapı taşı olan uzun dönem potansiyalizasyonu potansiyalizasyonu (LTP) kolaylaştırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, Ang(1-7)'nin belleği geliştirdiği, Mas reseptörünün blokajının ise korkuyla ilişkili belleği olumsuz etkilediği gösterilmiştir (64).

AVE0991, yukarıda bahsedilen Ang(1-7)'nin aktivitesine aracılık eden ve AngII'nin etkilerini düzenleyen non-peptid bir bileşik olarak geliştirilmiştir (65) (Şekil 6). İlk olarak 2002 yılında Wiemer ve ark.'ları tarafından tanımlanan ve endotel üzerinde Ang(1-7)'in etkilerini taklit eden AVE0991'in kimyasal adlandırması 5-formil-4-metoksi-2-fenil-1[[4-[2-etilaminokarbonil-sülfonamido)-5-izobütil-3-tienil]-fenil]-metil]-imidazol şeklindedir. Ang(1-7)'ye göre en önemli avantajları, oral kullanımda, daha kararlı bir bileşik olması ve daha uzun bir yarı ömre sahip olmasıdır (66).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 27.10.2021 tarih ve 10 no'lu oturumda 2021.10.02 karar no'su ile onaylanmıştır (Ek1). Çalışmamız İyi Laboratuvar Uygulamaları Kılavuzu ve Hayvan Etiği Evrensel İlkelerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi tarafından TÜBAP 2021/144 kayıt numarası ile desteklenmiştir (Ek2).

HAYVANLAR

Çalışmada ağırlıkları ortalama 30-40 gr arasında değişen, 2-3 aylık, erkek, Balb-C fareler kullanılmıştır. Deneyde kullanılan fareler, Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nden temin edilmiş ve daha sonra tüm deneyler boyunca Anabilim Dalımız Hayvan Laboratuvarında standart koşullar altında barındırılmıştır. Beslenmeleri için standart fare yemi ve musluk suyu *ad libitum* olarak verilmiştir. Kafeslerin bulunduğu odalarda 12 saat karanlık 12 saat aydınlık şeklinde aydınlatma, %45-65 arası nem ve 20-25 °C sıcaklık uygulanmıştır.

DENEY PLANI VE ÇALIŞMA GRUPLARI

Deneyimizde hayvanlar 14 grupta toplanmış ve her grup 15 hayvandan oluşmuştur. Gruplar da kendi aralarında dört şekilde ayrılmıştır. İlk 2 grup kontrol ve LPS, sonraki 4 grup *acquisition* (edinim), daha sonraki 4 grup *consolidation* (sağlamlaştırma- konsolidasyon) ve en son 4 grup *retrieval* (geri çağırma) şeklinde sınıflandırılmıştır. Kontrol gruplarından ilkinde sadece ilk gün çözücü (%10 *dimetilsülfoksit*), ikincisine ise sadece ilk gün LPS enjekte edilmiştir. Diğer gruplara ise çözücü veya tedavi ajanı AVE0991'in 1 mg/kg, 3 mg/kg ve 5 mg/kg dozlarından biri uygulanmıştır. Bu gruplarda, ilk gün 5 mg/kg LPS verilip ardından davranış deneyinin ilk günü (FC1) deneyden önce (edinim), veya FC1 günü deneyden sonra (konsolidasyon) ya da korku koşullanma deneyinin ikinci günü (FC2) deneyden önce (geri çağırma) çözücü ve 1, 3 ve 5 mg/kg AVE0991 enjekte edilmiştir.

Hayvanların bellek düzeyinin, bir önceki gün öğrendikleri şoku ertesi gün hatırlamalarına ve donma davranışı sergilemelerine bakarak ölçülmesi hedeflenmiştir. Bunun için de davranış deneyi olarak bağlamsal korku koşullanma düzeneği (*fear conditioning- FC*) kullanılmıştır. Hayvanların korku düzeyi, hareketsiz kalma (donma) süreleri ölçülerek değerlendirilmiştir.

1. gün: Her bir hayvana, grubuna göre çözücü veya lipopolisakkarit (LPS) enjeksiyonu yapıldı.

8. gün: Her bir hayvana korku koşullanma 1 (FC1- 1. gün) uygulandı, gruplarına göre enjeksiyonlar yapıldı. Kontrol gruplarına herhangi bir enjeksiyon yapılmadı. Edinim grubuna FC1'e başlamadan yarım saat önce, konsolidasyon grubuna FC1'den hemen sonra yukarıda belirtildiği dozlarda enjeksiyon yapıldı, geri çağırma grubuna ise 8. gün enjeksiyon yapılmadı.

9. gün: Geri çağırma grubuna FC2 (2. Gün FC)'ye başlamadan yarım saat önce yukarıda belirtildiği dozlarda enjeksiyon yapıldı. 9. günün sonunda ise her bir hayvana açık alan (open field-OF) testi uygulandı. Ardından sakrifiye edilen hayvanların tüm beyin dokuları çıkarılarak tartıldı ve moleküler incelemeler yapıldı (Şekil 7 ve 8).

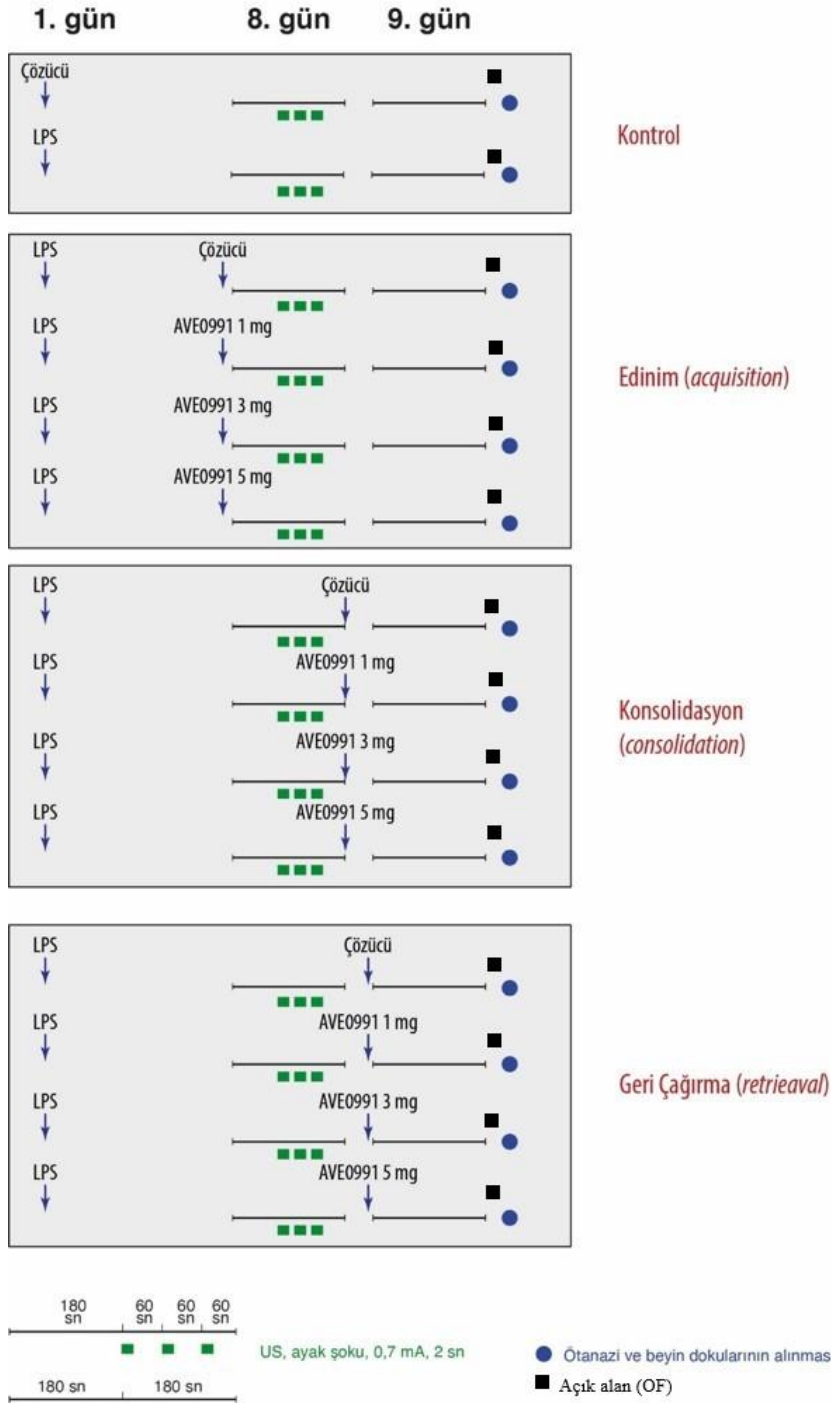


Şekil 7. Fare beyinlerinin çıkarılması.



Şekil 8. Fare beyinlerinin tartılması.

Korku Koşullanma Çalışma Planı



Şekil 9. Deney Planı.

Çalışmada uygulanan deney planı Şekil 9’da gösterilmiştir.

İLAÇLAR

Lipopolisakkarit (*lipopolysaccharides from escherichia coli* 0111:B4, Sigma Aldrich) distile suda çözüldü. Daha önceki çalışmalardan elde edilen verilere dayanılarak davranış deneyinden 1 hafta önce tek doz 5 mg/kg LPS uygulaması yapıldı (16).

AVE0991 (Cayman-35375), %10 dimetilsülfoksit (DMSO, Merck, 67-68-5, %99), %90 distile su içinde çözüldü. Gruplara 1 mg/kg, 3 mg/kg ve 5 mg/kg şeklinde ayrı dozlarda AVE0991 verilmesinin nedeni ise daha önce yapılan bir çalışmada farelere 1 mg/kg, 3 mg/kg ve 10 mg/kg dozlarında verilen ilacın, moleküler inceleme yöntemleriyle bakıldığında beyindeki AH ile ilişkilendirilen nöroinflamasyonu gösteren IL 1 β , IL6 ve TNF seviyelerini önemli ölçüde azalttığının tespit edilmiş olmasıdır (12).

İlaç enjeksiyonları intraperitoneal yoldan yapıldı. Enjeksiyonlar, vücut ağırlığına göre 0,5 ml/100 g hacminde ayarlandı.

FEAR CONDITIONING (KORKU KOŞULLANMA) ÇALIŞMALARI

Bağlamsal korku koşullanma test düzeneğinin (FCS 21200-R, COMMAT, Türkiye) dış tarafı siyah mat pleksiglas malzemeden, iç tarafı ise şeffaf pleksiglas malzemeden üretilmiştir ve 18 cm genişliğinde, 18 cm derinliğinde ve 30 cm yüksekliğindedir. Şeffaf pleksiglas iç tarafın dışarı bakan kısmında 13 cm çapında daire şeklinde kapısı mevcuttur. Tabanında birbirine paralel dizilmiş ve elektroşok cihazına bağlı çelik ızgaraların bulunduğu ve duvarlarında görsel belirteçlerin yer aldığı kafesten oluşmaktadır. Tavanında ise aydınlatma için beyaz ışık bulunmaktadır. Düzeneğin alt tarafında farelerin dışkılarının toplandığı çıkarılabilir çekmece yer almaktadır. Düzeneğin tavanında bulunan bir kamera aracılığıyla alınan görüntü bilgisayara aktarılmakta ve gerek FCS 21200-R düzeneğinin (COMMAT, Türkiye) bir parçası olan yazılım ile gerekse bu düzeneğin bir parçası olmayan Ethovision XT versiyon 16 (Noldus, Hollanda) kullanılarak donma süreleri hesaplanmaktadır (Şekil 10).

Test iki aşamalı olarak gerçekleştirilmektedir. Birinci gün eğitim fazı (edinim) 6 dakika sürmektedir. Fare kafese konduktan sonraki ilk 3 dakika herhangi bir uyarı verilmemekte, 4., 5. ve 6. dakikaların başında zeminden ayak şoku (0,5 mA şiddet, 2 saniye süreyle) verilmekte ve 6. dakikanın sonunda hayvan kafesten alınmaktadır. Bu testten tam 24 saat sonra hayvan yeniden aynı kafese konularak tekrar 6 dakika kafeste bırakılır ve herhangi bir şok uygulanmamaktadır. Deneyler sırasında her hayvan düzenekten çıkarıldıktan sonra kafesin zemini %10'luk etanol ile silinerek temizlenmektedir.



Şekil 10. Bağlamsal korku koşullanma deney düzeneği.

Çalışmamızda hayvanları 3 ayrı grupta (edinim, konsolidasyon ve geri çağırma) test etmemizin amacı, şoka bağlı travmanın hangi aşamasında ilacın daha etkili olduğunun araştırılmasıydı. Edinim aşamasında hayvana henüz şok vermeden ilaç uygulandı ve şoku “öğrenme” yeteneğine ilacın etkisi test edildi. Konsolidasyon aşamasında, birinci gün eğitiminden hemen sonra ilaç uygulandı ve alınan travmanın hatırlanmasına etkinin incelenmesi amaçlandı. Geri çağırma aşamasında ise daha önce uygulanmış bir şokun, aynı ortama girince hatırlanması üzerine ilacın etkisi test edildi. Bağlamsal korku koşullandırmada edinim, bağlamanın şokla eşleşmesini ifade eder. Korku ilişkisinin uzun süreli belleğe sabitlenmesine konsolidasyon denir. Geri getirme ise, korku belleğinin kullanılmasıdır (67).

Korku koşullanma testinde her bir grupta 15 hayvan kullanılmasının nedeni, bu konuda daha önce yapılan çalışmaları istatistiksel olarak inceleyen bir meta analize göre, istenilen güç yanında etki büyüklüğü de dikkate alınarak oluşturulan grupların ideal hayvan sayısının bu şekilde bildirilmesidir. Bu nedenle örnek büyüklüğü hesaplaması yapılmadan, her grupta 15 deney hayvanı olması planlanmıştır (68).

