

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARELERDE ALZHEİMER TİP
SPORADİK DEMANS MODELİNDE ASİT
DUYARLI İYON KANAL
EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ESİN ÖZ

Danışman: Yrd. Doç.Dr. Ebru ÖNALAN

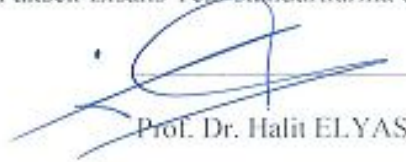
2014

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.


Prof. Dr. Halit ELYAS

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Ebru ÖNALAN

Danışman



Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Halit ELYAS

Yrd. Doç. Dr. Ebru ÖNALAN

Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve birikiminden faydalandığım, tüm bu süre zarfında göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı çok değerli hocam, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. M. Halit ELYAS'a, araştırma konumun belirlenmesi, tezimin hazırlanması sürecinde desteğini ve yardımını esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ebru ÖNALAN'a, eğitimim boyunca yardımını esirgemeyen Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Deniz EROL'a teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamım İmmünohistokimya ve Tunel yöntemini yapan Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Tuncay Kuloğlu' na ve asistanlarına, Western Blot Analizini yapan Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Mehmet Tuzcu ve asistanlarına teşekkür ederim.

Öğrenme Testinin analizlerini yapan Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziyojji A.D Öğretim Üyesi Arş. Gör. Ersen ERASLAN'a teşekkür ederim.

Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinde çalışan Lütfü, Veysel ve Suat Abilerime deney hayvanları çalışma süresince yardımlarını esirgemedikleri için teşekkür ederim.

Sevgili arkadaşlarım; Arş. Gör. Ahmet Tektemur, Seda Özaydın, Arş. Gör. İlay Buran, Arş. Gör. Betül Çelik, Özge Keleş, Uğur Özerk ve başım sıkıştığında her zaman yanımda olan lisans arkadaşım Solmaz Susam'a tez süresince yardımlarını esirgemedikleri için teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen, bugünlere gelmemde önemli pay sahibi olan sevgili aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİLLİSTESİ	viii
KISALTMALAR LİSTESİ	ix
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Alzheimer Hastalığı	6
3.1.1.Risk Faktörleri	7
3.1.1.1.Yaş ve Cinsiyet	7
3.1.1.2.Down Sendromu	7
3.1.1.3.Aile Öyküsü	8
3.1.1.4. Kafa Travmaları	9
3.1.1.5. Düşük Eğitim Düzeyi	9
3.1.1.6. Apolipoprotein E 4 aleli	9
3.1.1.7. Nörotoksinler	9
3.1.1.8. Tiroid Hastalıkları	9
3.1.2.Histopatolojik Özellikler	10
3.1.2.1. Amiloid plaklar	13
3.1.2.2. Nörofibriler yumaklar (NFTs)	14
3.1.2.3. Neuritik anomaliler	15
3.1.2.4. Sinaps kaybı	15
3.1.3. Alzheimer Hastalığı’nda Biyokimyasal Mekanizmalar	16
3.1.4. Alzheimer Hastalığında Klinik Tanı	21
3.1.4.1. Hafif Alzheimer Hastalığı	22
3.1.4.2. Orta Evre Alzheimer Hastalığı	22
3.1.4.3. Şiddetli Alzheimer Hastalığı	23

3.1.5. Alzheimer Hastalığında Tedavi	23
3.1.5.1. Asetilkolinesteraz (AChE) İnhibitörleri	23
3.1.5.2. Donepezil	23
3.1.5.3. Rivastigmin	24
3.2. İyon Kanalları	24
3.2.1. Ligand Kapılı İyon Kanalları	24
3.2.1.1. Nikotinik Asetilkolin Reseptörü (nAChR) Kanalı	24
3.2.1.2. Gamma-aminobutirik Asit (GABA) ve Glisin Reseptör Kanalları	25
3.2.1.3. Glutamat Reseptör Kanalları	25
3.2.2. Voltaj-Kapılı İyon Kanalları	25
3.2.2.1. Voltaj Kapılı Sodyum Kanalı	25
3.2.2.2. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalı	26
3.3. Asit Duyarlı İyon Kanalları	26
3.3.1. Asit Duyarlı İyon Kanalı 1	28
3.3.2. Asit Duyarlı İyon Kanalı 2	30
3.3.3. Asit Duyarlı İyon Kanalı 3	31
3.3.4. Asit Duyarlı İyon Kanalı 4	32
3.3.5.1. Nöropeptitler	33
3.3.5.2. Hayvan Zehirinden Peptit Toksinler	34
3.3.5.3. Organik Bileşikler	35
3.3.5.4. İki ve Üç Değerlikli Katyonlar	36
3.3.6. Nörodejeneratif Hastalıklarda Asit Duyarlı İyon Kanalları	37
3.3.6.1. ADİK1a Kanalları ve Multipl Skleroz	37
3.3.6.2. ADİK'ler ve Parkinson Hastalığı	37
3.3.6.3. ADİK'ler ve Huntington Hastalığı	38
3.3.6.4. ADİK'ler ve Alzheimer Hastalığı	38
3.3.6.5. ADİK'lerin Depresyonla İlgili Davranışları	39
3.3.6.6. ADİK'ler ve Anksiyete Hastalıkları	39
4. GEREÇ ve YÖNTEM	41
4.1. Çalışma Gruplarının Tanımı:	41
4.1.1. Beta-amiloid Grubu	41
4.1.2. Sham Grubu	42

4.1.3. Beta-amiloid + Amilorid Grubu	42
4.1.4. Kontrol Grubu	42
4.2. Morris Yüzme Testi (Morris Water Maze)	43
4.3. Kullanılan Aletler	45
4.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler	46
4.5. Kullanılan Yöntemler	47
4.5.1. Total RNA İzolasyonu	47
4.5.2. Spektrofotometrik RNA Ölçümü	48
4.5.3. Komplementer DNA Sentezi	48
4.5.4. Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Amplifikasyonu:	49
4.5.5. İmmünohistokimya	51
4.5.6. Tunel Yöntemi	53
4.5.7. Western Blot Analizi ile Protein Miktarının Ölçümü	54
4.6. İstatistiksel Değerlendirme	56
5. BULGULAR	57
5.1. Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyon Sonuçları	57
5.3. İmmünohistokimya Sonuçları	59
5.4. Tunel Sonuçları	60
5.5. Öğrenme Deneyi Sonuçları	61
6. TARTIŞMA	65
7. KAYNAKLAR	74
8. ÖZGEÇMİŞ	82

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Alzheimer hastalığı ile ilişkisi jesinleşmiş olan genler ve hastalık patogenesine ekileri.	16
Tablo 2. AβP geninin yanlış anlamlı mutasyonları	19
Tablo 3. Çalışmada kullanılan hayvan sayısı ve gruplar.	41
Tablo 4. cDNA karışım miktarı	49
Tablo 5. cDNA sentezi için uygulanan PZR programı	49
Tablo 6. RT-PZR’ da kullanılan primerler	50
Tablo 7. RT-PZR için her bir kuyucuğa konan bileşikler	50
Tablo 8. Uygulanan RT-PZR programı	51
Tablo 9. İmmünohistokimyasal boyama yöntemi	51
Tablo 10. İmmünohistokimyasal boyanma yaygınlığının derecesi	53
Tablo 11. TUNEL boyama prosedürü	53
Tablo 12. TUNEL boyama yaygınlığının derecesi	54

ŞEKİLLİSTESİ

Şekil 1.	AH’de sıklıkla etkilenen kortikal bölgeler	11
Şekil 2.	Amiloid β Protein molekülü	17
Şekil 3.	Amiloid öncül proteinin metabolik yolları.	18
Şekil 4.	Tau Metabolizması	20
Şekil 5.	Alzheimer hastalığındaki patolojik süreçler	21
Şekil 6.	A. ADİK alt ünitelerinin şematik gösterimi B.ADİK kanalın trimerik yapısı	27
Şekil 7.	CHO hücrelerinden eksprese olan ADİK 1a, 1b, 2a ve 3 kanalların tipik ADİK akımları.	29
Şekil 8.	ADİK 1a’nın Ca^{2+} geçirgenliği	29
Şekil 9.	Morris yüzdürme testi	43
Şekil 10.	Kontrol, sham, β -amiloid, β -amiloid+amilorid gruplarında ADİK1, ADİK2 ve ADİK3 iyon kanallarının mRNA kat artışı grafiği.	57
Şekil 11.	Kontrol, sham, β -amiloid, β -amiloid+amilorid gruplarının beyin homojen, zatlarındaki ADİK1, ADİK2 ve ADİK4 iyon kanallarının protein yoğunluğu.	58
Şekil 12.	İmmünohistokimyasal boyama sonuçları	59
Şekil 13.	Kontrol, sham, β -amiloid, β -amiloid+amilorid gruplarının beyin kesitlerinde yapılan TUNEL boyama.	61
Şekil 14.	Grupların Morris su tankı performansları.	62
Şekil 15.	Probe test; MWM 60 saniyelik süre boyunca hedef kadranda harcadığı zaman oranı.	63

KISALTMALAR LİSTESİ

AchE	: Asetilkolinesteraz İnhibitör
ADİK	: Asit Duyarlı İyon Kanalları
ADİK1	: Asit duyarlı iyon kanalı 1
ADİK2	: Asit duyarlı iyon kanalı 2
ADİK3	: Asit duyarlı iyon kanalı 3
ADİK4	: Asit duyarlı iyon kanalı 4
AH	: Alzheimer Hastalığı
ApoE	: Apolipoprotein E
APP	: Amiloid Prekürsör Protein
Aβ	: Amiloid β ta
AβP	: Amiloid β ta Proteini
°C	: Santigrad
cDNA	: Komplementer deoksiribonükleik asit
CTF-α	: C-teminal fragmanı- α
DEG/ENaC	: Degenerin/ Epitelyal Na ⁺ Kanal
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
gr/mol	: Gram/mol
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
nAChR	: Nikotinik asetilkolin reseptörü
NFTs	: Nörofibriler yumaklar
NFY	: Neokortikal Nörofibriler Yumak

nM	: Nanomolar
nmol	: Nanomol
PS1	: Presenilin 1
PS2	: Presenilin 2
RNA	: Ribonükleik asit
sn	: Saniye
μM	: Mikromolar

1. ÖZET

Alzheimer hastalığı (AH); nöron ve sinaps kayıpları nedeni ile ortaya çıkan progresif nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalığın etyopatogenezinde özellikle nöronlardaki sodyum iyonlarına geçirgen bazı iyon kanallarının önemli roller oynadıkları belirtilmektedir.

Asit Duyarlı İyon Kanalları (ADİK) amilorid duyarlı degenerin/ epitelyal Na⁺ kanal (DEG/ENaC) gen ailesinin üyesidir. ADİK'lerin ortak özelliği pH değişimlerine duyarlı olmalarıdır. ADİK1a, 2a, 2b ve 4 özellikle beyinde eksprese olmaktadır. Çalışmada amiloid beta ile indüklenen Alzheimer fare modelinde ADİK'lerin ekspresyonlarının beyin dokularında belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışma için Balb C ırkı fareler kullanıldı. Fareler beta-amiloid grubu (n=10), sham grubu (n=10), tedavi grubu (beta-amiloid +amilorid grubu; n=10) ve kontrol grubu (n=8) olmak üzere 4 ayrı gruba ayrıldı. ADİK1, 2, 3 ve 4'ün ekspresyonlarının belirlenmesi için bu kanallara spesifik olarak immünohistokimya, western blot ve Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-PZR) yöntemleri uygulandı. Beta amiloidin indüklediği apoptozisin tespiti için Tunel yöntemi kullanıldı.