ROTA ROD TREADMILL

Düzenek deney farelerinin birbirlerini göremeyecekleri şekilde ayarlanmış yan yana 4 bölmeden oluşmaktadır. Her bir bölmenin genişliği 8,5 cm, yüksekliği 40 cm ve derinliği 25 cm'dir. Her bölmenin içinden silindirik şeklinde yatay mil geçmektedir. Hayvanlar aşağı

AÇIK ALAN TESTİ

Kare şeklinde dört duvarı yerden 60 cm yükseklikte, her yeri siyah opak, üstü açık ve tepede kamera ile farenin hareketlerinin kaydının yapıldığı, 60 cm x 60cm ölçülerinde bir kutudur. Fareler 6 dakika boyunca bu alan içinde gözlenmiştir. Farelerin alışık olduğu kafesten alınarak yeni ortama konulmaları, grup ya da sürüden ayrılma ve açık alana bırakılma, anksiyeteye yol açmaktadır. Hayvan test düzeneğinin merkezine konularak teste başlanır. Anksiyetenin azalmasına bağlı olarak merkezi bölgeye girme sayısı ve merkezi bölgede geçirdiği zaman artar. Tersine anksiyete artışı ile periferik bölgede geçen süre artar. İki ayak üzerine kalkma davranışı (şahlanma, *rearing*), toplam hareket edilen süre, merkez alanı terk etme, hareketsiz geçirilen süre, merkez alanda toplam hareket süresi, merkeze giriş çıkış sayısı, periferde geçirilen süre incelenmektedir. Bahsedilen parametrelerin incelenmesi, kamera aracılığıyla bilgisayara kaydedilen videolar üzerinde bir yazılım aracılığıyla (Noldus, Ethovision XT 16, Hollanda) gerçekleştirilmiştir. Hayvanların düzenekten çıkarılmasının ardından kafesin zemini %10'luk etanol ile silinerek temizlenmiştir (Şekil 11).



ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) ÖLÇÜMLERİ

Çalışmamızda nöroinflamasyonu tetikleyerek bir Alzheimer modeli oluşturmak hedeflenmiştir. Bu nedenle ELISA yöntemiyle beyinde inflamasyon belirteçlerinin ölçümü yapılmıştır. ELISA yöntemiyle spesifik bir antikora, antijenin bağlanması ve bunun özel yöntemlerle ölçülmesi amaçlanır. Burada üretici firmanın talimatlarına göre, homojenize ettiğimiz dokudan elde ettiğimiz homojenatlarda nöroinflamasyon belirteçleri TNF- α , IL-1 β ve IL-6 ölçümleri yapılmış ve bunlar istatistiksel yöntemlerle analiz edilmiştir.

ELISA ölçümleri için Cloud Clone marka Tumor Necrosis Factor Alfa (TNF A) Mouse ELISA Kit (SEA133MU), Interleukin 6 (IL6) Mouse ELISA Kit (SEA079MU) ve Interleukin 1Beta (IL 1 β) Mouse ELISA Kit (SEA563MU) kullanılmıştır. Davranış testlerinin sonunda dekapitasyon yöntemi ile kurban edilen hayvanlardan elde edilen tüm beyin numunelerinin homojenizasyonu ve TNF- α , IL-6 ve IL-1 β seviyelerinin ölçülmesi için üreticinin talimatlarına göre ticari olarak temin edilen ELISA kitleri kullanılmıştır. Kitler 96 kuyucuklu olduğu için, her bir gruptan yaklaşık 6 örnek olacak şekilde numune temin edilmiştir.

Homojenizasyon işlemi şu şekildedir:

1. Dokular, homojenizasyondan önce tartıldı.
2. Dokular küçük parçalara ayrıldı ve taze lizis tamponunda homojenize edildi (katalog: IS007: Lysis Buffer Specific for ELISA).
3. Her 50 mg doku örneğine 1 mL lizis tamponu ve cam boncuk eklendi.
4. Elde edilen süspansiyon, Next Advance Bullet Blender speed 8'de homojenizatöre tabi tutuldu.
5. Daha sonra homojenatlar, 10.000 x g'de MSA Mistral 2000 cihazıyla 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatantları toplandı ve ELISA işlemi yapılana kadar -20°C'de saklandı.

ELISA ölçüm işlemi şu şekildedir:

1. Seyreltilmiş standart, boş ve numune için kuyular belirlendi. Standart için 7 kuyu, boş için 1 kuyu hazırlandı. Uygun kuyucuklara standart dilüsyonlarının kör ve numunelerin her birinden 100 μ L eklendi. Plaka kapatıcı ile örtüldü. 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
2. Her kuyucuktan sıvı çıkarıldı, yıkanmadı.

3. Her kuyucuğa 100 µL *Detection Reactive A* solüsyonu eklendi, kuyular plak kapatıcı ile kapatıldı ve 37°C 'de 1 saat inkübe edildi.
4. Solüsyon aspire edildi ve çok kanallı bir pipet kullanılarak her kuyu 350µL 1× yıkama solüsyonu ile yıkandı ardından 1~2 dakika bekletildi. Plakayı emici kâğıda yaslayarak tüm kuyucuklardan kalan sıvı tamamen çıkarıldı. Tekrar 3 kez yıkandı. Son yıkamadan sonra, kalan yıkama tamponu aspire edilerek çıkarıldı. Plaka ters çevrildi ve emici kâğıda bastırıldı.
5. Her kuyucuğa 100 µL *Detection Reactive B* solüsyonu eklendi, kuyular plaka kapatıcı ile kapatıldı ve 30 dakika 37°C 'de inkübe edildi.
6. Aspirasyon/yıkama işleminin 4. adımı toplam 5 kez tekrarlandı.
7. Her kuyucuğa 90 µL *Substrate Solution* eklendi. Yeni bir plaka kapatıcı ile örtüldü. 37°C'de 10-20 dakika inkübe edildi *Substrate Solution* eklenmesiyle sıvının maviye dönmesi gözlemlendi.
8. Her kuyucuğa 50 µL *Stop Solution* eklendi. Stop solüsyonunun eklenmesiyle sıvının sarıya dönmesi gözlemlendi. Plakanın kenarına vurarak sıvı karıştırıldı.
9. Ardından, mikrolaka okuyucu çalıştırıldı ve hemen 450 nm'de ölçüm yapıldı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bağılamsal korku koşullanma, açık Alan testi ve ELISA sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesinde, *Mann-Whitney U testi*, *Kruskal-Wallis varyans analizi* ve *post hoc Dunn* testleri uygulanmıştır. Çalışmamızda istatistiksel analizleri yapmak için GraphPad Prism for Mac 8.4.3 programı kullanılmış ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

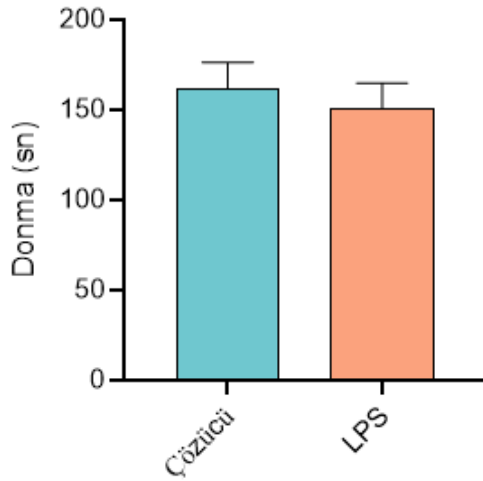
BULGULAR

Çalışmamızda kullanılan hayvanlara önce gruplarına göre LPS/çözücü enjeksiyonları yapıldı. 1 hafta sonra yine gruplarına uygun olarak AVE0991/çözücü uygulanarak davranış deneylerine maruz bırakıldı. Davranış deneyinin hemen ardından da hayvanlar dekapitasyon ile sakrifiye edilerek tüm beyin dokuları alındı, homojenize edildi ve ELISA yöntemi ile TNF- α , IL-1 β ve IL-6 düzeyleri ölçüldü. Bu açıdan bulguları davranış deneyleri ve moleküler düzeyde incelemeler olarak iki aşamada ele alabiliriz.

Korku koşullanma öncesi yapılan rota rod testlerinde fareler herhangi bir hata sergilemediler. Bu aşamada çalışma dışı bırakılan hayvan olmadı. Bazı gruplarda hayvan kayıpları yaşandı. Bu kayıpların LPS alan gruplarda yaşanması, inflamatuvar süreçle ve sitokin fırtınasıyla alakalı olabileceğini düşündürmektedir. Ancak kayıplar, deneyi durduracak kadar fazla sayıda değildi. Bağlamsal korku koşullanmanın ilk gününden önce gerçekleşen kayıplar, yerine konuldu, ilk günden sonra gerçekleşen kayıplarda ise yeni hayvan eklenmedi ve bu nedenle bazı gruplarda n sayısı azalmış oldu. Ancak hiçbir grupta n sayısı 12'nin altına düşmedi.

Çözücü ve LPS Gruplarının Davranış Deneylerinin Sonuçları

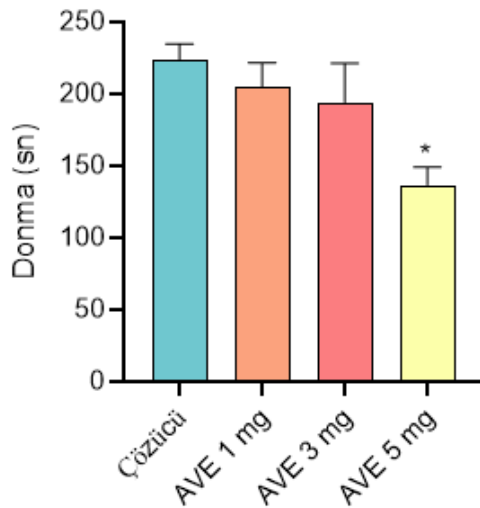
Çözücü grubunda donma süresi 161,88 saniye iken LPS grubunda 151,49 sn olarak kaydedilmiştir. LPS grubunda donma süresi çözücü grubuna göre minimal bir azalma göstermiştir ve bu azalma istatistiksel anlamlılıktan uzaktır ($p>0,05$, *Mann-Whitney U testi*, Şekil 12).



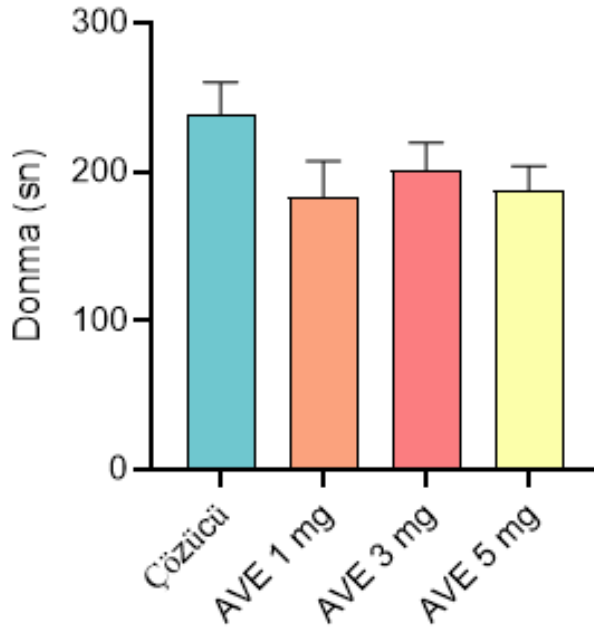
Şekil 12. Çözücü ve LPS gruplarının korku koşullanma 2. günü (FC2) donma süreleri. (Çözücü grubu için n=15, LPS grubu için n=14, grafikteki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

Edinim Gruplarının Davranış Deneylerinin Sonuçları

Çözücü grubunda ortalama donma süresi 224,3 sn düzeyindedir. 1, 3 ve 5 mg AVE0991 gruplarında ise sırasıyla 205,0; 194,4 ve 136,9 sn düzeyindedir. Bu sonuçlar donma sürelerinde doza bağlı bir azalmaya işaret etmektedir ve yalnızca 5 mg dozunda bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis varyans analizi, *post hoc* Dunn testi, Şekil 13).



Şekil 13. Edinim grupları korku koşullanma 2. günü (FC2) donma süreleri. (Çözücü grubu için n=12, diğer gruplar için n=13. Grafikteki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir, * $p < 0,05$, Kruskal-Wallis varyans analizi, *post hoc* Dunn testi).



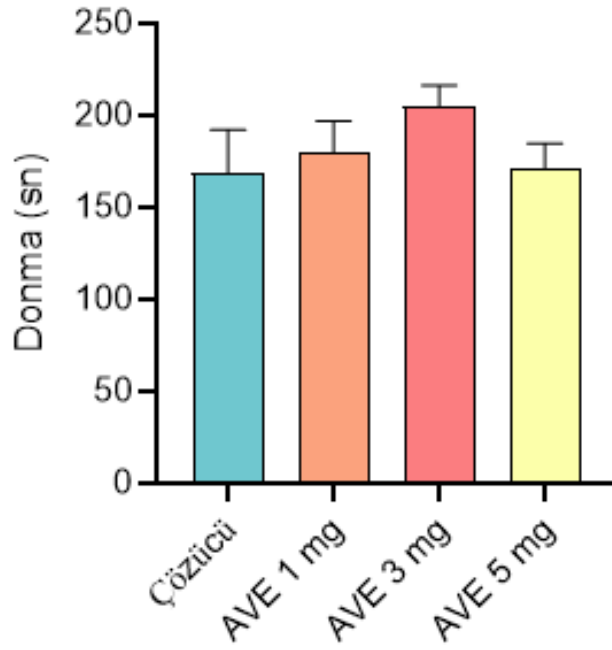
Şekil 14. Konsolidasyon grupları korku koşullanma 2. günü (FC2) donma süreleri. (Çözücü ve 3 mg AVE0991 alan gruplar için n=13, 1 mg AVE0991 alan grup için n=12, 5 mg alan grup için n=14, grafikteki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

Konsolidasyon Gruplarının Davranış Deneylerinin Sonuçları

Çözücü grubunda ortalama donma süresi 239,13 sn şeklindedir. 1 mg, 3 mg ve 5 mg gruplarında sırasıyla 183,40; 201,21 ve 187,72 sn ile birbirine çok yakın ve istatistiksel olarak anlamlı olmayan sonuçlar elde edilmiştir ($p>0,05$, *Kruskal-Wallis varyans analizi*, Şekil 14).

Geri Çağırma Gruplarının Davranış Deneylerinin Sonuçları

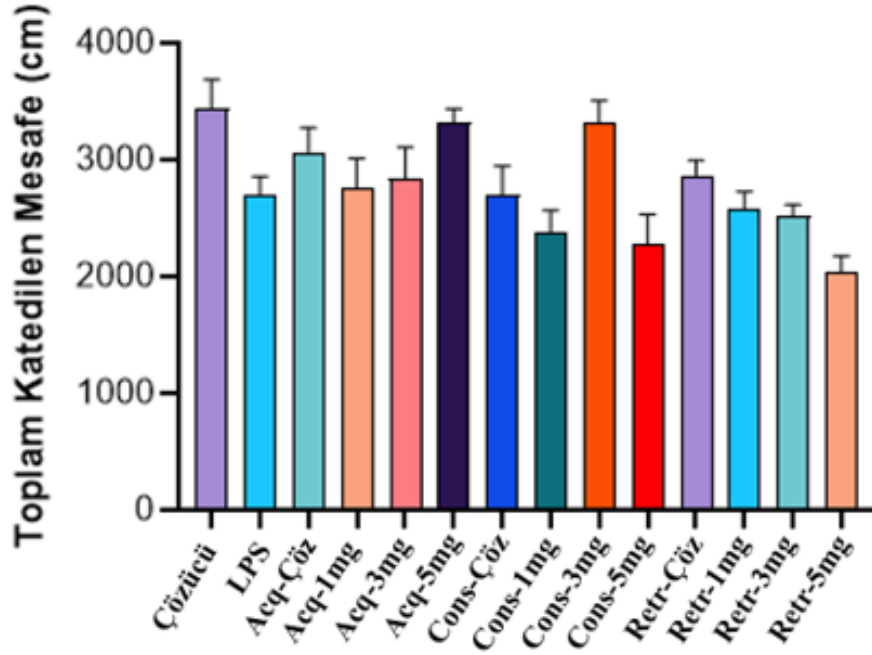
Çözücü grubunda ortalama donma süresi 169,14 sn düzeyindedir. 1 mg, 3 mg ve 5 mg AVE0991 alan gruplarda ise sırasıyla 179,96; 205,18 ve 170,80 sn şeklindedir. Buna göre 3 mg alan grupta hafif bir yükselik görülse de, istatistiksel anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır ($p>0,05$, *Kruskal Wallis varyans analizi*, Şekil 15).



Şekil 15. Geri çağırma grupları korku koşullanma 2. günü (FC2) donma süreleri. (Çözücü ve 1 mg AVE0991 alan gruplar için n=12, 3 mg ve 5 mg AVE0991 alan gruplar için n=15, grafikteki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

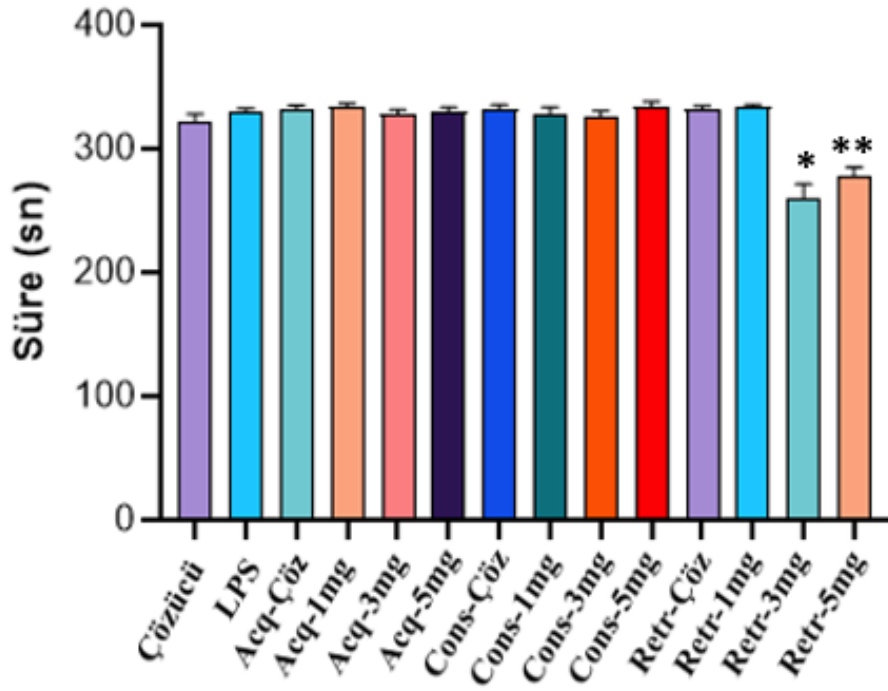
Açık Alan Testlerinin Sonuçları

Açık alan testlerinde öncelikle toplam kat edilen mesafelere bakılmıştır. 6 dakika içinde kat edilen en yüksek mesafe, çözücü grubunda 3444,9 cm ile görülmüştür. En az toplam kat edilen mesafe ise 2044,94 ile Retr-5mg grubundadır. Fakat istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememiştir ($p>0,05$, *Kruskal-Wallis varyans analizi*, Şekil 16).



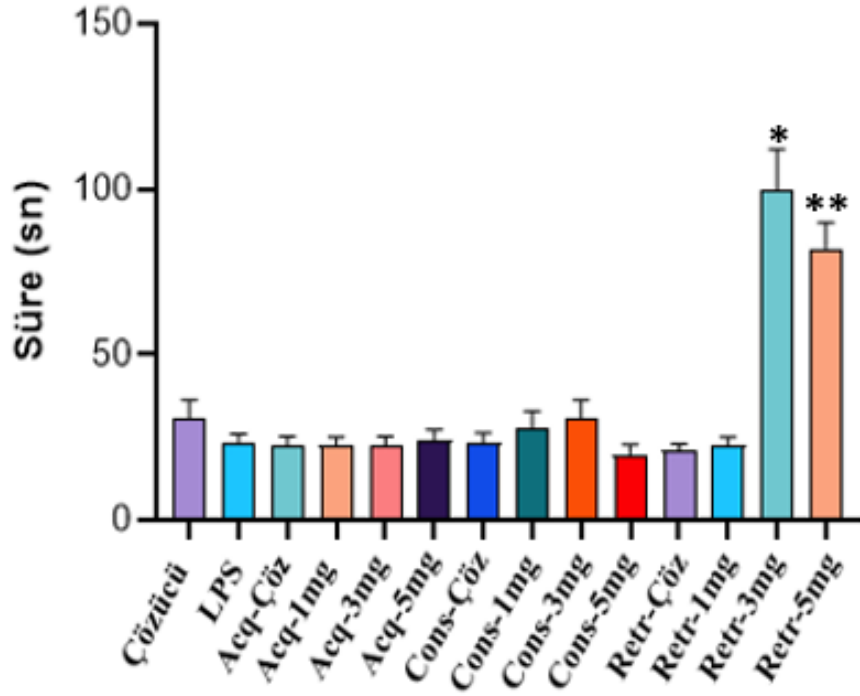
Şekil 16. Açık alan testinde her bir grubun kat ettiği toplam mesafe. (Çözücü, Retr-3mg ve Retr-5mg grupları n=15, LPS ve Cons-5mg grupları n=14, Acq-1mg, Acq-3mg, Acq-5mg, Cons-Çöz ve Cons-3mg grupları n=13, Acq-Çöz, Cons-1mg, Retr-3mg, Retr-5mg grupları n=12, grafikteki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

Periferde geçirilen süre, yani anksiyete düzeylerine baktığımızda ise Retr-3mg (260,0 sn) ve Retr-5mg (277,6 sn) gruplarında istatistiksel anlamlı sonuçlar bulunmuştur. (*p= 0,0002, **p= 0,0006, Kruskal-Wallis varyans analizi, *post hoc* Dunn testi, Şekil 17).



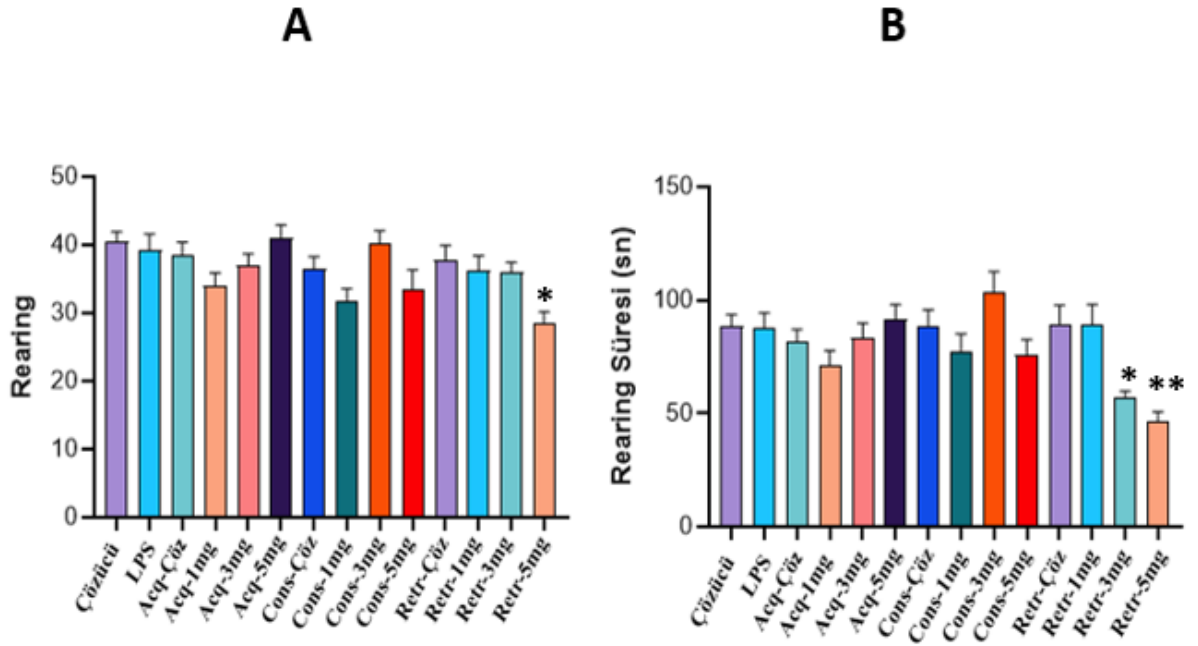
Şekil 17. Açık alan testinde her bir grubun periferde geçirdiği süre. (Çözücü, Retr-3mg ve Retr-5mg grupları n=15, LPS ve Cons-5mg grupları n=14, Acq-1mg, Acq-3mg, Acq-5mg, Cons-Çöz ve Cons-3mg grupları n=13, Acq-Çöz, Cons-1mg, Retr-3mg, Retr-5mg grupları n=12. Grafikteki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir. *p= 0,0002, **p= 0,0006, Kruskal-Wallis varyans analizi, *post hoc* Dunn testi).

Merkezde geçirilen sürelerle baktığımızda, periferde geçirilen sürelerle korele şekilde, Retr-3mg (99,70 sn) ve Retr-5mg (82,16 sn) grupları belirgin şekilde yüksek düzeydedir (*p<0,0001, **p=0,0002; Kruskal-Wallis varyans analizi, *post hoc* Dunn testi, Şekil 18).



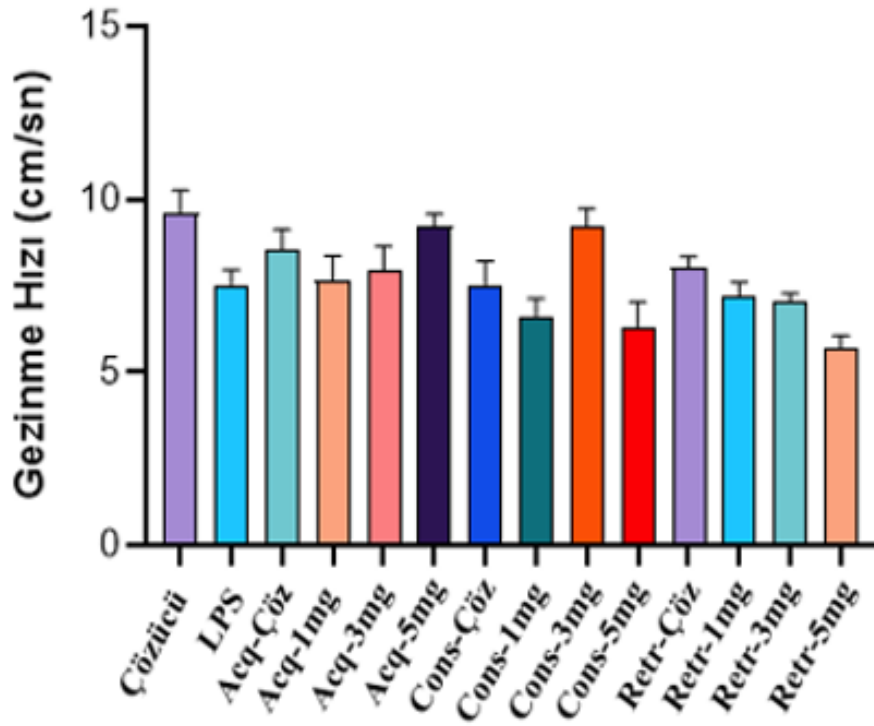
Şekil 18. Açık alan testinde her bir grubun merkezde geçirdiği süre. (Çözücü, Retr-3mg ve Retr-5mg grupları n=15, LPS ve Cons-5mg grupları n=14, Acq-1mg, Acq-3mg, Acq-5mg, Cons-Çöz ve Cons-3mg grupları n=13, Acq-Çöz, Cons-1mg, Retr-3mg, Retr-5mg grupları n=12. Grafikteki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir, *p<0,001, **p=0,0002, Kruskal-Wallis varyans analizi, *post hoc* Dunn testi).