RT-PZR analizi sonuçlarına göre kontrol grubu ile diğer gruplardaki ADİK 1,2 ve 3 gen ekspresyonları karşılaştırıldığında ekspresyondaki azalmanın istatistiki olarak anlamlı düzeyde olmadığı belirlendi (p>0.05). Western Blot analizlerinde kontrol ve sham grupları karşılaştırıldığında ADİK1 ve ADİK2 açısından gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık gözlenmezken, ADİK4 açısından Beta amiloid ve Beta amiloid+Amilorid gruplarında anlamlı bir artış olduğu belirlendi.

İmmünohistokimyasal boyama sonuçlarına göre, ADİK1 ve ADİK2 açısından gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı farklılık bulunmamasına rağmen ($p>0.05$) ADİK4'ün kontrol ile karşılaştırıldığında Beta amiloid grubunda anlamlı olarak arttığı belirlendi.

Gruplarda ADİK1 ekspresyonu açısından farklılık bulunmamasına rağmen AH'daki pH = 6.6 değerinde ADİK1'in aktive olabileceği gösterilmiştir. Sonuç olarak, ADİK4'ün ekspresyonundaki artış ve ADİK1'in aktive olmasıyla, hücre içerisindeki sodyum iyon düzeylerindeki artışla bu kanalların Alzheimer etyopatogenezinde önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer Hastalığı, Asit Duyarlı İyon Kanalları, Beta-amiloid peptit (1-42)

2. ABSTRACT

The Investigation of Acid Sensing Ion Channels (ASICs) Expression in a Model of Sporadic Dementia of Alzheimer's Type in Mice

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease occurring with the neuron and synapse loss. It is stated that etiopathogenesis of the disease play the important roles of especially sodium permeable ion channels in neurons.

Acid Sensitive Ion Channels (ASICs) are member of the amiloride-sensitive degenerin/epithelial Na⁺ channel (DEG / ENAC) gene family. Common properties of ASICs are sensitive to pH changes. ASIC 1a, 2a, 2b and 4 are especially expressed in the brain. In this study, we aimed to determine expression of ASICs in brain tissues in the amyloid beta induced mice Alzheimer model.

Balb C strain mice were used for the study. Mice were separated into 4 groups: Beta-amyloid group (n = 10), sham group (n = 10), treatment group (Beta-amyloid + amiloride group, n=10) and control group (n= 8). For the determination of ASIC1, 2, 3 and 4 expression were performed the immunohistochemistry, western blot and Real-time Polymerase Chain Reaction (RT- PCR) methods. For the detection of beta-amyloid-induced apoptosis were used Tunel method.

According to results of RT-PCR analysis when compared with control group, it is detected that decrease in ASIC 1, 2 and 3 expression of other group didn't significant as statistical. According to result of Western Blot analysis while in terms of ASIC 1 and ASIC 2 wasn't observed significant difference among groups as statistical, it was detected a significant increase in Beta amyloid and Beta amyloid + Amilorid groups.

The result of immunohistochemical stain showed that although there was no significant difference as statistical ($p>0.05$) between groups in terms of ASIC1 and ASIC2, it was determined a significant increase of ASIC4 in Beta amyloid group compared with control

Although there wasn't difference in terms of expression of ASIC1 in groups, it is showed that ASIC1 could be active at pH= 6.6 in AD. As a result, it is thought that ASICs may play a key role in AD etiopathogenesis by increasing level of intracellular sodium ion through the increase expression of ASIC4 and the activation of ASIC1.

Key Word: Alzheimer's Disease, Acid Sensing Ion Channels, Beta-amyloid Peptide(1-42)

3. GİRİŞ

Demans, günlük yaşam aktivitelerinin bozulmasına neden olan, davranışsal bozukluklarında eşlik ettiği, birden fazla entelektüel (kognitif) yetenek alanında kayıp ile birlikte giden nöropsikiyatrik bir antite olarak tanımlanabilir. Özellikle yaşlı bireylerde sık bir durumdur, yaşam süresinin giderek uzaması nedeniyle yaşlılıkla ortaya çıkan hastalıkların görülme sıklığı da giderek artmaktadır. Alzheimer Hastalığı kortikal demansların en sık görüleni ve en sık bilinenidir. Demans vakalarının yarısından çoğunu oluşturur. Tüm demansların %50-80'i Alzheimer hastalığıdır. Gelişmiş ülkelerde ölüm nedenleri arasında dördüncü sırada yer almaktadır (1).

Alzheimer hastalığı (AH); ilerleyici bellek bozukluğu ve kortikal disfonksiyon ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. Alzheimer hastalığının majör patolojik bulguları hücre dışı senil plaklar, hücre içi nörofibriler yumaklar ve jeneralize serebral atrofidir. Ayrıca kolinerjik sistem başta olmak üzere çeşitli nörotransmitter sistemlerde kayıplar, oksidatif stres, apoptoz ve nöroinflamasyon gözlemlenmektedir. AH; kalıcı ve ilerleyici bir hastalıktır ve güncel koşullarda kesin tedavisi yoktur (2).

Asit Duyarlı İyon Kanalları (ADİK) amilorid duyarlı degenerin/ epitelyal Na⁺ kanal (DEG/ENaC) gen ailesinin üyesidir. En az altı ADİK alt birimini kodlayan 4 gen klonlanmıştır. Her alt birimin büyük bir hücre dışı loop ve kısa hücre içi N- ve C-termini gibi 2 transmembran alanı vardır. Fonksiyonel ADİK'ler bu alt birimlerin trimerik kompleksleridir ve bu alt birimlerin çoğu homomerik ya da heteromerik kanallar oluşturabilir. 7 alt birimin en azından üçünün bulunduğu beyin nöronlarında ADİK'ler yoğun olarak bulunur (3). ADİK 1a, 2a, 2b ve 4

özellikle beyinde eksprese olmaktadır. ADİK1a nakaft farelerde yapılan deneylerde ADİK1a'nın sinaptik plastisite, öğrenme ve hafızanın temelini oluşturan bazı süreçlerde etkili olduğu gösterilmiştir (4). Bu süreçlerde görev alan genlerin Alzheimer hastalığına katkıda bulunduğu öngörülmektedir. Ancak ADİK'lerin Alzheimer hastalığında rollerinin ne olduğu tam olarak bilinmemektedir.

Çalışmada Alzheimer oluşturulan farelerin beyin dokularında ADİK'lerin ekspresyonlarının belirlenmesi ve ADİK'lerin beta amioid (1-42) indüklediği apoptotik süreçlerdeki görevlerinin araştırılması amaçlandı. Bu çalışma sonucunda elde edilecek veriler sonucunda; ADİK gen ailesinin Alzheimer'da beta-amiloid (1-42) aracılı apoptozisde görevli olup olmadıkları aydınlatılacaktır. ADİK'lerin Alzheimer hastalığının fare modelinde ekspresyonlarının değişip değişmediği ve yeni terapotik bir hedef olarak bu protein inhibitörlerinin etkinliğinin belirlenmesi sağlanacaktır.

3.1. Alzheimer Hastalığı

Dr. Alois Alzheimer'in 1906'da Tübingen'de yapılan 37.Güney Batı German Psikiyatrisler kongresinde ilk hastası Auguste D'yi sunup 1907 yılında yayınlamasından sonra hastalığa Alzheimer adını klinik şefi Dr.Emil Kraepelin vermiştir (5). Alzheimer Hastalığı (AH) bellek, konuşma, yüksek serebral işlevler ve görsel-uzaysal beceriler gibi birden çok sistemi etkileyen, bilişsel işlevlerde ilerleyici kayıp ile seyreden nörodejeneratif bir hastalıktır.

Alzheimer hastalığı (AH) klinik ve patolojik açıdan heterojen bir hastalıktır. Bellek kaybı, davranışsal değişiklikler, kognitif bozulma, neokortikal nörofibrillar yumaklar (NFY), ekstrasellüler nöritik plaklar ve nöronal ölüm gibi

karakteristik özelliklere sahiptir. Hastalık yaşı nüfus içinde görülen demans tiplerinin en yaygın olanıdır. Demansın önde gelen bulgularından biri hafıza (bellek) bozukluğudur. Yeni bilgiler edinme ve öğrenme yeteneği yakın hafızayla ilgilidir. Yaşlılığa bağlı plaklar, sinir lifleri yumaklarının birikimi, beynin hafıza ve öğrenme ile ilgili bölgesi hipokampus'tan başlar ve seneler içinde beynin hareket ve duyu alanları dışındaki bölgelerine yayılır. Hastalığın yaşı nüfusun çoğunlukta olduğu toplumlara getirdiği ekonomik ve sosyal yükün ortaya konduğu epidemiyolojik çalışmalar gelecekte dünyayı bekleyen tehlikeyi de bir anlamda açığa çıkarmaktadır (6).

3.1.1.Risk Faktörleri

3.1.1.1.Yaş ve Cinsiyet

Demans ve AH riski yaşla birlikte yoğun bir artış göstermektedir. Bu artışta, beynin yaşlanmasını etkileyen genetik ve çevresel faktörlerin önemli bir rolü vardır. Yaş ve genetik AH için en çok kabul edilen ve ispatlanmış risk faktörleridir. AH insidansı konulu iki çalışmada, hastalığın kadınlarda erkeklerden daha fazla olduğu bulunmuştur ama çalışmaların çoğunda erkekler ve kadınlar arasında insidansın eşit olduğu gösterilmektedir. Vasküler demansın erkeklerde kadınlardan daha sık olduğu görülmüştür. Bu bulgu muhtemelen damar hastalıklarının erkeklerde daha fazla oluşunu yansıtmaktadır (7).

3.1.1.2.Down Sendromu

Down Sendromlu hastalarda AH riskinin arttığı bilinmektedir. Down Sendromu olan yaşı insanların çoğunda AH patolojisi bulunmaktadır. Önceleri

yapılmış vaka kontrol çalışmaları bir araya getirilip analizleri yapılırken, Down Sendromu ile hem erken hem de geç başlangıçlı AH'nın ailesel birikim gösterdiği yönünde önemli veriler elde edilmişti. Down Sendromunu AH için ispatlanmış risk faktörleri arasında sayan yayınlar da mevcuttur. Toplumda AH frekansının, Down Sendromu frekansından belirli derecede daha yüksek olmasının sebebi, Down Sendromlu hastalarda ailesel demans öyküsü çalışmaları, daha yüksek istatistiksel güce sahiptir. Down Sendromu ve AH'daki ailesel kümeleşmenin en yoğun biçimde pozitif aile öyküsü bulunanlarda görülmesi nedeniyle genetik faktörlerinde olayda rol alma olasılığı bulunmaktadır. Çünkü AH patogeneğinde rol oynayan amiloid prekürsör protein (APP) 21'inci kromozomda kodlanmıştır ve trizomi 21 ise Down Sendromundan sorumludur (8).

3.1.1.3.Aile Öyküsü

Ailede birinci derecede yakınlarında Alzheimer hastalığı olanlarda, olmayanlara göre hastalığın görülme oranı 2-4 kat daha fazladır. Kalıtım, 70 yaşından önce başlayanlarda daha önemlidir (5).