Destekli *rearing* (şahlanma) süresi ve sıklığı, açık alan testinde hayvanın keşif davranışını gösteren bir diğer parametredir. Burada da istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiş olup, toplam *rearing* süresi Retr-5mg grubunda 46,63 sn ve Retr-3mg grubunda 56,79 sn olarak ölçülmüştür. *Rearing* sıklığında ise yine Retr-5mg grubunda en düşük değer bulunmuştur (*p<0,001, **p=0,0003 Kruskal-Wallis varyans analizi, *post hoc* Dunn testi, Şekil 19).



Şekil 19. Açık alan testinde her bir grubun destekli rearing sıklığı (A) ve süresi (B). (Çözücü, Retr-3mg ve Retr-5mg grupları n=15, LPS ve Cons-5mg grupları n=14, Acq-1mg, Acq-3mg, Acq-5mg, Cons-Çöz ve Cons-3mg grupları n=13, Acq-Çöz, Cons-1mg, Retr-3mg, Retr-5mg grupları n=12. Grafikteki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir. *p<0,001, **p=0,0003, Kruskal-Wallis varyans analizi, *post hoc* Dunn testi).

Açık alan testinde son olarak ortalama gezinme hızına bakıldığında, toplam katedilen mesafe ile korele bir şekilde, Çözücü grubunda 9,60 cm/sn ile en yüksek, Retr-5mg grubunda 5,68 cm/sn ile en düşük değerler elde edilmiştir fakat bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p>0,05$, *Kruskal-Wallis varyans analizi*, Şekil 20).

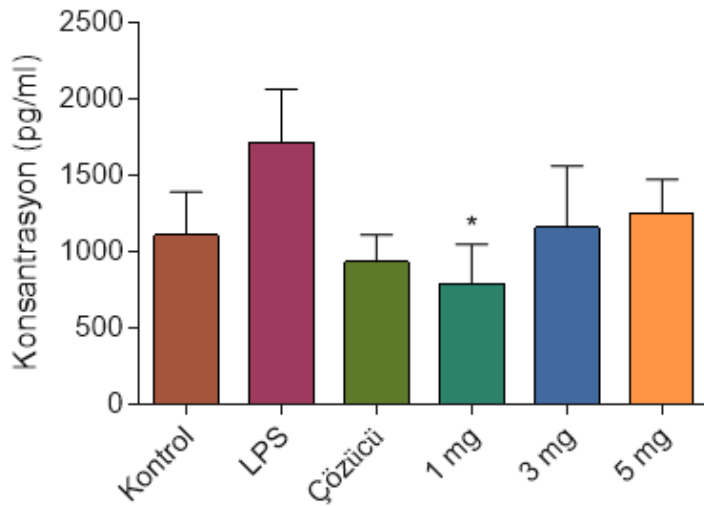


Şekil 20. Açık alan testinde her bir grubun ortalama gezinme hızı. (Çözücü, Retr-3mg ve Retr-5mg grupları n=15, LPS ve Cons-5mg grupları n=14, Acq-1mg, Acq-3mg, Acq-5mg, Cons-Çöz ve Cons-3mg grupları n=13, Acq-Çöz, Cons-1mg, Retr-3mg, Retr-5mg grupları n=12. Grafikteki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

TNF-Alfa Ölçüm Sonuçları

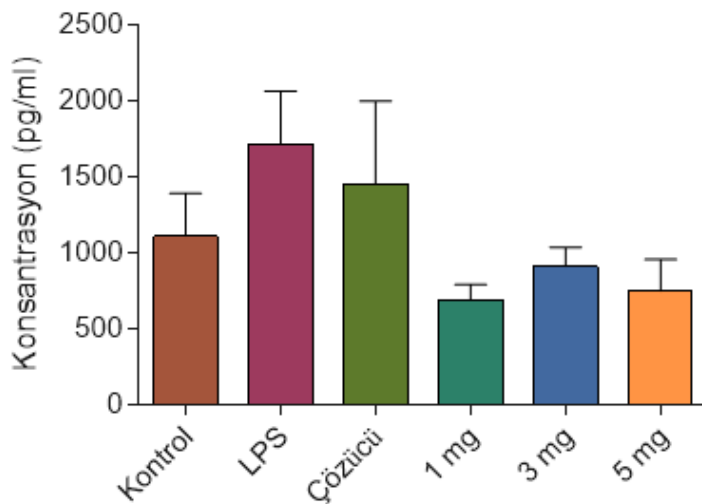
TNF- α ölçümleri arasında istatistiksel olarak yalnızca 1 mg AVE0991 alan grupta LPS'ye göre anlamlı bir düşüklük saptanmıştır. Grup içi standart hata değerleri görece yüksek olduğundan belirgin gibi görünen farklılıklar istatistiksel anlamlılığa erişememiştir. Ayrıca, muhtemelen n sayılarının az olması nedeniyle doza bağlı tutarlı bir değişim kalıbı gözlenememiştir. Bazı gruplarda homojenizasyonun santrifüj aşamasında *homogenat* kaybı olmuş veya her test için *süpernatant* miktarı yeterli gelmediği için n sayısı düşmüştür.

Edinim fazında beklenildiği gibi LPS grubunun nöroinflamasyon göstergesi olan TNF- α değeri en yüksek düzeyde bulunmuştur (1720,37 pg/ml). Çözücü grubu ile Acq-Çöz grubunda ise düzeyler birbirine yakındır ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis varyans analizi, *post hoc* Dunn testi, Şekil 21).

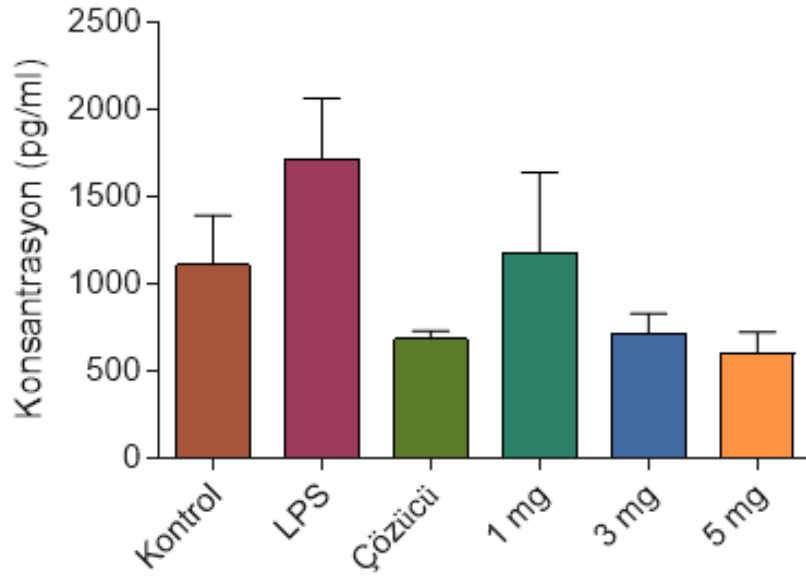


Şekil 21. Edinim gruplarının TNF- α konsantrasyonları (Çözücü ve LPS grupları için n=7, Acq-Çöz grubu için n=4, diğer gruplar için n=5. Grafikteki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir. *p<0,05, *Kruskal-Wallis varyans analizi, Dunn testi*).

Konsolidasyon gruplarında ise, yine LPS grubunda TNF- α en yüksek düzeyde bulunmuştur. AVE0991 enjekte edilen gruplarda ise belirgin istatistiksel fark olmamakla birlikte, LPS grubundan daha düşüktür (p>0,05, *Kruskal-Wallis varyans analizi, Şekil 22*).



Şekil 22. Konsolidasyon gruplarının TNF- α konsantrasyonları (Çözücü ve LPS grupları için n=7, Cons-Çöz ve 1 mg AVE0991 alan gruplar için n=6, 3 mg ve 5 mg AVE0991 alan gruplar için n=5. Grafikteki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).



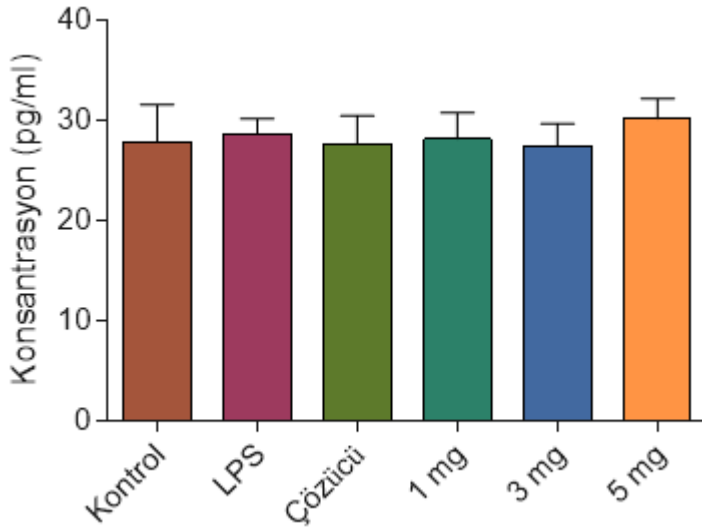
Şekil 23. Geri çağırma gruplarının TNF- α konsantrasyonları (Çözücü ve LPS grupları için n=7, 1 mg AVE0991 alan grup için n=6, diğer gruplarda n=5. Grafikteki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

Geri çağırma gruplarında da yine beklenildiği gibi en yüksek düzey LPS grubunda bulunmuştur. 1 mg, 3 mg ve 5 mg AVE0991 alan gruplarda sırasıyla 1182,22 pg/ml, 713,69 pg/ml ve 600,30 pg/ml değerleri ölçülmüş olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da doza bağlı olarak bir miktar düşüş göze çarpmıştır ($p>0,05$, *Kruskal-Wallis varyans analizi*, Şekil 23).

IL-6 Ölçüm Sonuçları

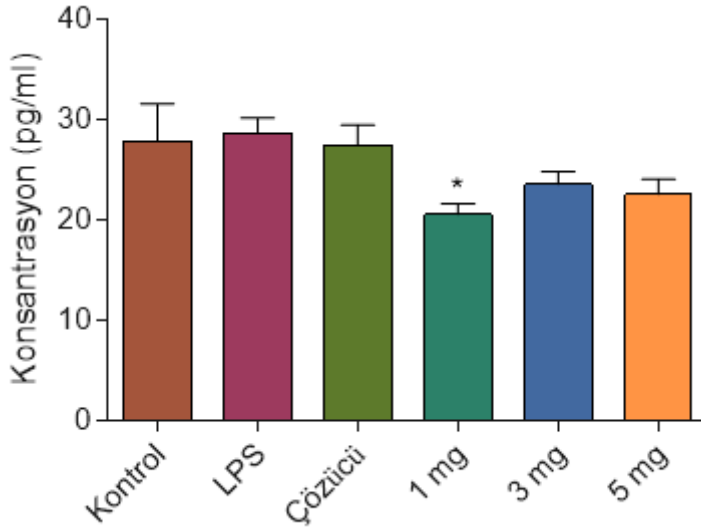
TNF- α ölçümlerinde olduğu gibi, IL-6 ölçümlerinde de yalnızca bir grupta istatistiksel anlamlı bir fark saptanmıştır. Bu ölçümlerde grup içi değişimi gösteren standart hata değerleri TNF- α değerlerinde olduğu gibi belirgin farklılıklar göstermemiştir.

Edinim gruplarında, tüm grupların ortalama değerleri yaklaşık olarak aynı düzeyde çıkmış ve hiçbirinde istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır ($p>0,05$, *Kruskal-Wallis varyans analizi*, Şekil 24).

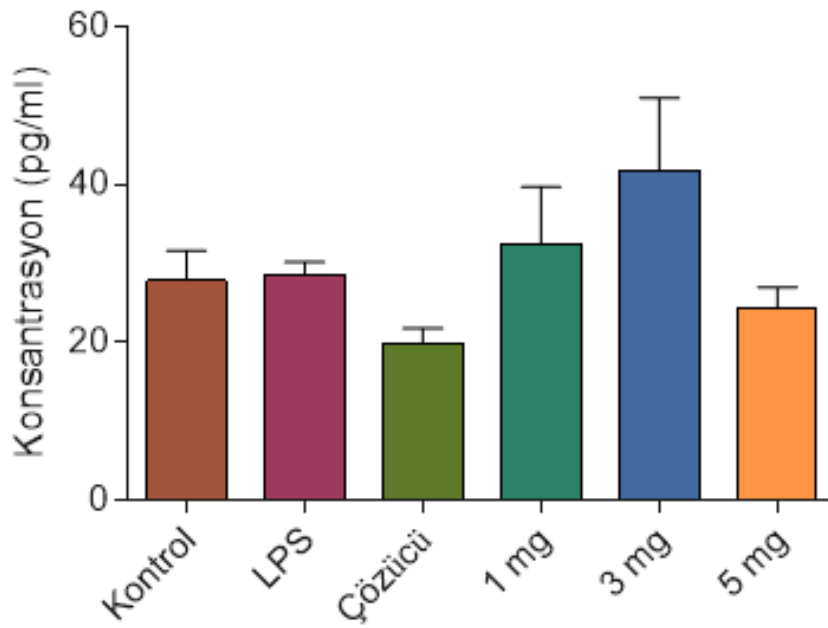


Şekil 24. Edinim gruplarının IL-6 konsantrasyonları (Çözücü grubu için n=6, LPS grubu için n=7, diğer gruplar için n=5. Grafikteki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

Konsolidasyon gruplarında ise 20,54 pg/ml ölçülen 1 mg AVE0991 alan grup ile, 28,63 pg/ml ölçülen LPS grupları arasında istatistiksel anlamlı bir fark görülmüştür ($p < 0,05$, *Kruskal-Wallis* varyans analizi, Şekil 25).



Şekil 25. Konsolidasyon gruplarının IL-6 konsantrasyonları (LPS ve Cons-Çöz grupları için n=7, Çözücü ve 5 mg AVE0991 alan gruplar için n=6, diğer gruplar için n=5. Grafikteki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir. * $p < 0,001$, *Kruskal-Wallis* varyans analizi, *post hoc* Dunn testi).



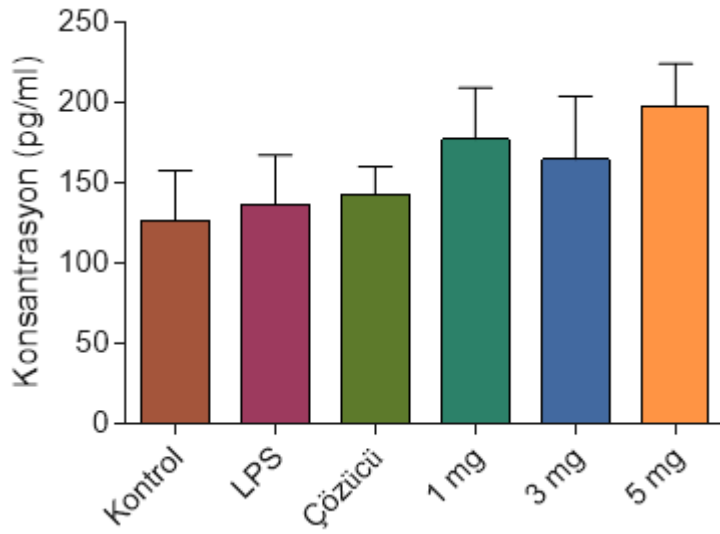
Şekil 26. Geri Çağırma gruplarının IL-6 konsantrasyonları (LPS grubu için n=7, Çözücü, Retr-Çöz ve 1 mg AVE0991 alan gruplar için n=6, diğer gruplar için n=5. Grafikteki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

Geri çağırma gruplarında, AVE0991 uygulananlarda, diğer gruplardan daha yüksek değerlerde IL-6 sonuçları gözlenmiştir, ancak bu sonuçların hiçbiri istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$, *Kruskal-Wallis varyans analizi*, Şekil 26).

IL-1Beta Ölçüm Sonuçları

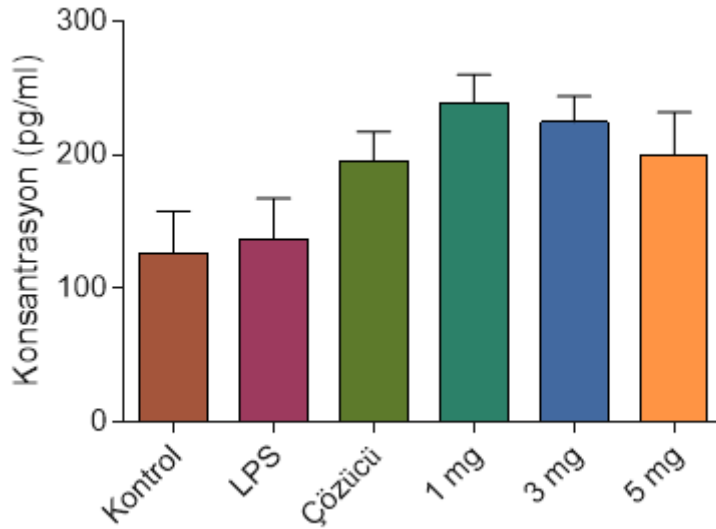
IL-1 β ölçümleri yönünden gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptanamamıştır. Gruplar içinde verilerin dağılımı görece homojen olup, standart hatalar biraz yüksektir. LPS grubunda çözücü grubuna kıyasla belirgin yüksek değerler gözlenmemiştir.

Edinim gruplarında, AVE0991 gruplarında elde edilen değerler çözücüye göre daha yüksek olmakla birlikte hiçbiri istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$, *Kruskal-Wallis varyans analizi*, Şekil 27).

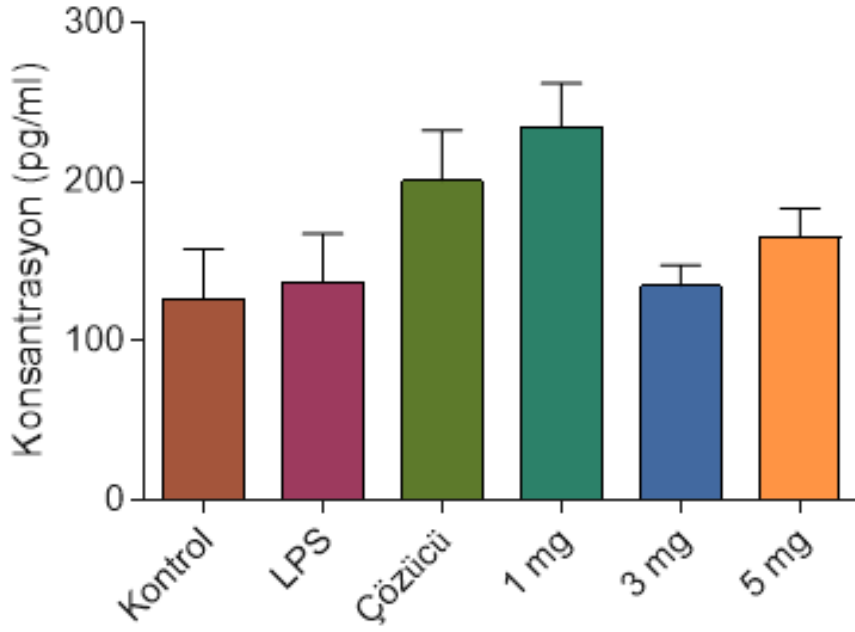


Şekil 27. Edinim gruplarının IL-1 β konsantrasyonları (Çözücü ve LPS grupları için n=7, diğer gruplar için n=5. Grafikteki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

Konsolidasyon grubunda ise, yine AVE0991 uygulanan gruplarda diğerlerinden yüksek ölçüde IL-1 β bulunmuş olsa da, bu miktar doza bağlı olarak azalmaktadır. Bu değerlerin hiçbirisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$, *Kruskal-Wallis varyans analizi*, Şekil 28).



Şekil 28. Konsolidasyon gruplarının IL-1 β konsantrasyonları (Çözücü ve LPS grupları n=7, Cons-Çöz ve 1 mg AVE0991 alan gruplarda n=6, diğer gruplar n=5. Grafikteki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).



Şekil 29. Geri çağırma gruplarının IL-1 β konsantrasyonları (Çözücü ve LPS grupları için n=7, 1 mg AVE0991 alan grup için n=6, diğer gruplarda n=5. Grafikteki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

Geri çağırma gruplarında AVE0991 dozları ile elde edilen değerler doz bağımlı bir seyir sergilememiştir. Gruplar arasında ölçülen değerler yönünden istatistiksel anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p>0,05$, *Kruskal-Wallis varyans analizi*, Şekil 29).

TARTIŞMA

Alzheimer hastalığı, günümüzde özellikle 50 yaş üstü nüfusu ciddi anlamda ilgilendiren bir sağlık sorunu olmanın yanında, önemli sosyal sıkıntılara da yol açması sebebiyle toplumu derinden etkileyen bir hastalıktır. Ortalama yaşam süresinin yükselmesi ile birlikte AH'ye sahip bireylerin oranı artmakta, bu durum hem hasta bireylerin hem de bakım verenlerin hayat kalitesini düşürmektedir. Ayrıca artan bakım ve sağlık giderlerinin yine toplum üzerindeki baskısı bu durumu önemli bir halk sağlığı sorunu haline getirmiştir. Bu nedenle AH patofizyolojisinin anlaşılması ve kesin bir ilaç tedavisinin bulunması uzun süredir bilim insanlarının araştırma konuları arasındadır. 2022 yılı itibariyle AH tedavisi için Faz 3'te 31 ajan, Faz 2'de 82 ajan ve Faz 1'de 30 ajan denenmektedir. Fakat hastalığın semptomlarının hafifletilmesi dışında maalesef kesin bir tedavi yöntemine henüz ulaşamamıştır (69).

AH'nin etyolojisiyle alakalı çeşitli hipotezler vardır; hem genetik, hem de çeşitli çevresel faktörler üzerinde durulmuştur. Patofizyolojisiyle ilgili en yaygın kanı ise, AH'nin, ilerleyici hafıza kaybı, hücre dışı amiloid β ($A\beta$) plaklarının birikmesi ve tau kümelerinden oluşan hücre içi nörofibriler yumaklar (NFT'ler) ile karakterize, yaşa bağlı nörodejeneratif bir hastalık olduğu şeklindedir (70-72).

AH'nin etyopatogenezinin araştırılmasında nöroinflamasyona bağlı nörodejenerasyon hipotezi ise son yıllarda oldukça belirgin hale gelmiştir. Nöroinflamasyon yalnızca AH değil Parkinson, MS, ALS gibi birçok nörodejeneratif hastalığın da temelini oluşturan bir patolojidir. Bu nedenle üzerinde pek çok çalışma yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir (73).

Bizim çalışmamızda da literatürde sıkça kullanılan periferik LPS uygulamasıyla oluşturulan nöroinflamasyonla bellek bozulması modeli uygulanmıştır (74-76). Ayrıca kullandığımız Balb/c türü fareler, yine literatürde sıkça LPS ile indüklenen nöroinflamasyon modellemesi için uygun olduğu görülmüş hayvanlardır (77,78). Buna göre uygulanan tek doz 5 mg/kg LPS'in farelerde nöroinflamasyonla AH benzeri semptomlara yol açması amaçlanmış ve bunu ölçmek için yine sıkça kullanılan korku-koşullanma düzeneği tercih edilmiştir (74,75,79,80). Nöroinflamasyonla oluşturulan AH modellemesinde Morris su labirenti, Y maze, yeni obje tanıma testi, pasif kaçınma testi gibi farklı davranış deney düzenekleri de denenebilirken (81,16), bizim çalışmamızda literatürdeki diğer çalışmalarda başarılı sonuçlar verdiği görülen FC tercih edilmiştir.

Nöroinflamasyonu moleküler olarak ölçebilmek için ise, yine uzun zamandır başarılı sonuçlar veren ELISA yöntemi ile TNF- α , IL-1 β ve IL-6 ölçümü yapılmıştır. Bu proinflamatuvar sitokinler, inflamasyon oluştuğunda mikrogliya ve astrositlerden salgılanarak, savunma mekanizması oluşturmakta ve doku hasarından sorumlu olmaktadır (82-84).

Alzheimer Hastalığı bağlamında, son yıllarda popüler araştırma konusu olan santral RAS incelenmiş (53) ve bunun için önceki çalışmalarda, nöroinflamasyonda etkili olabileceği tespit edilen, beyin ACE2/Ang-(1-7)/Mas aksının reseptör agonisti olan AVE0991 molekülü incelenmiştir (12). AVE0991 molekülü intraperitoneal yolla uygulamaya uygun (85) nonpeptid bir maddedir ve intraperitoneal yol dışında intranazal yol gibi periferik uygulamalarla da KBB'yi aşabildiği görülmüştür (13,86).

Çalışmamızda diğer çalışmalardan farklı olarak, kolay uygulanabilen intraperitoneal LPS ile oluşturulmuş nöroinflamasyon modeli ve nontransgenik fareler kullanılmıştır. Benzer yöntemle oluşturulan başka çalışmalarda transgenik fareler kullanılmış ve AVE0991'in belleği geliştirici etkileri tespit edilmiştir (12,87,88). Ayrıca çalışmamızda genç (8 haftalık) hayvanlarda bu etki araştırılmışken, 2021 yılında yayınlanan başka bir çalışmada 18 aylık sıçanlarda AVE0991'in bellek üzerindeki olumlu etkileri ele alınmıştır (13).

Bizim çalışmamızın davranış deneyleri kısmında bağlamsal korku koşullanma ve açık alan deneyleri yapılmıştır. Çoğunlukla 10 dakika olarak planlanan açık alan testlerinin, 5 dakika ile de sınırlandırılabilirliğini gösteren çalışmalar mevcut olduğundan (89), biz deney sürecimizin işleyişi açısından 6 dakika olarak uyguladık. Açık alan testlerinin kullanıldığı daha önceki çalışmalarda, bizim çalışmamızla benzer kat edilen mesafeler görülmüş ve buna göre lokomotor aktivitenin normal olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca periferde ve merkezde geçirilen süreler anksiyetenin göstergesi olarak bildirilmiştir (90). Özellikle Retr-3mg ve Retr-5mg gruplarında istatistiksel anlamlı olarak periferde geçirilen sürenin kısa, merkezde geçirilen

sürenin uzun olması, bizi AVE0991'in anksiyolitik etki gösterebildiği sonucuna yönlendirmiştir. Aynı dozda fakat açık alan testinden 1 gün önce AVE0991'in uygulandığı konsolidasyon ve edinim gruplarında bu etkileri görmememiz ise, anksiyolitik etkinin uzun süreli olmadığını, aynı gün içinde uygulandığında etki gösterebildiğini bize düşündürmüştür.

Açık alan testlerinde önemli bir parametre de *rearing* davranışıdır. *Rearing*, hayvanın her iki arka ayağı üzerinde şahlanıp dik konuma gelme hareketidir ve keşif davranışıyla bağdaştırılmıştır. Çoğu zaman ihmal edilse de, özellikle desteksiz *rearing* anksiyolitik etkinin çok önemli bir göstergesi olarak bilinir. Bunun yanında destekli ve desteksiz *rearing* davranışlarının benzer görünmesine rağmen farklı davranış değişkenini temsil ettiği düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda, *desteksiz rearing* ölçümü yapılmamış olmakla birlikte yine Retr-3mg ve Retr-5mg gruplarında destekli *rearing* sayısı ve sıklığının anlamlı olarak düşük olması, diğer gruplarda tanınan olmayan ortamdaki anksiyetenin daha yüksek olduğunu bize düşündürmektedir (91). Bunun yanında bazı araştırmacılar *rearing* davranışını anksiyetenin artışıyla, bazıları da azalmasıyla ilişkili bulsa da genelde tek başına değil de, bizim çalışmamızdaki gibi diğer parametrelerle birlikte değerlendirilmesi uygundur (92).