3.1.1.4. Kafa Travmaları

Komaya sokacak tek kafa travması ve multipl kafa travmaları hastalığa yakalanma riskini artırır. Boksör travmaları olarak bilinen ‘punch drunk sendromu’ önemli algılama (kognitif) ve kişilik değişiklikleri yapmaktadır (9).

3.1.1.5. Düşük Eğitim Düzeyi

Düşük eğitim düzeyinin ileri yaşlarda hastalık için bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında eğitim düzeyinden bağımsız olarak fazla bilişsel aktivite gerektirmeyen işlerde çalışan düşük algılama fonksiyonlu kişiler Alzheimer hastalığı riskini taşırlar (5).

3.1.1.6. Apolipoprotein E 4 aleli

Normal popülasyonda bu allelin oranı % 16 civarında iken Alzheimer hastalığında sıklığı % 35- 50 arasında bulunmaktadır (5).

3.1.1.7. Nörotoksinler

Organik çözeltiler, endüstriyel boyalar ve metaller arasında ise alüminyumun yeri olduğunu bildiren çalışmalar vardır. Alüminyumun AH patogenezinde rolü olduğu hipotezi birbiriyle bağlantılı üç konuya dayanmaktadır: alüminyumun toksisitesi, AH’li hastaların beyinlerinde alüminyum düzeylerinin yüksek bulunması ve içme suyunda yüksek alüminyum düzeyleri olan coğrafi bölgelerde AH prevalansının daha yüksek olması (10).

3.1.1.8. Tiroid Hastalıkları

AH’da risk faktörleri konulu ilk araştırmalarda, hipotiroidili hastalarda riskin arttığı yönünde bazı veriler bulunmuştur. Ailesel AH’de otoimmün tiroid

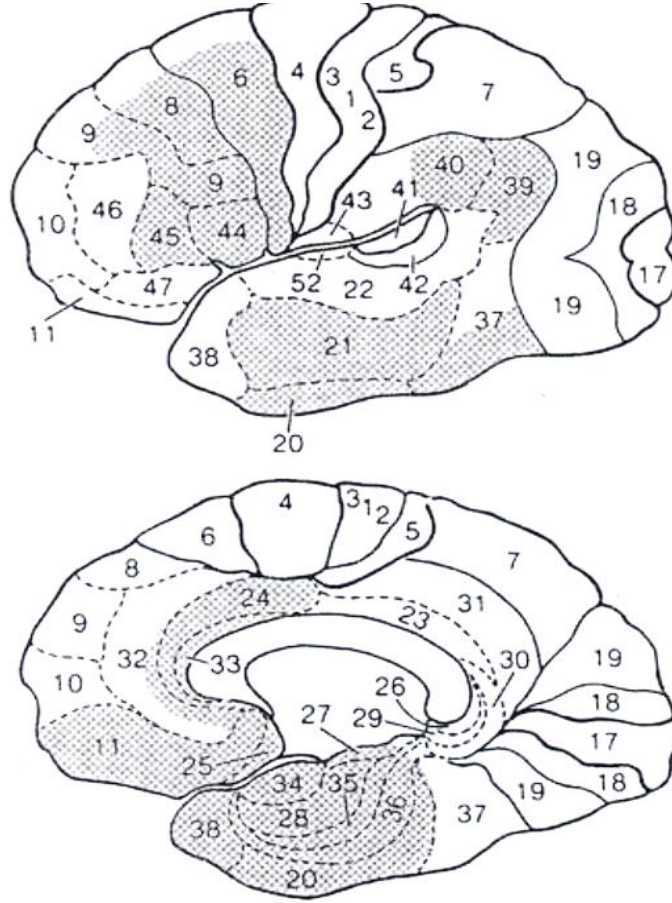
hastalığının yüksek yaygınlığa sahip olduğu ve bunun her iki hastalığında aynı kromozoma lokalize olmasıyla (21. Kromozom) ilişkili olduğu bildirilmiştir (11).

Bazı çalışmalarda, ileri anne yaşı, alkol kullanımı ve depresyon öyküsünün de AH risk faktörleri arasında olduğu belirtilmiş olmasına rağmen, bunların AH ile ilişkileri tartışılmaktadır. AH'nın oluşma riskini azaltan faktörler arasında, östrojen kullanımı ve non-steroid antiinflatuar ilaçlar yer almaktadır (12,13). Son yıllara kadar sigara kullanımının AH geliştirme riskini azalttığı bildirilmiştir (14). Sıçanlar ve tavşanlarda yapılan deneysel araştırmalarda nikotinin hafıza ve bilişsel fonksiyonları geliştirebileceği görülmüştür. İnsanlarda nikotinik reseptör fonksiyonlarının blokajı algılama bozukluğa yol açabilir ve klinik araştırmalarda nikotin ve nikotin türevlerinin AH olan kişilerde bilgi işleme ve dikkat özelliklerini geliştirilebileceği görülmüştür. Fakat hafıza ve algılama fonksiyonlarda gelişmeye ilişkin herhangi bir veri bulunmamaktadır (15).

3.1.2.Histopatolojik Özellikler

Alzheimer hastalığında beyin dokusunun histopatolojik değerlendirilmesi kesin tanı için gerekliyse de bugün modern radyolojik yöntemlerle %90'ın üzerinde tanı konabilmektedir. Makroskopik olarak beynin ağırlığı 900-1200g arasındadır. Alzheimer hastalarında serebral giruslarda düzleşme ve sulkuslarda genişleme gözlenir. AH'de genel olarak temporal lob (özellikle hipokampus) daha az olarak da frontal ve parietal loblar etkilenir. Oksipital lob ve motor korteks sağlamdır. Fakat bu atrofi paterni AH için spesifik karakterde değildir. Fikse edilmiş beyinden alınan örneklerde kortikal örtü oldukça incelmış görülür. Beyaz madde normal görünüm ve yapıdadır, fakat hacim olarak azalmıştır. Parankim

kaybına sekonder olarak ventriküler sistemde özellikle de lateral ventriküllerin temporal boynuzlarında genişleme görülür.



Şekil 1. AH’de sıklıkla etkilenen kortikal bölgeler (16)

Makroskopik olarak AH birkaç morfolojik anomalinin varlığıyla karakterizedir. Fakat bunlardan hiçbiri AH için spesifik değildir. Gözlenen major patolojik değişikliklerden biri plak diye adlandırılan spesifik amiloid depolanmasıdır. Bu normal bir nöronal membran proteini olan APP’den proteolitik yıkımla oluşan Amiloid beta ($A\beta$) peptid yapısında bir amiloiddir. İkinci major patolojik değişiklik nörofibriler yumak (NFTs) adı verilen intranöronal filamentöz inklüzyonlardır. Nörofibriler yumak; çiftli heliksel filament proteini (PHF) yapısından oluşur. Bu filamentin (PHF) temel yapısı mikrotübül bağlayıcı bir protein olan “tau”dur. Üçüncü major değişiklik ise

distrofik neuritler ve nörofil iplikçikleri (NTs) olarak adlandırılan nöronal yapıların distorsiyonudur. Bu yapılar da aynı şekilde tau içerir. Bir diğer major değişiklik serebral kortekste önce sinapsların kaybı ve daha sonraki aşamalarda ise nöron kaybıdır. Birçok vakada lektomenenks, serebral ve serebellar kortekste arter ve arteriyol duvarlarında çeşitli derecelerde A β peptid yapısında amiloid birikimi ile karakterize kongofilik arteriyopati gözlenebilir (17). Serebral amiloid anjiopatilerde A β peptid haricinde cystatin, prion proteini, transthyretin, gelsolin de gösterebilir.

Saptanan serebral infarktüsler veya hemorajiler genel olarak serebrovasküler amiloid depozisyonu ile ilişkilidir. Yapılan kontrollü çalışmalarda anjiopatinin, serebral iskemik enfarktüs gelişiminde risk faktörü olduğu bulunmuştur. Apolipoprotein E (ApoE)'nin rol oynadığı vasküler anomalilerin demans gelişiminde önemli etkisi olduğu ileri sürülmektedir. Bundan dolayı erken ve agresif müdahale vasküler etkilerin önlenme ve tedavisinde yararlıdır (18). AH'de yaşa bağlı gelişenden daha belirgin olmak üzere hipokampal piramidal nöronları etkileyen granülovakuolar dejenerasyon izlenebilir. Aynı görünüm subkortikal nükleuslarda da görülebilir. Subisulum ve hipocampal CA1 sahasındaki nöronlarda Hirano cisimcikleri (nöronlarda gözlenebilen parlak eozinofilik çubuksu görünümde veya eliptik sitoplazmik inklüzyon cismi) bulunabilir. Tüm nöronlarda lipofussin birikiminde artış izlenebilir. Geniş olarak A β peptidin amiloid filament veya nonfilamentöz formundan oluşan ekstrasellüler proteinöz depozitlerdir. Bunlar çeşitli derecelerde anomaliler gösteren nöronal yapılara benzer şekilde korpora amilasea (genel olarak astrositler içinde daha nadir olarak astrosit yapıların aksonlarında gözlenebilen küresel inklüzyonlar)

görünümünde artış görülebilir. AH'de görülen yapısal değişikliklerin tamamı; kognitif fonksiyonları normal olan yaşlı bireylerde sınırlı veya düşük yoğunlukta gözlenebilir. Bu nedenle AH tanısı klinik olarak belirgin demansı olan hastalarda; lezyonların yüksek yoğunlukta ve yaygın olmasına dayanır.

3.1.2.1. Amiloid plaklar

Anormal neuritler ile birlikte neuritik plak adını alan amiloid plaklar fokal, küresel, karışık görünümlü, gümüşle boyanan istrofik neuritlerin amiloid çekirdek yapıyı çevrelediği, sıklıkla şeffaf halojen yapılarıdır. Boyutları 20-200 µm arasında değişir. Çevrelerinde mikrogial hücreler ve reaktif astrositler bulunur. Ancak plaklar bazal ganglia, hipotalamus, orta beynin ve ponsun tegmentumu ve subkortikal beyaz madde de bulunabilirler.

Plak yapısının diffüz, pirimitif, klasik ve end stage olmak üzere dört farklı tipi vardır. Bu sınıflamada genel olarak plak oluşum sürecin diffüzden pirimitife klasik olarak devam ederek sonuçta end-stage plak haline geldiğine inanılır. Ancak bununla ilgili direkt kanıt mevcut değildir.

Çoğu neuritik plaklar tau ile immün reaktif distrofik neuritler içerirler. Bazıları ise bir lens proteini olan Ubiquitin ve Kromogranin A içerirler. Ancak bunlarda tau proteini yoktur.

Bu tip plaklar dışında immünohistokimyasal olarak ApoE, α 1-antichimotripsin, serum amiloid P proteini, büyüme faktör, heparin sülfat ve kompleman faktörleri gibi amiloid ilişkili proteinlerin de gösterilebildiği plaklar da vardır.