Bağlamsal korku koşullanma deneylerine baktığımızda beklenilenin aksine, deneylerden 1 hafta önce yapılan LPS enjeksiyonu korku koşullanma testinde belleği bozmamıştır. Fidalgo ve ark.'nın (80) yaptığı bir çalışmada, farklı bir fare ırkı olan C57BL/6 farelere (12-14 haftalık) bizim kullandığımız dozdan daha düşük (0,1 mg/kg) LPS dozu uygulanmıştır. Bir gruba 1. gün LPS uygulanıp 2. gün elektroşok verilmiş ve 4. gün donma yanıtları ölçülmüş; diğer bir gruba 1. gün elektroşok verilip 2. gün LPS uygulanmış ve 4. gün donma yanıtları ölçülmüş; son gruba ise 1. gün elektroşok verilip 4. gün LPS uygulanmış ve 32. günde donma yanıtları ölçülmüştür. Her 3 deney düzeneğinde de LPS uygulanan gruplarda kontrol gruplarına göre anlamlı ölçüde düşük donma süreleri bulunmuştur. Buna göre bizim beklediğimiz düzeyde bir donma yanıtı elde edememizde, çalışmamızı Balb/c ırkı ve daha genç fareler kullanarak yapmamız ve deneylerden 1 hafta önce LPS uygulamış olmamız etken olabilir. LPS enjeksiyonu ile bellek bozukluğu oluşturulamadığından, AVE0991 verilerek bu bozukluğun değiştirilebilip değiştirilemeyeceğini test etmek de olanaksız hale gelmiştir. Ancak elde ettiğimiz veriler, AVE0991'in, LPS'den bağımsız olarak, bellek üzerine etkilerini gösterebilir. Bu nedenle, davranış deneylerinden elde edilen AVE0991 verileri bu yönde bir etkinin söz konusu olup olmadığını incelemek için kullanılabilir.

Edinim grubunda, 5 mg/kg AVE0991 alan grupta donma süresi istatistiksel anlamlı derecede azalmıştır. Bu durum, 5 mg/kg dozda AVE0991'in korku koşullanmanın edinim fazında belleği bozabilmesinden kaynaklanabileceği gibi, bir başka etkiden de kaynaklanabilir.

Şöyle ki, Wang ve ark. ACE2 reseptörü *overeksprese* edilmiş farelerde nontransgenik farelere göre ankiyete davranışının azaldığını, bu anksiyolitik davranışın Mas reseptör antagonisti A-779 ile bloke edildiğini bildirmiştir (93). Ayrıca yine yakın tarihli farklı çalışmalarda Ang-(1-7) ve Mas reseptörünün anksiyolitik etkileri olduğu saptanmıştır (94, 95). Öyleyse AVE0991'in donma davranışını azaltmasını bu yönden, korku belleğine etkiden ziyade, anksiyeteyi azaltmasının bir sonucu olarak yorumlamak da mümkündür. Bu anksiyolitik etki, açık alan testinde periferde ve merkezde geçirilen süre ölçümlerimizle uyushmaktadır. Açık alan testlerimizde sadece geri çağırma protokolündeki AVE0991 3 ve 5 mg/kg dozlarında merkezde geçirilen süre değerleri belirgin olarak daha fazla idi. Bu durum AVE0991 aracılı anksiyolitik bir etkiye işaret edebilir. Bu etkinin 1 mg/kg dozunda görülmemiş olması, söz konusu dozun bu etki için düşük bir doz olabileceği şeklinde yorumlanabilir. AVE0991 ile gözlenen bu etkinin, edinim ve konsolidasyon protokollerindeki doz gruplarında neden gözlenemediği sorusunu düşündürmektedir. Edinim ve konsolidasyon protokollerinde ilaç enjeksiyonlarının birinci gün testleri sırasında yapılması ve açık alan testinin ise ikinci gün deneylerinden sonra gerçekleştirilmiş olması nedeniyle, edinim ve konsolidasyon protokollerinde AVE0991'in benzer bir etki gösterememiş olduğu şeklinde yorumlanabilir. Sonuç olarak, AVE0991 3 ve 5 mg/kg dozlarında anksiyolitik bir etki oluşturmakla birlikte, bu etki ertesi gün yapılan açık alan testinde saptanabilecek kadar uzun ömürlü olmamıştır.

Önceki çalışmalarda AVE0991 molekülünün bellek üzerinde artırıcı etkisi tespit edilmiş fakat mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Biz bu çalışmadaki hipotezimizi, beyin ACE2/Ang-(1-7)/Mas ekseninin, klasik anjiyotensin dönüştürücü enzim/anjiyotensin 2/anjiyotensin reseptör tip-1 (ACE/Ang2/AT1R) ekseninin tam tersi şekilde etki gösterdiği görüşüne dayandırdık ve bu etkiler arasında antiinflamatuvar etki de mevcuttur. Beyinde klasik RAS ekseni aktivitesinin, A β birikimi, oksidatif stres, nöroinflamasyon gibi süreçlerden sorumlu olduğu, bu nedenle KBB'yi aşan perindopril gibi ACE inhibitörü (ACEİ) ilaçların AH üzerinde etkili olabileceği görülmüştür (96,97). Bunun yanında mevcut kanıtlar göstermiştir ki, bilişsel gerileme dahil olmak üzere çeşitli organ hasarlarına neden olan klasik RAS (cRAS) ekseni ile düzenleyici RAS olarak adlandırılabilen (rRAS) ACE2 /Ang-(1-7)/Mas ekseni birbirlerine karşı antagonistik etkiler uygularlar (4). cRAS aktivitesi, AH'de az aktif olan ve AH'deki patolojik işaretlerle ve santral sinir sistemi hastalıklarının hayvan modellerinde bilişsel düşüş ile güçlü bir şekilde ilişkili olan rRAS ekseni tarafından düzenlenir. Bununla birlikte, bilişsel işlevde rRAS'ın rolleri büyük ölçüde aydınlatılmayı beklemektedir ve bu nedenle bilişsel işlevde ACE2'nin olası rolleri nöroinflamasyon üzerinden incelenmiştir (10).

Her ne kadar inflamasyon üzerinde daha önce olumlu etkileri saptanmış olsa da (98), LPS enjeksiyonu ile hedeflediğimiz nöroinflamasyon indüksiyonunu gerçekleştiremediğimizden AVE0991'in nöroinflamasyon ve dolaylı olarak bellek üzerine olan etkisini inceleyebilmemiz mümkün olmamıştır. LPS enjeksiyonlarının nöroinflamasyon oluşturmaları ile ilgili olarak literatürdeki protokolün laboratuvarımızda başarılı bir şekilde tekrarlanamamasının olası nedenleri üzerindeki incelemelerimiz sürmektedir. Literatürde yer alan bir modelin benzer/aynı koşullar altında tekrarlanamamış olması, süreç boyunca bir veya birden fazla noktada gözden kaçan bir hataya bağlı olabilir. Bir başka açıklama ise, modelin tekrarlanabilirliğinin düşük olmasıdır. Pozitif sonuçların yayınlanma şansının çok daha yüksek olduğu konusu göz önünde bulundurularak, bizim yaşadığımız gibi başarısızlığa uğrayan denemelerin yayınlanma şansı bulma olasılığı düşüktür. Eğer bu ikinci açıklama geçerli ise, LPS enjeksiyonlarının nöroinflamasyon modeli olarak kullanılması düşüncesinin gözden geçirilmesi gerekecektir.

Davranış deneyleri sonrası hayvanlar sakrifiye edilerek, tüm beyin dokusu alınmıştır. Her ne kadar hafızadan sorumlu beyin bölgeleri çoğunlukla, hipokampus ve amigdala olarak görülse de Mas reseptörünün beyin tüm bölgelerinde yaygın olarak bulunduğu bilinmektedir (3). Biz de çalışmamızda tüm beyin dokusundan alınıp tartılarak üreticinin talimatlarına göre hazırlanan homojenatların ELISA ölçümlerine göre değerlendirme yapmaya çalıştık. Önceki çalışmalarda çoğunlukla LPS uygulamasından sonra ilk 24 saat içerisinde yapılan ELISA ölçümleri referans alınmıştır (83). Fakat Qin ve ark.'nın (99) çalışmamıza benzer şekilde erkek C57BL/6 farelerine intraperitoneal olarak LPS (5 mg/kg) enjekte ettikleri başka bir çalışmada, beyin dokusunda yapılan ELISA incelenmelerinde ilk 1 saatte pik yapan TNF-alfa değerlerinin, 10 ay boyunca bu yüksek seviyede kaldığı görülmüştür.

Çalışmamızda LPS enjeksiyonları TNF- α düzeyinde %50 civarında bir artış oluşturdu, ancak bu artış istatistiksel yönden anlamlı bulunmadı. Daha önce de belirtildiği üzere, TNF- α değerleri grup içinde büyük değişkenlik gösterdiğinden yüksek standart sapma değerlerine sahipti. Sınırlı kaynak nedeniyle örnek sayısının düşük tutulması da bu duruma katkıda bulunmuş olabilir. Bir başka açıklama da beyinde spesifik bir bölgede ölçüm yapmaktan ziyade tüm beyin ölçümlerinin tercih edilmesidir. LPS enjeksiyonları sonrasında TNF- α düzeylerinin daha yüksek bir artış göstermesini bekledik. Ancak, bulgularımız bu derecede yüksek bir düzey ortaya koymamıştır. Bu da az önce yukarıda sözü edildiği üzere, kullanılan modelin tekrarlanabilirliğinin düşük olmasından kaynaklanabilir.

Çalışmamızda edinim, konsolidasyon ve geri çağırma protokollerinde yer alan, çözücü grubu da dahil olmak üzere tüm gruplarda TNF- α düzeyleri, LPS grubuna kıyasla daha düşük

gerçekleşmiştir. Bazı gruplardaki düşme belirgin gibi görünmekle birlikte bunlar istatistiksel anlamlı düşüşler değildir. Bu nedenle yorumlarken dikkatli olmak gerekmektedir. Örnek sayısının daha fazla olması durumunda daha sağlıklı çıkarımlara ulaşmak mümkün görünmektedir.

Lipopolisakkarit enjeksiyonları IL-6 düzeyinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Aynı şekilde, IL-1 β düzeyinde de kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik oluşmamıştır. TNF- α , IL-6 ve IL-1 β değerlerinde beklenen yükselmenin gerçekleşmemiş olması, LPS enjeksiyonları ile başarılı bir şekilde nöroinflamasyonun oluşturulamadığına işaret etmektedir. Bu durum, davranış deneyleri için belirttiğimiz üzere, yöntemin başarılı bir şekilde tekrarlanamadığı anlamına gelmektedir. Bu tekrarlanamama durumunun nedenleri ile ilgili incelemelerimiz bu sorunun bizdeki teknik bir aksaklıktan mı yoksa deneyin tekrarlanabilirliğinin düşük olmasından mı kaynaklandığını gösterebilir. IL-6 değerleri, sadece konsolidasyon protokolünde 1 mg/kg AVE0991 grubu dışında incelenen gruplar arasında anlamlı bir farka işaret etmedi. Gözlenen bu anlamlı fark da gerek diğer (daha yüksek) doz düzeylerinde, gerekse diğer protokollerde uygulanan AVE0991 dozları ile benzer bir değişikliğin görülmemesi nedeniyle anlamlı bir duruma işaret etmemektedir. IL-1 β değerleri incelendiğinde de gruplar arasında herhangi bir fark gözlenmedi. Buna dayanarak, en azından AVE0991'in söz konusu parametreleri doğrudan değiştirici bir etkisi olmadığı yorumu yapılabilir.

Bildiğimiz kadarıyla Mas reseptör ve AVE0991 ile ilgili bu kadar detaylı ELISA testlerinin yapıldığı ve nöroinflamasyonun incelendiği başka çalışma yoktur. Biz bu çalışmada sonuç ne olursa olsun, AVE0991'in nöroinflamasyonla indüklenen AH modelindeki etkisini görmeyi özgün bir yoldan denemek istedik. LPS enjeksiyonları ile başarılı bir nöroinflamasyon oluşturulamamasının olası nedenleri üzerinde titiz bir çalışma yapmamız gerekecektir. Bu bağlamda kullandığımız yöntemler geliştirilebilir ve yeni çalışmalara evrilebilir. Örneğin ileride yapılacak çalışmalarda immünohistokimya yöntemiyle GFAP ve IBA-1 gibi mikrogial ve astrositer hücre belirteçleri araştırılabilir, ayrıca Western-Blot, real time PCR gibi moleküler yöntemler eklenebilir. ELISA yöntemi uygulanırken her bir kit 96 kuyucuktan oluştuğu için 6 örnekle sınırlandırılan n sayısı artırılabilir. Ayrıca AVE0991 uygulanan gruplara, öncesinde LPS uygulanmayan bir grup eklenerek, nöroinflamasyonsuz gruplarda da AVE0991'in etkisi karşılaştırılabilir. İmkanlar dahilinde AVE0991'in dozu artırılarak daha detaylı bir doz-yanıt sonucu da alınabilir.

SONUÇLAR

Alzheimer hastalığı, ortalama yaşam süresinin yükselmesiyle birlikte insidansı artan ve uzun yıllardır üzerinde çalışılan bir sorun olmasına rağmen, bu hastalığın kesin tedavisi ve mekanizması henüz keşfedilememiştir. En önemli patolojik göstergeleri amiloid β plakları, hiperfosforile tau ve nörofibriler yumak birikiminin bir arada bulunmasıdır. Oluşum hipotezleri arasında yer alan nöroinflamasyon hipotezi, bu konudaki önemli araştırma alanlarından biridir. Beyin RAS eksenini A β ile indüklenen nörodejenerasyon ve apoptozun yapısal katkılarından biri olarak son yıllarda AH başta olmak üzere birçok nörodejeneratif hastalık ile ilgili popülerleşen bir araştırma konusu olmuştur. Biz de çalışmamızda RAS ekseninde Mas reseptör agonisti olarak bulunan AVE0991 molekülünün lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen nöroinflamasyonda olası etkilerini incelemeyi amaçladık.

1. Davranış deneylerinden 1 hafta önce intraperitoneal yolla uygulanan 5 mg/kg dozundaki LPS enjeksiyonu ile bağlamsal korku koşullanma testinde beklediğimiz düzeyde donma süreleri elde edemedik. Bu anlamda oluşturmayı hedeflediğimiz bellek bozulması modeline ulaşamadık.
2. Bağlamsal korku koşullanma deneylerinin edinim, konsolidasyon ve geri çağırma aşamalarında, intraperitoneal olarak uygulanan 1, 3 ve 5 mg/kg dozlarında AVE0991'in, belleği beklediğimiz düzeyde etkilemediğini gördük.
3. AVE0991, açık alan testinde 3 ve 5 mg/kg dozunda, anksiyolitik etkiye işaret eden parametrelerde istatistiksel anlamlı sonuçlar sergiledi. Bu sonuçları sadece geri çağırma aşamasında görmemiz nedeniyle, AVE0991'in olası anksiyolitik etkisinin uzun süreli olmadığını, aynı gün içindeki uygulamalarda etkili olacağını düşündük.

4. LPS enjeksiyonu ELISA incelemelerinde sadece TNF- α düzeyinde yaklaşık %50 oranında bir artış oluşturdu, ancak bu artış istatistiksel anlamlı değildi. IL-6 ve IL-1 β düzeylerinde de beklenen ölçüde bir değişiklik görölmedi. Bu anlamda da LPS enjeksiyonu ile hedeflediğimiz nöroinflamasyon modeline ulaşamadık.
5. AVE0991, TNF- α , IL-6 ve IL-1 β düzeylerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadı. AVE0991'in uyguladığımız yöntem ve dozlarda, nöroinflamasyon ve bellek üzerinde anlamlı bir etki oluşturma açısından başarısız olduğu sonucuna ulaştık.



ÖZET

Alzheimer hastalığı için önemli etyolojik faktörlerden biri olduğu düşünülen nöroinflamasyon, bu hastalığın kesin tedavisinin anlaşılabilmesi için sıkça araştırma konusu olan bir durumdur. Son yıllarda dikkat çeken bir başka konu da beyinde ACE2/Ang-(1-7)/Mas şeklindeki düzenleyici RAS ekseninin bellek üzerindeki olumlu etkilerinin bilinmesi fakat mekanizmasının anlaşılabilmesidir. Çalışmamızda intraperitoneal lipopolisakkarit (LPS) (5 mg/kg) uygulaması ile farelerde nöroinflamasyon ve Alzheimer hastalığı (AH) benzeri bir süreç oluşturmak ve Mas reseptör agonisti AVE0991'in 1, 3 ve 5 mg/kg intraperitoneal dozlarının korku belleği ve nöroinflamasyon belirteçleri olan TNF- α , IL-6 ve IL-1 β düzeyleri üzerine etkisini incelemek amaçlanmıştır. LPS enjeksiyonundan 1 hafta sonra korku koşullanma testinde farelerin donma sürelerinde herhangi bir bozulma görülmemiştir. AVE0991 dozlarının korku belleğinde edinim, konsolidasyon ve geri çağırma aşamalarında bellek üzerine anlamlı bir etkisi saptanmamıştır. Nöroinflamasyon belirteçlerinin ELISA ölçümleri ile değerlendirilmesinde, LPS enjeksiyonu ile beyinde sadece TNF- α düzeyinde yaklaşık %50'lik bir artış görülmüş, IL-6 ve IL-1 β düzeylerinde fark edilir bir değişim gözlenmemiştir. TNF- α , IL-6 ve IL-1 β düzeylerinde AVE0991 dozları herhangi bir istatistiksel anlamlı değişiklik oluşturmamıştır. Sonuç olarak farelerde 5 mg/kg dozda intraperitoneal yoldan uygulanan LPS enjeksiyonlarının nöroinflamasyon ve buna bağlı olarak AH'dekine benzer bir süreç oluşturmada başarısız olduğu, AVE0991'in bellek ve TNF- α , IL-6 ve IL-1 β düzeyleri üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: ACE2, Mas reseptörü, bellek, nöroinflamasyon, lipopolisakkarit

INVESTIGATION OF THE POSSIBLE ROLE OF MAS RECEPTOR AGONIST AVE0991 IN A MODEL OF LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED IMPAIRED MEMORY IN MICE

SUMMARY

Neuroinflammation, which is thought to be the one of the important etiological factors for Alzheimer's disease, is a condition that is frequently the subject of research in order to understand the definitive treatment of this disease. Another interesting issue in recent years is that the positive effects of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas regulatory RAS axis on memory are known, but its mechanism is not understood. In our study, it was aimed to induce neuroinflammation and an Alzheimer's disease (AD)-like process in mice by intraperitoneal administration of lipopolysaccharide (LPS) (5 mg/kg), and to investigate the effects of 1, 3 and 5 mg/kg intraperitoneal doses of Mas receptor agonist AVE0991 on fear memory and on the levels of neuroinflammation markers (TNF- α , IL-6 and IL-1 β). In the fear conditioning test, no deterioration in the freezing times of the mice was observed 1 week after the LPS injection. There was no significant effect of AVE0991 doses on memory acquisition, consolidation and retrieval in fear memory. In the evaluation of neuroinflammation markers with ELISA measurements, only a 50% increase in TNF- α level was observed in the brain with LPS injection, and no noticeable change was observed in IL-6 and IL-1 β levels. AVE0991 doses did not produce any statistically significant changes in TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels. As a result, it was concluded that 5 mg/kg intraperitoneal LPS injections in mice failed to cause neuroinflammation and consequently a process similar to that in AD, and AVE0991 did not have a significant effect on memory and TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels.

Keywords: ACE2, Mas receptor, memory, neuroinflammation, lipopolysaccharide

KAYNAKLAR

1. Jiang T, Yu J-T, Tan L. Novel disease-modifying therapies for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2012;31(3):475-92.
2. Ashby EL, Kehoe PG. Current status of renin–aldosterone angiotensin system-targeting anti-hypertensive drugs as therapeutic options for Alzheimer's disease. *Expert Opin Investigational Drugs* 2013;22(10):1229-42.
3. Rukavina Mikusic N, Pineda A, Gironacci M. Angiotensin-(1-7) and Mas receptor in the brain. *Explor Med* 2021;2:268-93.
4. Wang X-L, Iwanami J, Min L-J, Tsukuda K, Nakaoka H, Bai H-Y, et al. Deficiency of angiotensin-converting enzyme 2 causes deterioration of cognitive function. *Npj Aging Mechanisms Dis* 2016;2(1):1-8.
5. Doobay MF, Talman LS, Obr TD, Tian X, Davisson RL, Lazartigues E. Differential expression of neuronal ACE2 in transgenic mice with overexpression of the brain renin-angiotensin system. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrat Comp Physiol* 2007;292(1):373-81.
6. Bennion DM, Haltigan E, Regenhardt RW, Steckelings UM, Sumners C. Neuroprotective mechanisms of the ACE2–Angiotensin-(1-7)–Mas axis in stroke. *Curr Hypertension Rep* 2015;17(2):1-10.
7. Costa-Besada MA, Valenzuela R, Garrido-Gil P, Villar-Cheda B, Parga JA, Lanciego JL, et al. Paracrine and intracrine angiotensin 1-7/Mas receptor axis in the substantia nigra of rodents, monkeys, and humans. *Mol Neurobiol* 2018;55(7):5847-67.
8. Xia H, Suda S, Bindom S, Feng Y, Gurley SB, Seth D, et al. ACE2-mediated reduction of oxidative stress in the central nervous system is associated with improvement of autonomic function. *PloS One* 2011;6(7):e22682.
9. Alenina N, Bader M. ACE2 in brain physiology and pathophysiology: evidence from transgenic animal models. *Neurochem Res* 2019;44(6):1323-9.

10. Evans CE, Miners JS, Piva G, Willis CL, Heard DM, Kidd EJ, et al. ACE2 activation protects against cognitive decline and reduces amyloid pathology in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2020;139(3):485-502.
11. Santos RA, Ferreira AJ. Pharmacological effects of AVE 0991, a nonpeptide angiotensin-(1–7) receptor agonist. *Cardiovascular Drug Reviews*. 2006;24(3-4):239-46.
12. Jiang T, Xue LJ, Yang Y, Wang QG, Xue X, Ou Z, et al. AVE0991, a nonpeptide analogue of Ang-(1-7), attenuates aging-related neuroinflammation. *Aging (Albany NY)* 2018;10(4): 645-57.
13. Mi X, Cao Y, Li Y, Li Y, Hong J, He J, et al. The Non-peptide Angiotensin-(1–7) Mimic AVE 0991 attenuates delayed neurocognitive recovery after laparotomy by reducing neuroinflammation and restoring blood-brain barrier integrity in aged rats. *Frontiers Aging Neurosci* 2021;13:624387.
14. Hauss-Wegrzyniak B, Dobrzanski P, Stoehr JD, Wenk GL. Chronic neuroinflammation in rats reproduces components of the neurobiology of Alzheimer's disease. *Brain Res* 1998;780(2):294-303.
15. Anaeigoudari A, Soukhtanloo M, Reisi P, Beheshti F, Hosseini M. Inducible nitric oxide inhibitor aminoguanidine, ameliorates deleterious effects of lipopolysaccharide on memory and long term potentiation in rat. *Life Sci* 2016;158:22-30.
16. Zhang J, Yu C, Zhang X, Chen H, Dong J, Lu W, et al. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide induces cognitive dysfunction, mediated by neuronal inflammation via activation of the TLR4 signaling pathway in C57BL/6 mice. *J Neuroinflammation* 2018;15(1):1-14.
17. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (Çeviri: Süzer Ö) Goodman & Gillman Tedavinin Farmakolojik Temeli. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi; 2009.
18. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2006;368(9533):387-403.
19. Bateman RJ, Aisen PS, De Strooper B, Fox NC, Lemere CA, Ringman JM, et al. Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Therap* 2011;3(1):1-13.
20. Freudenberg-Hua Y, Li W, Davies P. The Role of Genetics in Advancing Precision Medicine for Alzheimer's Disease-A Narrative Review. *Front Med (Lausanne)* 2018;5:108.
21. Román GC. A historical review of the concept of vascular dementia: lessons from the past for the future. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1999;13(3):4-8.
22. Liu C-C, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol* 2013;9(2):106-18.
23. Shi Y, Yamada K, Liddel SA, Smith ST, Zhao L, Luo W, et al. ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Nature* 2017;549(7673):523-7.

24. Hansen RA, Gartlehner G, Webb AP, Morgan LC, Moore CG, Jonas DE. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin Intervent Aging* 2008;3(2):211.
25. Huang LK, Chao SP, Hu CJ. Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease. *J Biomed Sci* 2020;27(1):18.
26. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992;256(5054):184-5.
27. Chen Y-G. Research progress in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Chinese Med J* 2018;131(13):1618-24.
28. Müller UC, Deller T, Korte M. Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat Rev Neurosci* 2017;18(5):281-98.
29. Mravec B, Horvathova L, Padova A. Brain under stress and Alzheimer's disease. *Cellular and Mol Neurobiol* 2018;38(1):73-84.
30. Crews L, Masliah E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 2010;19(1):12-20.
31. Chen JX, Yan SS. Role of mitochondrial amyloid- β in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2010;20(2):569-78.
32. Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int J Nanomed* 2019;14:5541.
33. Goedert M, Spillantini M, Cairns N, Crowther R. Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 1992;8(1):159-68.
34. Pooler AM, Noble W, Hanger DP. A role for tau at the synapse in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neuropharmacology* 2014;76:1-8.
35. Hanger DP, Lau DH, Phillips EC, Bondulich MK, Guo T, Woodward BW, et al. Intracellular and extracellular roles for tau in neurodegenerative disease. *J Alzheimers Dis* 2014;40(s1):S37-S45.
36. Zhang C, Saunders AJ. Therapeutic targeting of the alpha-secretase pathway to treat Alzheimer's disease. *Discovery Med* 2009;7(39):113-7.
37. Cassidy L, Fernandez F, Johnson JB, Naiker M, Owoola AG, Broszczak DA. Oxidative stress in alzheimer's disease: A review on emergent natural polyphenolic therapeutics. *Complementary Therap Med* 2020;49:102294.
38. Du X, Wang X, Geng M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl Neurodegener* 2018;7(1):1-7.
39. Hampel H, Mesulam M-M, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain* 2018;141(7):1917-33.
40. Ruitenberg A, Den Heijer T, Bakker SL, Van Swieten JC, Koudstaal PJ, Hofman A, et al. Cerebral Hypoperfusion and Clinical Onset of Dementia: the Rotterdam Study. *Ann Neurol* 2005;57(6):789-94.