3.1.2.2. Nörofibriler yumaklar (NFTs)

Nöronal inklüzyonlar geniş oranda hiperfosforile tau proteinlerinin filamentöz agregatlarından meydana gelir. Hematoksileneosin boyalı preparatlarda intraselüler olanlar bazofilik, ekstrasellüler olanlar ise eosinofilik olarak gözlenir. Gümüşleme yöntemleri ve thioflavin S ile boyalı preparatlarda bu yapıların morfolojik formları ve evreleri saptanabilir. Elektron mikroskopik çalışmalarda; nörofibriler yumakların maksimum 20 nm çapında periyodik olarak her 80 nm'de 10 nm'ye daralan çiftli heliksel filamentlerden oluştuğu gösterilmiştir. Detaylı çalışmalarda bu iplikçiklerin dens bir kor etrafında kıvrık saç görünümünde oldukları izlenir. Bu filamentler immünohistokimyasal olarak fosforile tau ile gösterilebilir. Benzer şekilde nörofilament ile cross reaktivite gösterdikleri saptanmıştır. Az sayıda yumak ise ubiquitin ile immünreaktiftir.

Nörofibriler yumağın gelişiminde erken dönemlerde nöron içlerinde tau proteini vardır. Bu devrede çekirdek çevresinde tau proteininin birikimi immünohistokimyasal olarak gösterilebilir. Gelişim evresinde; tau proteinleri küçük düz filamentlerden oluşan çiftli heliksel filamentler şeklinde agregat haline gelir. Bazı tau proteinleri ubiquitine olur ve böylece ubiquitin ile immünohistokimyasal olarak gösterilebilir. Bu evrede gümüşleme yöntemi ile klasik yumaklar gösterilebilir. Geç evrede nöron ölür ve hücre artıkları lokal fagositlerce ortamdan uzaklaştırılır. Yumak yapıları eosinofilik ekstrasellüler mezar taşı ya da hayalet yumak şeklinde geride kalır. Bu yapı, zamanla tau protein reaktivitesini kaybeder ve astroglial yapılarla infiltre olur.

Nörofibriler yumaklar AH'de karakteristik olmasına rağmen spesifik değildirler. Progressif supranükleer palsy, postensefalitik Parkinson hastalığı ve

Guam’ın amiotrofik lateral skleroz-Parkinsonizm demans kompleksinde de görülebilir.

3.1.2.3. Neuritik anomaliler

İki formda incelenebilir. Birinci formda plak ilişkili distrofik neuritler anormal dilate sinir hücre yapıları boyunca A β plak depozitleri şeklinde dizilirler. Bazı neuritler artmış lizozom ile alakalı dens body içerirler. Fakat bunlarda çiftli heliksel filament yoktur. İmmünohistokimyasal olarak ubiquitin ve kromogranin A ile boyanabilirler ve tau ile reaktivite göstermezler. İkinci formdaki neuritler ise çiftli heliksel filament içerir. Ayrıca tau proteini ve çeşitli derecelerde ubiquitin ile immünreaktivite gösterirler. Nörofil iplikçikler ince, kıvrıntılı ve sinir hücre yapılarına sarılan, thioflavin S ya da gümüş boyasıyla gösterilebilen, tau proteini ve kısmen de ubiquitin ile immünohistokimyasal olarak boyanan yapılardır. Elektron mikroskopik çalışmaları sinir hücresinin bu yapılarının, düz ve çiftli heliksel filamentlerin karışımını içerdiğini göstermiştir.

3.1.2.4. Sinaps kaybı

Golgi çalışmalarında dendritik spin kaybı ile birlikte kortikal nöronların dentritik kollarında azalma şeklinde gösterilmiştir. AH’de etkilenmiş kortikal bölgelerde; sinaps bağımlı proteinlerle kantitatif olarak gösterilebilen % 30-50 arasında sinaps kaybı görülebilir. Sinaptik veziküller ile ilişkili bir glikoprotein olan sinaptofizin sinaps kaybını göstermede faydalıdır. Sinaptik kayıp klinik olarak demansın derecesi ile alakalıdır (16).

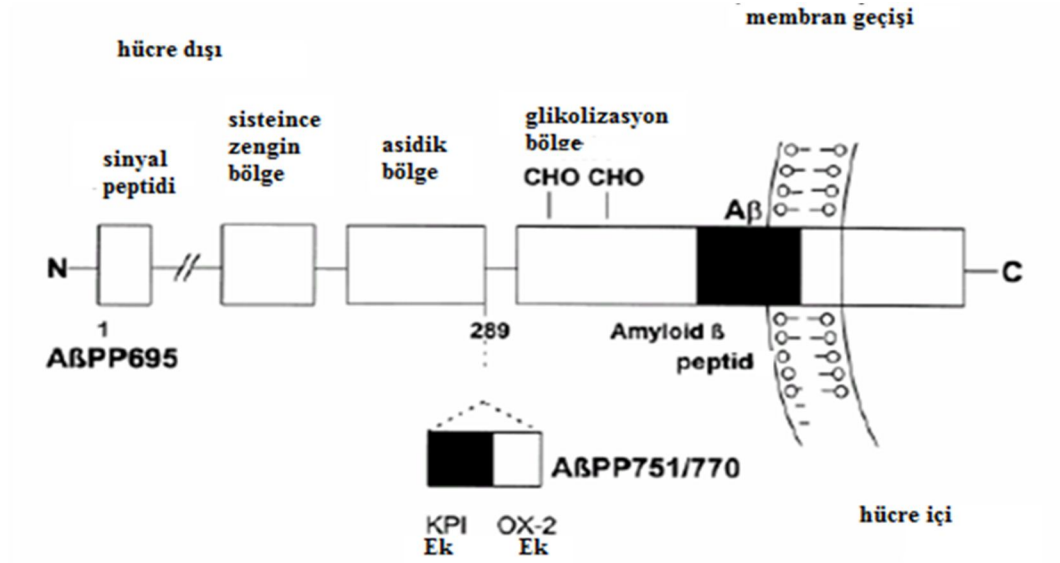
3.1.3. Alzheimer Hastalığı'nda Biyokimyasal Mekanizmalar

Alzheimer hastalığının genetik faktörlerle ilişkisi incelenmiş ve hastalıkla ilgisi olan dört kromozom belirlenmiştir (19) (Tablo1). Erken Başlangıçlı AH'larında kromozom 1, 14 ve 21; Geç Başlangıçlı AH'larında Kromozom 19'un rolü olduğu görülmüştür. Amiloid Prekürsör Protein (APP) geni 21. kromozom üzerinde Down Sendromu (Trizomi 21) bölgesine yakın lokalizasyonda bulunur. Bu nedenle 50'li yaşlara kadar yaşayabilen Down sendromlu kişilerde AH ortaya çıkabilir. Ailesel AH'na en spesifik olarak Presenilin 1(PS1), presenilin 2(PS2) ve APP gibi membran katedici proteinleri kodlayan genlerdeki "missense" mutasyonlarının sebep olduğu görülmüştür (20,21). Kısa bir süre önce 19.kromozom üzerinde ApoE ε4 adlı bir genin ileri yaşta başlayan AH ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. ApoE ε4 geni günümüzde birçok araştırmacı tarafından risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Genin, hastalığa olan duyarlılığı arttırdığı düşünülmektedir (22).

Tablo 1. Alzheimer hastalığı ile ilişkisi kesinleşmiş olan genler ve hastalık patogenezine ekileri.

Gen (protein)	Kromozom bölgesi	Kalıtım şekli	Patogeni k mutaiyon sayısı	Ortalama başlangıç yaşı (aralık)	AH patogenezine etkisi
APP (β-amiloid prekürsör)	21q21.3	Otozomal dominant	18	51.5) yıl (65-60)	Aβ ₄₂ /Aβ ₄₀ oranında artış; mutasyonlar γ-sekretaz bölgesine yakın
PS1 (presenilin 1)	14q24.3	Otozomal dominant	142	44.1 yıl (24-60)	Aβ ₄₂ /Aβ ₄₀ oranında artış; γ-sekretaz aktivitesi için gerekli
PS2 (presenilin 2)	1q31-42	Otozomal dominant	10	57.1)11.(46-71)	Aβ ₄₂ /Aβ ₄₀ oranında artış; γ-sekretaz aktivitesi için gerekli (?)
APOE (apolipoprotein E, E4-alelli)	19q13.32	Kompleks (risk artışı)	-	Başlangıç yaşını düzenliyor	Aβ agregasyonunda artış; Lipid/kolesterol transport mekanizmasıyla (?)

Senil plak olarak bilinen plakların yapısında yer alan Amiloid β Proteinlerinin ($A\beta P$) hastalığın oluşmasında önemli role sahip olduğu düşünülmektedir. Amiloid terimi birçok farklı hastalıkta bulunan hücre dışı protein depoları için kullanılmaktadır. Genellikle bu proteinler nişasta da olduğu gibi iyot ile mavi renge boyandığı için amiloid ismi verilmiştir.

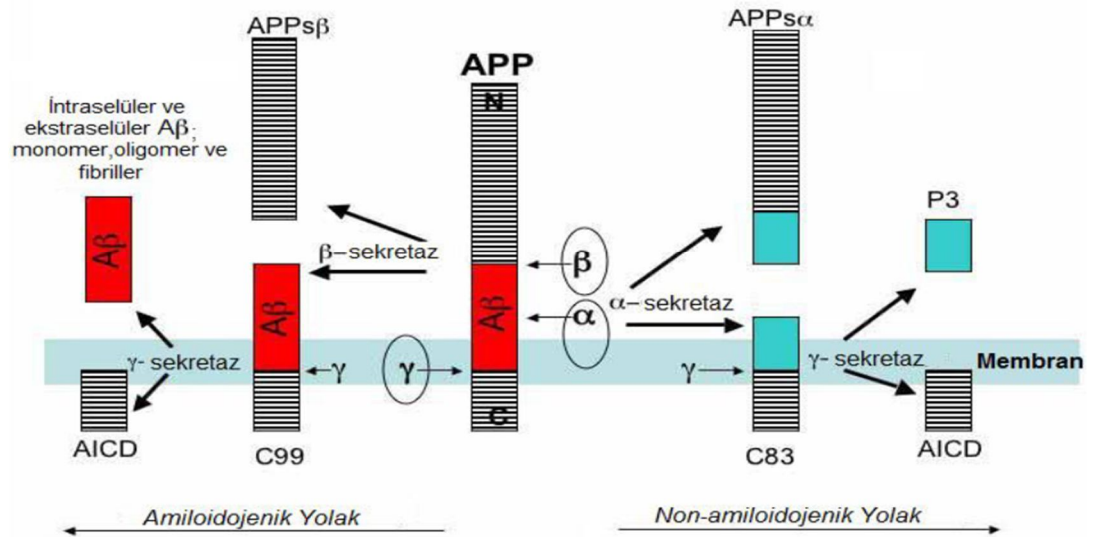


Şekil 2. Amiloid β Protein molekülü (31)

“Amiloid Kaskat Hipotezine” göre $A\beta P$ birikimi patolojik değişikliklerin başlıca nedeni iken nörofibriler yumaklar ve vasküler değişiklikler sekonder nedenlerdir. $A\beta P$ nöronal hücre ölümüne ve sinaptik kayba sebep olduğu için hastalığın patogenezinin primer olarak sorumludur (23). β -Amiloid protein birikimi inflamatuvar (24,25), oksidatif (26) ve nörotoksik kaskat (27) mekanizmalarını tetikleyerek hasara neden olur. $A\beta P$ ’in prekürsörü Amiloid Prekürsör Proteindir. APP yaklaşık 770 aminoasite sahip bir transmembran proteinidir. $A\beta P$ ise APP’nin C terminal ucundan proteolitik olarak ayrılmış 39-42 aminoasitlik bir peptiddir. APP’nin yıkımından sorumlu proteinaz enzimleri başlıca alfa(α), beta(β) ve gama(γ) sekretazlar olarak üçe ayrılmaktadır (28,29). β

ve γ -sekretazın rol oynadığı süreç amiloidojenik yolak , α ve γ -sekretazın rol oynadığı süreç non-amiloidojenik yolak olarak adlandırılır (Şekil 3). APP'nin α -sekretaz ile kesimi sonucu çözülebilir APP (sAPP α) adı verilen ekstraselüler parça ve membrana bağlı C-terminal fragmanı- α (CTF- α) meydana gelir. sAPP α 'nın nöroplastisitede rol oynadığı, nöroprotektif ve nörotrofik etkilerinin bulunduğu görülmüştür. CTF- α 'nın γ -sekretaz ile kesimi sonucu da p3 fragmanı oluşarak hücre dışına salınır. Geride kalan kısım tekrar γ -sekretaz ile kesilir ve amiloid hücre içi bölge (AICD) sitoplazmaya salınır. AICD; Ca^{+2} sinyalizasyonunun düzenlenmesinde ve gen ekspresyonunda rol oynar.

APP'nin β -sekretaz ile kesimi sonucu akson büyümesini inhibe eden sAPP β fragmanı hücre dışına bırakılır. Membrana bağlı CTF- β fragmanının γ -sekretaz ile kesimi sonucu çoğunlukla A β (1-40), daha az oranda da toksik form olan A β (1-42) fragmanı oluşur (30).



Şekil 3. Amiloid öncül proteinin metabolik yolları (30).

Bazı Alzheimer vakalarında APP'nin C-terminal kısmında mutasyonlar tespit edilmiştir (Tablo 2). (örneğin; kalıtsal-erken başlangıçlı Alzheimer

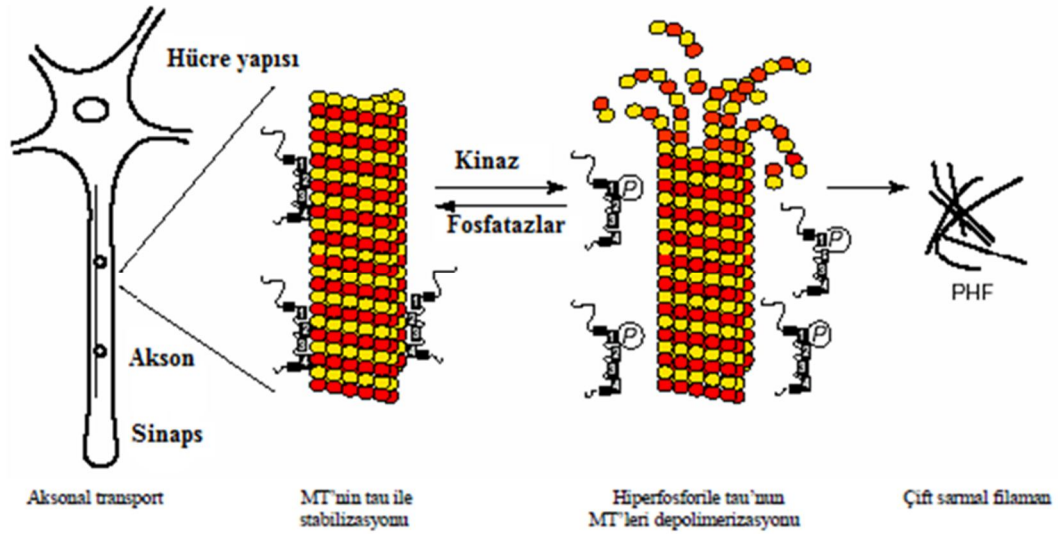
hastalarında kodon 693 deki mutasyonlar veya ailesel tipteki kodon 717 mutasyonları gibi). Bu mutasyonların AβP içeren fragmantların oluşmasında rol oynarken, AβP'nin proteolitik yıkımdan korunmasını da sağlayarak yüksek bir olasılıkla AβP birikimini arttırdığı gösterilmektedir.

Tablo 2. AβP geninin yanlış anlamlı mutasyonları (32)

Kodon	Mutasyon	Fenotip
665	Gln→Asp	Geç başlangıçlı AH-segregasyon yok
670\671	Lys→Met→Asn→Leu	Ailesel AH; Aβ üretiminde artma
673	Ala→Thr	Herhangi bir hastalık fenotipi yok
692	Ala→Gly	Ailesel AH+ beyin kanaması; Aβ'da artış
693	Glu→Gly	Geç başlangıçlı AH-segregasyon yok
	Glu→Gln	HCHWA-D
713	Ala→Val	Şizofreni-segregasyon
	Ala→T	HR AH-segregasyonu yok
716	Ile→Val	Ailesel AH
	Val→Ile	Ailesel AH; uzun Aβ izoformlarında artış
	Val→Phe	Ailesel AH
	Val→Gly	Ailesel AH

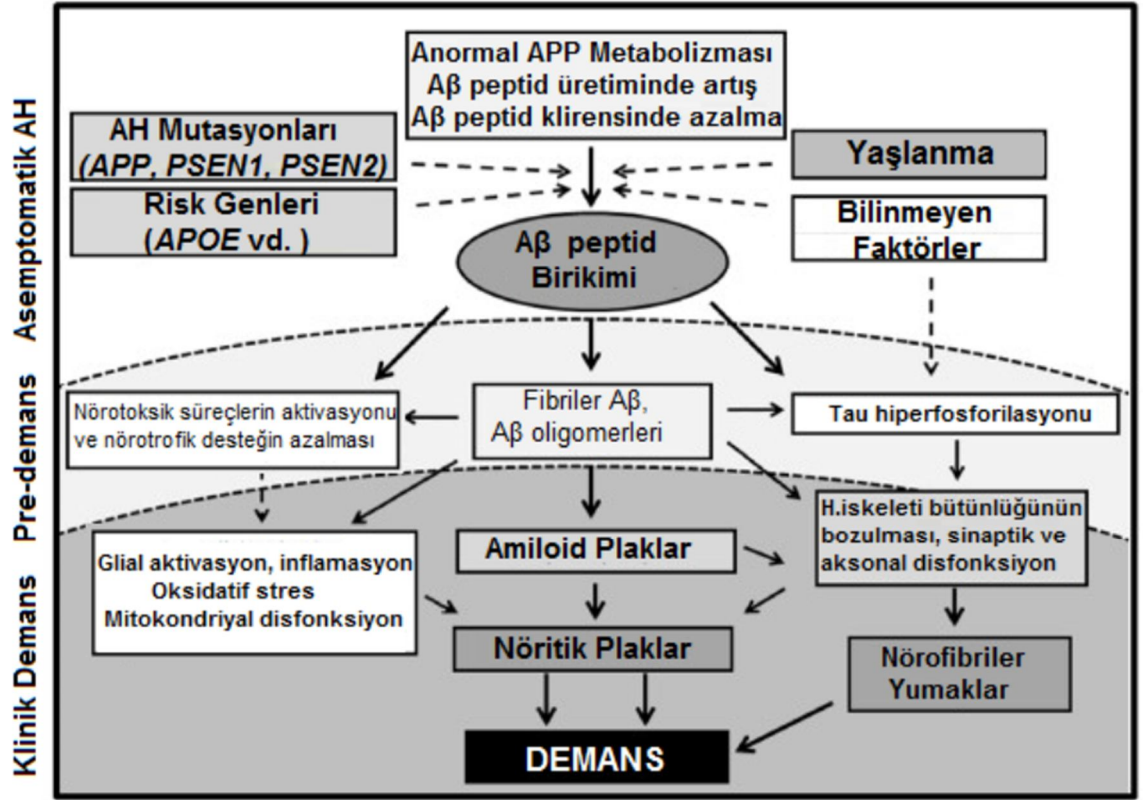
Amiloid-kaskat hipotezine göre AβP veya AβP kapsayan fragmantın kendisi direkt veya dolaylı yollardan nörotoksik etki göstermektedir. AβP aracılı nörotoksisite mekanizmasında; oksidatif stres, serbest radikal oluşumu, Ca^{+2} homeostazının bozulması, apoptozisin indüklenmesi, yapısal hasar, kronik inflamasyon ve nöronlarda amiloid por oluşumu faktörlerinin tümünde rol oynadığını savunan görüşler vardır (33). Özellikle nöronlarda Ca^{+2} homeostazının bozulması nörodejenerasyonda başlıca rolü oynar (34). Artmış Ca^{+2} konsantrasyonlarının Tau'nun fosforilasyonunda görevli protein kinazların aktivasyonu aracılığıyla tau'nun hiperfosforilasyonuna neden olarak nörofibriler

yumakların yapısındaki çift sarmallı flamanın oluşumuna sebep olurlar. Nörofibriler lezyonları oluşturan nörofibriler yumaklar ve nöropil iplikler nöron boyunca heterojen tarzda dağılmış olmalarına karşın, primer olarak çift sarmallı flamanlardan ve daha az oranda düzgün flamanlardan oluşmaktadır. Çift sarmallı flamanla oluşumunda görev alan tau proteini merkezi ve periferik sinir sistemi boyunca ağırlıklı olarak sinir hücrelerinin aksonlarında mevcuttur. Polimerize formda mikrotübüllere (MT) bağlandığı ve onları stabilize ettiğinden dolayı, "mikrotübül asosiye proteinler" (MAP) olarak bilinen bir protein ailesine aittir. İn vitro çalışmalar, Mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK), Glikojen sentetaz kinaz 3 (GSK 3), ve Siklin-bağımlı kinaz 5'in (cdk 5) serin/treonin-prolin amino asitleri aracılığıyla tau'yu fosforile ettiklerini görülmüştür (35,36).



Şekil 4. Tau Metabolizması (37)

Hiperfosforile haldeki tau, mikrotübüllerde depolimerizasyona sebep olarak tübüllerin stabilizasyonlarının bozulmasına ve hücre iskeleti yapısında morfolojik dejenerasyona neden olur.



Şekil 5. Alzheimer hastalığındaki patolojik süreçler (38).

3.1.4. Alzheimer Hastalığında Klinik Tanı

İlk belirtiler sinsli olarak başlar, hastalığın başlama zamanını kesin olarak bilmek mümkün değildir. Belirtiler silik ve belirsiz olup, başlamadan progresif yıkım senelerce sürer. İlk belirtiler ilgisizlik, isteksizlik ve unutkanlıktır. Alzheimer hastalığı hafif, orta ve şiddetli olmak üzere üç evreye ayrılır.

Hastalığın başlangıç evreleri de göz önüne alınırsa bu evreleri altıya çıkarmak mümkündür.

- 1- Preseptomatik dönem
- 2- Preklinik dönem
- 3- Çok erken (olası) Alzheimer hastalığı
- 4- Hafif dönem
- 5- Orta dönem
- 6- Şiddetli dönem

Preseptomatik, dönemde patolojik bulgular başlamıştır. Klinik bulgu yoktur. Ayrıntılı nöropsikolojik testlerde de bir bozukluk saptanmaz.

Preklinik, dönemde ise ancak nöropsikolojik testlerle ortaya konulan bellek başta olmak üzere diğer kognitif testlerde bir bozulma vardır.