41. Knopman DS, Roberts R. Vascular risk factors: imaging and neuropathologic correlates. *J Alzheimers Dis* 2010;20(3):699-709.
42. Bek A. Beta amiloid 1-40 ile indüklenen sıçan alzheimer modelinde anjiotensin 1-7'nin nikotinik ve glutamaterjik reseptör ekspresyonuna etkisi. (tez). Denizli: Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2019.
43. Elmazoğlu Z. Gluko-lipotoksisite ile indüklenmiş, amiloid- β -aracılı nörodejenerasyonda endokannabinoid sistemin rolünün değerlendirilmesi. (tez). Ankara: Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2020.
44. McGeer EG, Klegeris A, McGeer PL. Inflammation, the complement system and the diseases of aging. *Neurobiol Aging*. 2005;26(1):94-7.
45. Wood PL. Neuroinflammation: mechanisms and management: Springer Science & Business Media; 2002.
46. Tatar İ. Lipopolisakkaritle Oluşturulan Nöroinflamasyon Modelinde Pro-İnflamatuvar Sitokinlerin ve Yolaklarının Glia Limitans Üzerine Etkileri. (tez). Ankara: Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2019.
47. Guden DS, Temiz-Resitoglu M, Senol SP, Kibar D, Yilmaz SN, Tunctan B, Malik KU, Sahan-Firat S. mTOR inhibition as a possible pharmacological target in the management of systemic inflammatory response and associated neuroinflammation by lipopolysaccharide challenge in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2021 Sep;99(9):921-934.
48. Meneses G, Cárdenas G, Espinosa A, Rassy D, Pérez-Osorio IN, Bárcena B, et al. Sepsis: developing new alternatives to reduce neuroinflammation and attenuate brain injury. *Ann N Y Acad Sci* 2019;1437(1):43-56.
49. Walters A, Phillips E, Zheng R, Biju M, Kuruvilla T. Evidence for neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Progress Neurol Psychiatr* 2016;20(5):25-31.
50. Zakaria R, Wan Yaacob W, Othman Z, Long I, Ahmad A, Al-Rahbi B. Lipopolysaccharide-induced memory impairment in rats: a model of Alzheimer's disease. *Physiol Res* 2017;66(4):553-65.
51. Daulatzai MA. Fundamental role of pan-inflammation and oxidative-nitrosative pathways in neuropathogenesis of Alzheimer's disease in focal cerebral ischemic rats. *Am J Neurodegener Dis* 2016;5(2):102-30.
52. Miklossy J. Chronic inflammation and amyloidogenesis in Alzheimer's disease -- role of Spirochetes. *J Alzheimers Dis* 2008;13(4):381-91.
53. Abiodun OA, Ola MS. Role of brain renin angiotensin system in neurodegeneration: an update. *Saudi J Biol Sci* 2020;27(3):905-12.
54. Lind W, Swanson LW, Ganten D. Organization of angiotensin II immunoreactive cells and fibers in the rat central nervous system. *Neuroendocrinology* 1985;40(1):2-24.
55. Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* 2006;7(5):335-46.

56. Krause EG, Melhorn SJ, Davis JF, Scott KA, Ma LY, de Kloet AD, et al. Angiotensin type 1 receptors in the subfornical organ mediate the drinking and hypothalamic-pituitary-adrenal response to systemic isoproterenol. *Endocrinology* 2008;149(12):6416-24.
57. de Kloet AD, Krause EG, Shi PD, Zubcevic J, Raizada MK, Sumners C. Neuroimmune communication in hypertension and obesity: a new therapeutic angle? *Pharmacol Therapeut* 2013;138(3):428-40.
58. Cuadra AE, Shan Z, Sumners C, Raizada MK. A current view of brain renin–angiotensin system: Is the (pro) renin receptor the missing link? *Pharmacol Therapeut* 2010;125(1):27-38.
59. Wright JW, Harding JW. Contributions by the brain renin-angiotensin system to memory, cognition, and Alzheimer’s disease. *J Alzheimers Dis* 2019;67(2):469-80.
60. Yamada K, Uchida S, Takahashi S, Takayama M, Nagata Y, Suzuki N, et al. Effect of a centrally active angiotensin-converting enzyme inhibitor, perindopril, on cognitive performance in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Brain Res* 2010;1352:176-86.
61. Tanrıverdi LH, Özhan O, Ulu A, Yıldız A, Ateş B, Vardı N, Acet HA, Parlakpınar H. Activation of the Mas receptors by AVE0991 and MrgD receptor using alamandine to limit the deleterious effects of Ang II-induced hypertension. *Fundam Clin Pharmacol*. 2022 Sep 18.
62. Jiang T, Zhang Y-D, Zhou J-S, Zhu X-C, Tian Y-Y, Zhao H-D, et al. Angiotensin-(1-7) is reduced and inversely correlates with tau hyperphosphorylation in animal models of Alzheimer’s disease. *Mol Neurobiol* 2016;53(4):2489-97.
63. Silva MVBd, Sousa Júnior CPd, Silva HVCd, Santos VMd, Feijao FIM, Bernardino AdO, et al. Evaluation of the cardioprotective and antihypertensive effect of AVE 0991 in normotensive and hypertensive rats. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2022;68
64. Ho JK, Nation DA. Cognitive benefits of angiotensin IV and angiotensin-(1–7): a systematic review of experimental studies. *Neurosci Biobehav Rev* 2018;92:209-25.
65. Klein N, Gembardt F, Supé S, Kaestle SM, Nickles H, Erfinanda L, et al. Angiotensin-(1–7) protects from experimental acute lung injury. *Critical Care Med* 2013;41(11):e334-e43.
66. Wiemer G, Dobrucki LW, Louka FR, Malinski T, Heitsch H. AVE 0991, a nonpeptide mimic of the effects of angiotensin-(1–7) on the endothelium. *Hypertension* 2002;40(6):847-52.
67. Garelick MG, Storm DR. The relationship between memory retrieval and memory extinction. *Proceed Nat Acad Sci* 2005;102(26):9091-2.
68. Carneiro CF, Moulin TC, Macleod MR, Amaral OB. Effect size and statistical power in the rodent fear conditioning literature—a systematic review. *PLoS One* 2018;13(4):e0196258.
69. Cummings J, Lee G, Nahed P, Kambar MEZN, Zhong K, Fonseca J, et al. Alzheimer’s disease drug development pipeline: 2022. *Alzheimers Dement (NY)*. 2022;8(1):e12295.
70. Drew L. An age-old story of dementia. *Nature* 2018;559(7715):2-3.

71. Hodson R. Outlook Alzheimer's Disease. Nature Publishing Group Macmillan Building, 4 Crinan St, London N1 9XV, England; 2018. p. S1-S.
72. Long JM, Holtzman DM. Alzheimer disease: an update on pathobiology and treatment strategies. *Cell* 2019;179(2):312-39.
73. Kim S, Shin SJ, Park YH, Nam Y, Kim S-M, Jung ID, et al. Gram-negative bacteria and their lipopolysaccharides in Alzheimer's disease: pathologic roles and therapeutic implications. *Transl Neurodegener* 2021;10(1):1-23.
74. Pugh CR, Kumagawa K, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF, Rudy JW. Selective effects of peripheral lipopolysaccharide administration on contextual and auditory-cue fear conditioning. *Brain Behav Immun* 1998;12(3):212-29.
75. Thomson LM, Sutherland RJ. Systemic administration of lipopolysaccharide and interleukin-1 β have different effects on memory consolidation. *Brain Res Bull* 2005;67(1-2):24-9.
76. Batista CRA, Gomes GF, Candelario-Jalil E, Fiebich BL, De Oliveira ACP. Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation as a bridge to understand neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 2019;20(9):2293.
77. Yeh C-H, Hsieh L-P, Lin M-C, Wei T-S, Lin H-C, Chang C-C, et al. Dexmedetomidine reduces lipopolysaccharide induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. *PLoS One* 2018;13(1):e0191070.
78. Mohamed MY, Masocha W. Indomethacin augments lipopolysaccharide-induced expression of inflammatory molecules in the mouse brain. *Peer J* 2020;8:e10391.
79. Fidalgo AR, Cibelli M, White JP, Nagy I, Maze M, Ma D. Systemic inflammation enhances surgery-induced cognitive dysfunction in mice. *Neurosci Lett* 2011;498(1):63-6.
80. Fidalgo AR, Cibelli M, White J, Nagy I, Wan Y, Ma D. Isoflurane causes neocortical but not hippocampal-dependent memory impairment in mice. *Acta Anaesthesiologica Scand* 2012;56(8):1052-7.
81. Zhao J, Bi W, Xiao S, Lan X, Cheng X, Zhang J, et al. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Sci Rep* 2019;9(1):1-12.
82. Zhang X, Yan F, Feng J, Qian H, Cheng Z, Yang Q, et al. Dexmedetomidine inhibits inflammatory reaction in the hippocampus of septic rats by suppressing NF- κ B pathway. *PLoS One* 2018;13(5):e0196897.
83. Zhao X, Cao F, Liu Q, Li X, Xu G, Liu G, et al. Behavioral, inflammatory and neurochemical disturbances in LPS and UCMS-induced mouse models of depression. *Behavioural Brain Res* 2019;364:494-502.
84. Sun X-y, Li L-j, Dong Q-X, Zhu J, Huang Y-r, Hou S-j, et al. Rutin prevents tau pathology and neuroinflammation in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 2021;18(1):1-14.
85. Pinheiro SVB, Simoes e Silva AC, Sampaio WO, de Paula RD, Mendes EP, Bontempo ED, et al. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension* 2004;44(4):490-6.

86. Mo J, Enkhjargal B, Travis ZD, Zhou K, Wu P, Zhang G, et al. AVE 0991 attenuates oxidative stress and neuronal apoptosis via Mas/PKA/CREB/UCP-2 pathway after subarachnoid hemorrhage in rats. *Redox Biol* 2019;20:75-86.
87. Dang R, Yang M, Cui C, Wang C, Zhang W, Geng C, et al. Activation of angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin (1–7)/mas receptor axis triggers autophagy and suppresses microglia proinflammatory polarization via forkhead box class O1 signaling. *Aging Cell* 2021;20(10):e13480.
88. Duan R, Wang S-Y, Wei B, Deng Y, Fu X-X, Gong P-Y, et al. Angiotensin-(1–7) Analogue AVE0991 Modulates Astrocyte-Mediated Neuroinflammation via lncRNA SNHG14/miR-223-3p/NLRP3 Pathway and Offers Neuroprotection in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Inflammation Res* 2021;14:7007.
89. Sun X-Y, Zheng T, Yang X, Liu L, Gao S-S, Xu H-B, et al. HDAC2 hyperexpression alters hippocampal neuronal transcription and microglial activity in neuroinflammation-induced cognitive dysfunction. *J Neuroinflammation* 2019;16(1):1-17.
90. Pitzer C, La Porta C, Treede RD, Tappe-Theodor A. Inflammatory and neuropathic pain conditions do not primarily evoke anxiety-like behaviours in C57 BL/6 mice. *European J Pain* 2019;23(2):285-306.
91. Sturman O, Germain P-L, Bohacek J. Exploratory rearing: a context-and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress*. 2018;21(5):443-52.
92. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *JOVE* 2015(96):e52434.
93. Wang L, De Kloet AD, Pati D, Hiller H, Smith JA, Pioquinto DJ, et al. Increasing brain angiotensin converting enzyme 2 activity decreases anxiety-like behavior in male mice by activating central Mas receptors. *Neuropharmacology* 2016;105:114-23.
94. Almeida-Santos AF, Kangussu LM, Moreira FA, Santos RA, Aguiar DC, Campagnole-Santos MJ. Anxiolytic-and antidepressant-like effects of angiotensin-(1–7) in hypertensive transgenic (mRen2) 27 rats. *Clin Sci* 2016;130(14):1247-55.
95. Kangussu LM, Almeida-Santos AF, Moreira FA, Fontes MA, Santos RA, Aguiar DC, et al. Reduced anxiety-like behavior in transgenic rats with chronically overproduction of angiotensin-(1–7): role of the Mas receptor. *Behavioural Brain Res* 2017;331:193-8.
96. Wright JW, Kawas LH, Harding JW. A role for the brain RAS in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Front Endocrinol* 2013;4:158.
97. Messiha BA, Ali MR, Khattab MM, Abo-Youssef AM. Perindopril ameliorates experimental Alzheimer's disease progression: role of amyloid β degradation, central estrogen receptor and hyperlipidemic-lipid raft signaling. *Inflammopharmacology* 2020;28(5):1343-64.
98. Liu M, Shi P, Sumners C. Direct anti-inflammatory effects of angiotensin-(1–7) on microglia. *J Neurochem* 2016;136(1):163-71.
99. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 2007;55(5):453-62.



Ek 1



T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 2021/10

Karar Tarihi: 27.10.2021

Karar No: 2021.10.02

Hayvan Sayısı ve Cinsi: Fare 210 adet

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Çetin Hakan KARADAĞ'ın yaptığı, Arş. Gör. Dr. Dilşat ERÜMİT'in uzmanlık tezi olarak planlanan, TÜHADYEK-31 protokol no'lu, "**Farelerde lipopolisakkarit ile indüklenen bozulmuş bellek modelinde Mas reseptör agonisti AVE0991'in olası rolünün incelenmesi**" başlıklı çalışma isteği görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik ve Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Hakan ERBAŞ
Başkan
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒ yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Enis ULUÇAM
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒ yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Suat ERDOĞAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Y. Atakan SEZER
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Tevfik AKTOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒ yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Necdet SUT
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Elvan BAKAR
Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒ yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Filiz SANAL
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Dr. Öğr. Üyesi F. Gülfeşan ÇANAKÇI
Diş Hekimliği Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Vet. Hek. Kenan SELVİ
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒ yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

Ecz. F. Nigar GÜLER
Sivil Toplum
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

- KATILMADI -
Tarık AYKIZ
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Ek 2

Evrak Tarih ve Sayısı: 16.12.2021-E.172467



T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
İdari ve Mali İşler Daire Başkanlığı

Sayı :E-59803669-604.99-172467
Konu :Sözleşme

16.12.2021

Sayın Prof. Dr. Çetin Hakan KARADAĞ
Trakya Üniversitesi
Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Yöneticiliğini yapmış olduğumuz ve Arş. Gör. Dr. Dilşat ERÜMİT'in "Farelerde lipopolisakkarit ile indüklenen bozulmuş bellek modelinde Mas Reseptör agonisti AVE0991'in olası rolünün incelenmesi" başlıklı tıpta uzmanlık projesinin, 12 (on iki) ay süre ile desteklenmesine, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun 06.12.2021 tarih ve 2021/14 sayılı toplantısında mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi'nin 8. maddesinin 4. bendi uyarınca düzenlenen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Sözleşmesi'nin tarafınızca imzalanarak 1 (bir) hafta içinde Rektörlüğe iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Osman Nuri HATİPOĞLU
Rektör Yardımcısı

Ek:Protokol sözleşmesi (2 sayfa)

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :BSM6444STK Pin Kodu :54472

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/trakya-universitesi-oby>