3.1.4.1. Hafif Alzheimer Hastalığı

Hastalığın semptomları belirginleşir. Yakın geçmişte olan olaylar ve konuşulanlar hatırlanmaz. Hafif evredeki hastalar çok önemli günlük olayları hava durumunu, ev adreslerini doğrulukla hatırlarlar. Kognitif bozukluklarına rağmen sosyal ilişkilerini bağımsız olarak sürdürürler. Hesaplama, alet kullanma, para işlemleri, alışveriş gibi işlevlerde bozukluk gösterirler. Kelime bulmada zorluk, duraklayarak konuşma, bulunamayan kelimenin yerine başkasını söyleme gibi lisan bozukluğu ortaya çıkar. Eşyaları kaybetme, yerini bulmada zorluk olabilir. Ev hanımları ev işlerinde zorluk çekerler.

3.1.4.2. Orta Evre Alzheimer Hastalığı

Orta evrede hastalar toplum içinde günlük yaşam işlevlerini yerine getirmek için başkalarının yardımına ihtiyaç duyarlar. Belirgin ruhsal reaksiyonları kızgınlık ve şüpheciliktir. Bellekte de defisitler ortaya çıkar ve oryantasyon etkilenir. Basit hesaplamalar bile yapılamaz olurken yakın geçmişte olan olaylar hatırlanmaz ve yanlış hatırlamalar olabilir. Uzak bellek bozulmuştur. Günlük yaşamda temel aktiviteler bozulurken bakımlarını sürdürmekte zorlanırlar.

3.1.4.3. Şiddetli Alzheimer Hastalığı

Şiddetli evredeki hastalar yaşamları boyunca devamlı bakıma ve yardıma gereksinim duyarlar. Bakıcılarını tanıyamaz kendilerini besleyemez ve yardımsız yürüyemez dünyadan habersiz duruma gelirler. Konuşmaları kısıtlanır, birkaç kelimeden ibaret hale gelir. Bu durum mutizmle sonlanır. Konuşmanın kaybolduğu devrede hastanın bağımsız hareketide kaybolur. En sonunda yatağa mahkûm hale gelir (5).

3.1.5. Alzheimer Hastalığında Tedavi

Alzheimer hastalığının ancak semptomatik tedavisi günümüzde mümkündür. İlk olarak kolinerjik sistemle ilgili tedavilerden bahsedecek olursak Alzheimer hastalığında beyindeki asetilkolin (Ach) miktarı azalmıştır. Beyindeki asetilkolin miktarını artırmaya yönelik tedavi stratejileri; asetilkolinesteraz inhibitörleri (AChE) ve kolinerjik agonistler olarak iki ana gruba ayrılabilir.

3.1.5.1. Asetilkolinesteraz (AChE) İnhibitörleri

Alzheimer hastalığı için spesifik endikasyonla onaylanmış bir tek ilaç grubudur. Kognitif fonksiyonlar, günlük yaşam aktiviteleri ve davranışsal semptomlar da olumlu etkilere sahiptir. Bugün kullanılan AChE inhibitörleri takrin, rivastigmin, donepezil ve galantamindir. Bu ilaçlar yalnızca Alzheimer hastalığı için kullanılır ve diğer grup demanslarda geçerliliği yoktur. İleri evre hastalarda etkin değildirler.

3.1.5.2. Donepezil

Türkiye’de ilk ruhsatlandırılan preparattır. Reversibl asetilkolinesteraz inhibitörüdür, nöron için spesifiktirler ve karaciğerde metabolize olurlar. Oral

yararlanımı%100'e yakındır ve yarılanma ömrü 70 saattir. Günde tek doz kullanılabilir.

3.1.5.3. Rivastigmin

Ülkemizde ruhsatlandırılan ikinci preparatdır. Psödoirreversibl AchE inhibitörüdür ve butirilkolintransferazı da bir miktar inhibe eder. Böbrek yolu ile atılır. Kolinergik agonistler etkiler ve yan etkiler bakımından henüz deneysel aşamadadırlar (39) .

3.2. İyon Kanalları

İyon kanalları, membranın lipid çift tabakasını kesen ve bu tabaka boyunca iyonların hareketini kolaylaştıran makromoleküler protein komplekslerdir. Membranda 3-5Å° çapta delikler oluşturarak iyonlar hareketini bu delikler sayesinde gerçekleştirirler. Her biri farklı bir gen tarafından kodlanan farklı alt birimlerden oluşan iyon kanallarının ligand (nörotransmitter) kapılı ve voltaj kapılı olmak üzere iki ana alt sınıfı vardır.

3.2.1. Ligand Kapılı İyon Kanalları

3.2.1.1. Nikotinik Asetilkolin Reseptörü (nAChR) Kanalı

Omurgalılarda bulunan nAChR'ler, kas hücrelerinin postsinaptik kanallarıdır. Doğrudan nörotransmitterlerle açılırlar. Kası destekleyen sinirin elektriksel olarak uyarılması fazla sayıda nAChR ile birleşmeye yetecek kadar asetilkolin salınmasına neden olur. Kanalların açılması sodyum ve potasyum iyonlarının akışında değişikliğe neden olur ve depolarizasyon meydana gelir. Sonuçta voltaj-kapılı kanallar açılır ve kas kasılır. Bu kanallara nikotinik denmesinin sebebi nikotini de bağlanma özelliğinde olmalarıdır. nAChR'ler

pentamerik proteinlerdir. Alt üniteleri α (2 adet), β , γ ve δ zincirleri içerir. ACh'nin bağlanma bölgeleri α zincirlerde lokalizedir.

3.2.1.2. Gamma-aminobutirik Asit (GABA) ve Glisin Reseptör Kanalları

Memeli merkezi sinir sisteminde hızlı inhibitör iletim, GABA veya glisin reseptörlerindeki klora duyarlı kanalların açılmasını gerektirir.

3.2.1.3. Glutamat Reseptör Kanalları

Glutamaterjik iletim, öğrenme ve bellek oluşumlarında rol oynayan uzun süreli değişikliklerde görevlidir.

3.2.2. Voltaj-Kapılı İyon Kanalları

Voltaj-kapılı iyon kanalları büyük, geniş bir gen ailesinin üyeleridir. Bu ailedeki birçok iyon kanalı membran depolarizasyonunacevap olarak açılır ve yüksek derecede voltaja bağımlılık gösterir. Bu sınıftaki iyon kanalları Voltaj-kapılı Na^+ ve K^+ kanallarıdır. Voltaj-kapılı katyon kanalları aynı yapısal özelliklere sahiptirler. Voltaja bağımlı hızlı inaktivasyon mekanizması, N-terminal halka yapısında bulunur.

3.2.2.1. Voltaj Kapılı Sodyum Kanalı

Voltaj kapılı sodyum kanalları instrinsik nöron ve kas uyarılabilirliğinin kilit araçlarıdır. Sıçan beynindeki sodyum kanalları temel büyük bir α alt birim ve iki küçük yardımcı alt birime ($\beta 1$ – $\beta 4$) sahiptirler. Epilepsi, migren, nörodejeneratif hastalıklar ve nöropatik ağrı gibi nörolojik hastalıkta sinirsel uyarıla bilirlkte bozulmalar mevcuttur. Bu hastalıklarda voltaj-kapılı sodyum

kanallarının etkili olabileceğine dair kanıtlar vardır ve sayıları gittikçe artmaktadır.

3.2.2.2. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalı

Kalsiyum kanalları birçok omurgasız kasları ve omurgalıların düz kaslarında voltaj kapılı depolarizasyonun tamamından sorumludur ve omurgalıların kalp kasında aksiyon potansiyelinin plato fazı boyunca depolarizasyonu sağlamakla görevlidir. Birçok kas ve salgı hücresinde ve sinir uçlarında kalsiyum iyonu derişimini kontrol etmekte kritik önemleri vardır. Ayrıca, ikincil haberci oldukları için, kalsiyum iyonlarının membran potansiyelini etkileyebilecek başka hücre içi kontrol mekanizmalarını da kontrol etme özelliğine sahiptirler (40) .

3.3. Asit Duyarlı İyon Kanalları

İlk Asit duyarlı iyon kanalları (ADİK) 90'lı yıllarda klonlanmış ve Michel Lazdunski grubu tarafından proton kapılı kanallar olarak tanımlanmıştır. ADİK'ler amilorid duyarlı degenerin/ epitelial sodyum (Na^+) kanal (DEG/ENaC) süper ailesinin üyesidir. ADİK üyeleri "X-NaC" şeklinde isimlendirilir. Örneğin; ENaC, FaNaC, dGNaC, BLINaC ve hINaC

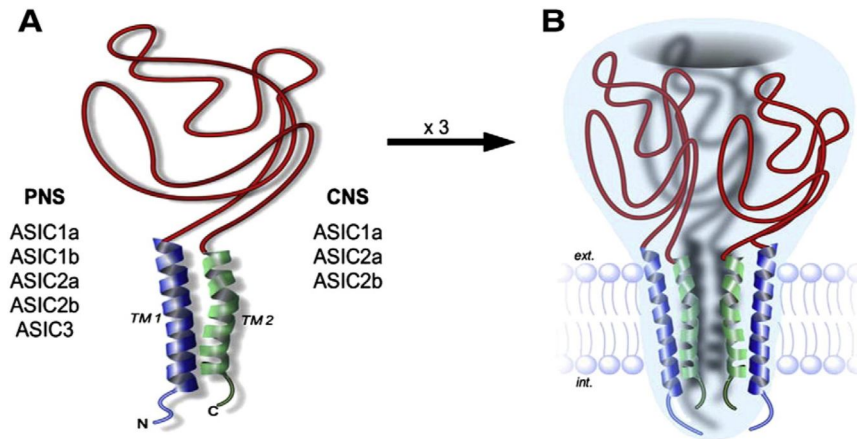
"C" kısaltması 'kanal' anlamında, "X" kısaltması proteinlerin temel bir özelliğiyle (DEG, degenerin protein) ilgili olduğu anlamına gelir.

- ENaC; epitel Na^+ kanalı,
- FaNaC; FMRF amide(Phe-Met-Arg-Phe-NH₂) kapılı Na^+ kanalı
- dGNaC; Drosophila gonadlarda bulunan Na^+ kanalı
- hINaC; insan bağırsağındaki Na^+ kanalı

- BLINaC; beyin, karaciğer ve bağırsaklarda bulunan Na^+ kanalı

İyon seçicilik dizisinde Na^+ kanalları farklılık gösterdiğinden dolayı ADİK'lerin isimlendirilmesi hala kesin değildir. ADİK'ler şimdiye kadar omurgalılar içinde tespit edilmiştir. Tek bir ADİK geni, Chordate phylum en alt dalı olan Urochordate, *Ciona intestinalis* genomunda bulunmuştur. Ayrıca ADİK'ler çenesiz omurgalılar (bofa balığı), kıkırdaklı balıklar (köpekbalığı), kemikli balıklar (kurbağa ve zebra balığı), tavuk ve farklı memelilerden klonlanmıştır (41) .

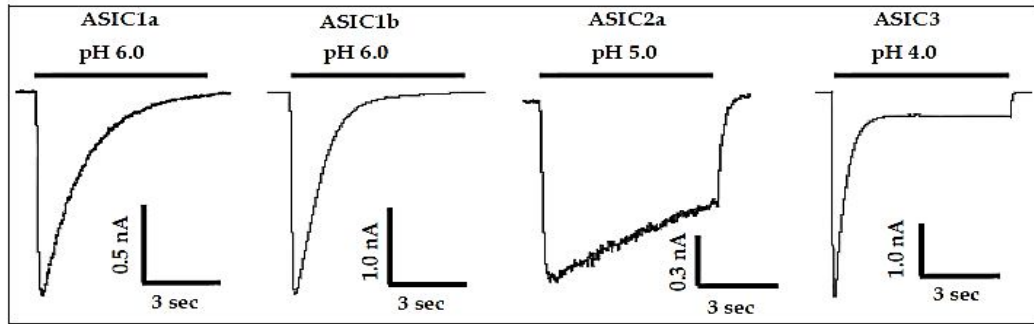
Kemirgenlerde 4 farklı gen tarafından kodlanan (ACCN1-4) en az 6 ADİK alt birimleri (ADİK1a, ADİK1b, ADİK2a, ADİK2b, ADİK3, ADİK4) tarif edilmiştir. Her ADİK alt birimleri, büyük bir ekstraselüler loop ve kısa intraselüler N- ve C-termini gibi iki hidrofobik transmembran bölgeye (TM1 ve TM2) sahiptir. Şekil'de ADİK'lerin tipik yapısı ve membran yerleşimi gösterilmiştir (42).



Şekil 6. A. ADİK alt ünitelerinin şematik gösterimi B. ADİK kanalın trimerik yapısı (42)

ADİK'ler baskın biçimde sinir dokusunda ekspre olurlar. Çeşitli memelilerin beyinlerin aynı anda birden fazla yerde ekspresyonu olmasına rağmen glia hücrelerinde ekspresyonu görülmez. ADİK'ler tüm duyu gangliyonlarında bulunur, otonom sinir sistemleri tarafından farklı organları düzenler. ENaC/DEG, epitel ve sinir sisteminin her yerinde vardır. Memelilerde merkezi sinir sistemi ve periferel sinir sistemi arasında ADİK alt tiplerinin dağılımı vardır; ADİK1a, ADİK2a ve ADİK2b periferel sinir sistemi ve merkezi sinir sistemi ekspresyonu vardır fakat ADİK1b ve ADİK3 duysal nöronlarda ekspresyonu görülür. İnsan ve rat ADİK'leri homologtur (4).

ADİK'lerin elektrofizyolojik özellikleri heterolog sentezleme sistemleriyle ve korteks, hipokampus, striatum, serebellum, retinal ganglion, omurilik gibi farklı beyin bölgelerinin nöronlarında araştırılmıştır (Şekil 7) (3) .

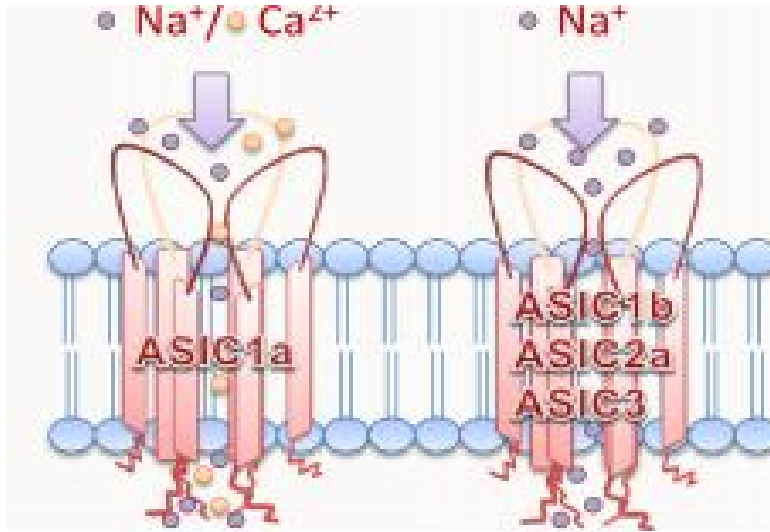


Şekil 7. CHO hücrelerinden eksprese olan ADİK 1a, 1b, 2a ve 3 kanallarının tipik ADİK akımları gösterilmiştir (3) .

3.3.1. Asit Duyarlı İyon Kanalı 1

Asit duyarlı iyon kanalı 1 (ADİK1), insanda kromozom 12'de lokalizedir. 12 ekzona sahiptir ve 574 amino asit kodlar. ACCN2, ADİK, BNaC2 gibi alternatif adlarda kullanılır. Farede ise kromozom 15'te lokalizedir. 12 ekzona sahiptir ve 526 amino asit kodlar. Accn2, ADİK, BNaC2, A1843610, ADİK1a, B53000N02Rik gibi alternatif adlarda kullanılır.

ADİK1 memeli merkezi sinir sisteminde en fazla bulunan ADİK alt birimidir. Buna ek olarak hidrojen affinitesi en yüksek olan ADİK'tir. ADİK1 geninin ADİK1a ve ADİK1b olmak üzere iki varyantı vardır. ADİK1b insan genomunda mevcuttur ancak insanlarda ADİK1b için açık kanıt bulunmamaktadır. ADİK 1b transkript varyantıdır ve dorsal kök ganglionlarında baskın olarak eksprese olur. Duyusal transdüksiyonda rol oynadığı düşünülmektedir. Tüm ADİK'ler arasında kalsiyum geçirgenliği nedeniyle homomerik ADİK1a kanalı özellikle ilginçtir. Oysaki diğer homomerik veya heteromerik ADİK'ler kalsiyuma karşı büyük oranda geçirgen değildir. Ca^{2+} geçirgenliğinden dolayı nöron ölümünde rol oynar (41, 43). Şekilde ADİK 1a'nın Ca^{2+} geçirgenliği gösterilmiştir.



Şekil 8. ADİK 1a'nın Ca^{2+} geçirgenliği(43)

Acı duyusunu sağlayan ADİK1a, merkezi sinir sisteminde sinaptik plastisitede, öğrenme/hafıza, korku durumunda, retinal fizyolojide önemlidir. Aktivasyonu voltaj kapılı kalsiyum kanalları, glutamat reseptörleri ve intraselüler kalsiyum ile olur. Homomerik ADİK1a kanalları yarı-maksimal aktivasyon (pH50) için 6.2 ile 6.8 arasında bir pH değerine sahiptir (44,45,46). Her ne kadar

nöronlardaki tam ADİK konfigürasyonu belirsiz olsa da, homomerik ADİK1a ve heteromerik ADİK1a/2 kanalları beyin nöronlarındaki başlıca komponentlerdir (47, 48, 49).

Kemirgenlerde ADİK1a'yı ADİK1b'den ayıran özellikler aşağıdaki gibidir:

1. ADİK1a ve ADİK1b proteinlerin yaklaşık 2/3'nün amino asit dizileri aynı olmasına rağmen N-terminalinin (yaklaşık 172 amino asit) 1/3'ü önemli farklılık gösterir. Bu diziler; intraselüler N-terminali, birinci transmembran alanı (TM1) ve dış bölgenin proksimal kısmını içerir(50, 51).
2. ADİK1a merkezi sinir sisteminde ekspre olurken, ADİK1b ekspresyonu periferel duyu nöronlarıyla sınırlıdır.
3. Kemirgenlerde ADİK1a kanalları önemli Ca^{2+} geçirgenliğine sahipken ADİK1b'de Ca^{2+} geçirgenliği yoktur. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda insanlarda ADİK1b kanallarının Ca^{2+} geçirgenliğe sahip olduğu gösterilmiştir (52).
4. ADİK1b akım aktivasyonu için eşik değeri yaklaşık 6.5 iken ADİK1a'nın 7.0'dır. ADİK1b'nin pH50 değeri de ADİK1a'da 5.9'dur.
5. Psalmopoeus cambridgei Toxin 1 (PcTx1) ADİK1a için spesifik bir inhibitör iken ADİK1b'de aktivatördür.

3.3.2. Asit Duyarlı İyon Kanalı 2

Asit duyarlı iyon kanalı 2 (ADİK2), insanda kromozom 17'de lokalizedir. 10 ekzona sahiptir ve 563 amino asit kodlar. ACCN, ACNN1, ADİK 2a, BNC1, MDEG, hBNaC1, BNaC1 gibi alternatif adlarda kullanılır. Farede ise kromozom

11'de lokalize olup 10 ekzona sahiptir ve 563 amino asit kodlar. Accn1, ACIC2, BNaC1, BNC1, RP23-397J5.1, BNaC1a, Mdeg gibi alternatif adlarda kullanılır.

İki tane ADİK 2 bağlantı varyantı tanımlanmıştır; ADİK 2a ve ADİK 2b'dir. ADİK2b subunitlerin pre-TM1 bölgesindeki 9 amino asit iyon seçiciliği ve geçirgenliğinin düzenlenmesinde görevlidir. ADİK2a subunitlerin pre-TM2 bölgesi pH duyarlılığı ve geçitleme için gereklidir. Bağlantı varyantları NH₂-terminal sekansında farklılık gösterirken ekstraselüler alan ve COOH terminal bölgelerini ortak paylaşırlar. ADİK2a ve ADİK2b beyin, ekşi tat reseptörleri ve dorsal kök ganglionları gibi benzer dokularda sıklıkla lokalize bulunurlar. ADİK2a, retina bütünlüğünün onarımı, baroreseptör duyarlılığı ve küresel iskemideki nöronların hayatta kalması için gereklidir. Homomerik ADİK2a kanalları 4.4'lük pH50'ye sahip protonlara nispeten duyarsızdır (53, 54, 55). Ancak ADİK2a alt birimleri ADİK1a ile birleşerek beyinde heteromerik kanallar oluştururlar (47, 48, 49, 56). Homomerik ADİK2b alt birimleri kendi kendilerine fonksiyonel kanallar oluşturmazlar fakat heteromültimerik kanallar oluşturmak için diğer ADİK alt birimleriyle birleşebilirler (55, 57, 58). Örneğin ADİK2b fonksiyonel kanallar oluşturmak için ADİK1a ile birleşerek asidoz kaynaklı nöronal hasarlanmalara katkıda bulunur. ADİK2b diğer ADİK'lerle beraber heteromerik kanalları düzenleyerek proton tutmaya katkıda bulunur (57).

3.3.3. Asit Duyarlı İyon Kanalı 3

Asit duyarlı iyon kanalı 3 (ADİK3), insanda kromozom 7'de lokalizedir. 10 ekzona sahiptir ve 543 amino asit kodlar. ACCN3, DRADİK, TNaC1,SLNAC1 gibi alternatif adlara sahiptir. Farede kromozom 5'te lokalize

olup 11 ekzona sahiptir ve 530 amino asit kodlar. Accn3, DRADİK, TNaC1, AW742291, SLNAC1 gibi alternatif adlarda kullanılır.

ADİK3'de ADİK1b gibi periferik duyu nöronlarında eksprese olurlar (59, 60, 61, 62). ADİK3'ün pre-TM1 bölgesindeki 9 amino asit iyon seçiciliği ve geçirgenliğinin düzenlenmesinde görev almaktadır. ADİK3'ün hidrojen affinitesi yüksektir ancak bu periferik sinir sistemi ile sınırlıdır. Diğer ADİK alt birimlerinin aksine, homomerik ADİK3 kanalları geçici inaktif akım ile ekstraselüler pH düşüşüne cevap verebilir (59, 63). Geçici akımlar, protona son derece duyarlıdır (58). ADİK3 alt birimleri duyu nöronlarında homomerik ve heteromerik kanallar olarak fonksiyon gösterir (62, 64, 65). ADİK3 alt birimleri deri teması, ağrı algılama, inflamasyon ve iskemi gibi fizyolojik ve/veya patolojik süreçler esnasında ekstraselüler asidifikasyonu algılayabilir (66, 67, 68, 69, 70). Örneğin ADİK3 kanalları kalp duyu nöronlarında eksprese olurlar ve miyokardiyal iskemiye cevap verebilir. Ayrıca deri duyu nöronları orta asidoz ile uyarıldığında ADİK3 gibi akımlar göstermektedir. Sonuç olarak ADİK3 iskemi ve duysal nöronlarda inflamatuvar ağrı sırasında orta asidozlu bir sensör olarak görev yapmaktadır (61).

3.3.4. Asit Duyarlı İyon Kanalı 4

Asit duyarlı iyon kanalı 4 (ADİK4), insanda kromozom 2'de lokalizedir. 9 ekzona sahiptir ve 647 amino asit kodlar. ACCN4, BNaC4 gibi alternatif adlarda kullanılır. Farede kromozom 1'de lokalize olan kanal 10 ekzona sahiptir ve 539 amino asit kodlar. Accn4, BNaC4 gibi alternatif adlarda kullanılır.

ADİK4 alt birimleri hipofiz bezinden eksprese olur. ADİK2b gibi homomerik kanallarda fonksiyon görmezler (71). Ancak heterolojik ADİK4,

ADİK1 ve ADİK3'ün down-regülasyonu ile ilişkilidir. ADİK4'ün fonksiyonu bilinmemektedir ve yapılan son çalışmalarda hidrojene duyarlı olmadığı öne sürülmüştür.

3.3.5. Asit Duyarlı İyon Kanallarının Farmakolojisi

ADİK farmakolojisi, voltaj-bağımlı sodyum (NaV) kanallarıyla karşılaştırıldığında nispeten zayıftır (72). ADİK inhibitörleri, non-spesifik ve ayırt edilemeyen moleküller olarak spesifik natürel peptit toksinleri hayvan zehirlerinden izole edilir (73).

Ayrıca ADİK'ler sıcaklıkla modüle edilirler. Düşük sıcaklıklar, duyarsızlaşma oranını düşürerek asitle aktive edilen kanalları güçlendirir. Sıcaklıkla duyu nöronlarındaki proton kapılı akımların duyarsızlaştırma oranını yavaşlatarak ya da hızlandırarak modülasyonu sağlanır. Çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik koşullarda duyu uyarının transdüksiyonu düzenleyerek yaparlar (74). ADİK protein kinaz C (PKC) tarafından modüle edilir. ADİK3 channel interacting protein (CIPP) ile etkileşir, kanal tarafından üretilen akım yoğunluğunu artırır.

3.3.5.1. Nöropeptitler

ADİK'ler omurgasızlardaki FMRF (Phe-Met-Arg-Phe) amid kapılı Na⁺ kanallarıyla (FaNaC) aynı kanal ailesine aittir ve bu kanallar arasındaki yapısal benzerlikler FMRF amide ve yapısal olarak ilişkili olduğu peptitlerin ADİK'lerin agonistleri olabileceği varsayımına sebep olmuştur (55,74). FMRF amid, nöropeptit FF (NPFF, FLFQPQRF amid) ve nöropeptit SF (NPSF, SLAAPQFR amid) ADİK'leri doğrudan aktive etmez, ancak rekombinant ADİK1a ve ADİK3 kanallarının akımlarını güçlendirir (74, 75, 76).

FMRF amid ve ilişkili peptitler doğrudan ADİK3 kanalları üzerine, pik akımını artıran ve esas olarak inaktivasyon oranını düşüren etki göstermektedir ki bu da asidifikasyon esnasında bariz devamlı bir evreye neden olur (74, 75). FMRF amid yalnızca omurgasızlarda bulunurken, NPFF ve NPSF çoğunlukla memelilerin merkezi sinir sisteminde özellikle de omurilikte eksprese edilir. NPFF aynı zamanda küçük ve orta boyutlu dorsal kök gangliyonu nöronlarında tespit edilmiştir (77). NPFF ve ADİK alt birimlerinin ekspresyon seviyeleri inflamatuvar durumlarda artmıştır. ADİK3 aracılı pozitif modülasyon, NPFF tarafından yapılan depolarizasyonu sürdürür, bu nedenle de inflamatuvar koşullar altında nosiseptör uyarıla bilirliliğini düzenlemede önemli bir rol oynayabilir (78).

Kanal aktivitesini artırmak için endojen opioid nöropeptit olan Dinorfin A ve büyük dinorfinin ADİK1a'ya sabit durum duyarsızlığını önleyerek doğrudan bağlandığı gösterilmiştir (79).

3.3.5.2. Hayvan Zehirinden Peptit Toksinler

Psalmopoeus cambridgei Toxin 1 (PcTx1) ve Anthopleura elegantissima Toxin 2 (APETx2) sırasıyla örümcek Psalmopoeus cambridgei (80) ve deniz anemonu Anthopleura elegantissima zehirlerinden izole edilmiştir. Bunların özellikle ADİK1a ve ADİK3 kanallarını inhibe edildiği görülmüştür (81). PcTx1, 40 amino asit içeren bir peptittir. Homomerik ADİK1a kanalını bloke eder (80). Kemirgenlerde İntratekal (i.t) veya intraserebroventriküler (i.c.v) olarak enjekte edildiğinde kuvvetli ağrı kesici özelliği gösterir. APETx2, 42 amino asit içerir. ADİK3 ve ADİK3 içeren heteromerik kanalları inhibe eder. Heteromerik kanalların alt birim (ADİK3, ADİK3/1a, ADİK3/1b, ADİK3/2b) bileşimlerine bağlı olarak 2µM ve 63nM arasında değişen bir afinitesi vardır (81). APETx2,

periferik olarak uygulandığında analjezik özelliğine sahiptir (82). ADİK1a üzerine PcTx1'in etki mekanizması iyi bir şekilde tanımlanmış olsa da, ADİK3 üzerine APETx2'nin bağlama bölgeleri ve inhibisyon mekanizması henüz kanıtlanmamıştır.

3.3.5.3. Organik Bileşikler

Amilorid, potasyum koruyucu diüretiktir ve ADİK'lerin ilk blokeridir (54). Ancak zayıf ve seçici olmayan bir ADİK inhibitörüdür. Amilorid, ADİK'lerde ayrımcı olmayan gözenek blokerleri gibi davranır (83, 84). Konsantrasyon aralığı mikromolardır (IC₅₀, 5 ve 100 µM arasında değişir). Amilorid türevleri benzamil ve 5 - (N-Etil-N-izopropil) amilorid (EIPA), zayıf-seçici geri dönüşümlü ADİK blokerleridir.

A-317567 bileşiği daha seçici fakat ayırt edici olmayan, amilorid olmayan doğal ve rekombinat ADİK inhibitörüdür (IC₅₀, 2 ve 30 µM arasında değişkendir). ADİK blokerleri, rat modellerinde operasyon sonrası ve inflamatuvar ağrılarda amiloridin oldukça güçlü analjezik etkisi vardır (85). A-317567 molekülünün parçası olan amidin ADİK3 akımını inhibe edilmesinde önemlidir (86). Son zamanlarda, 4-anti-protozoal diarylamidin (4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), diminazene, hydroxystilbamidine (HSB) ve pentamidin) hipokampal nöronlarda (afinite aralığı 300 nM ve 38 µM olan) ADİK akımlarını inhibe ettiği rapor edilmiştir (76). Non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAIDs), ADİK1a ve ADİK3 kanallarının aktivitesini inhibe eder. ADİK1a'yı flurbiprofen ve ibuprofen inhibe ederken, ADİK3 akımını solosilik asit, aspirin ve diklofenak bloke eder (87).

3.3.5.4. İki ve Üç Değerlikli Katyonlar

ADİK'ler çeşitli ağır metal iyonları (gadolinium (Gd^{3+}), kurşun (Pb^{2+}), nikel (Ni^{2+}), kadmiyum (Cd^{2+}), bakır (Cu^{2+})) ve iki değerlikli katyonlar (kalsiyum (Ca^{2+}), magnezyum (Mg^{2+}) ve çinko (Zn^{2+})) tarafından inhibe edilir (88, 89, 90, 91, 92). Hücre dışında Ca^{2+} seviyesinin artmasıyla tek kanallı ADİK1a ve ADİK2a'nın iletkenliği azalır (93). Zn^{2+} , ADİK üzerinde iki etkiye sahiptir; mikromolar konsantrasyonda kuvvetlendirici etki nanomolar konsantrasyonda inhibe edici özelliği vardır (91, 94). Düşük afiniteli kuvvetlendirici etki ADİK2a içeren kanalları, yüksek afiniteli inhibitör etki homomerik ADİK1a ve heteromerik ADİK1a/2a kanallarını etkiler. Yüksek konsantrasyonlu Zn^{2+} , ADİK3 akımını inhibe eder (95). ADİK2a/3 heteromerik kanallar Gd^{3+} duyarlıdırlar.

3.3.6. Nörodejeneratif Hastalıklarda Asit Duyarlı İyon Kanalları

3.3.6.1. ADİK1a Kanalları ve Multipl Skleroz

Multipl skleroz aksonal dejenerasyonla bağlantılı olan nöroinflamatuvar bir hastalıktır. İnflamasyon ve demiyelinizasyon merkezi sinir sistemi lezyonlarının başlıca özellikleridir. İnflamatuvar yaranın nöronal mitokondriyal bozukluğa, enerji yetmezliğine ve iyon değişim mekanizmalarının değişimine neden olarak, aksiyonal dejenerasyona yol açtığı öne sürülmüştür (96). Na^+ ve Ca^{2+} iyonlarının aşırı birikimi aksonal dejenerasyonla bağlantılı olduğu için (97); Friese ve ark. Na^+ ve Ca^{2+} iyonlarının birikimine neden olan ADİK1a aktivasyonun merkezi sinir sistemi inflamatuvar lezyonlarında bu süreçte katkıda bulunup bulunmadığını araştırmışlardır (98). Araştırmacılar, otoimmün ensefalomiyelit (EAE) deney modellerinde, ADİK1 null farelerle wild-tip fareleri karşılaştırdıklarında; null farelerde aksonal dejenerasyonun önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir. Ayrıca EAE farelerin omuriliklerinde yapılan pH ölçümleri; asidoz dokuların ADİK1a kanallarını açmak için yeterli olduğunu göstermiştir. İn vitro da sinir eksplantlarında ADİK1 genlerinin bozulmasının koruyucu etkisi olduğu bulunmuştur. ADİK blokeri olan amilorid, EAE ve sinir eksplantlarında eşit derecede nöroprotektiftir. Bu yüzden ADİK1a çoklu skleroz ile bağlantılı akson dejenerasyonu için potansiyel bir hedef olabilir (99).

3.3.6.2. ADİK'ler ve Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı (PH), Substantia Nigra'daki (SNc) dopaminerjik nöronların kaybı ve motor bozukluklarla karakterizedir (100). Ancak nöronal yaralanma mekanizması tamamen belli değildir. Daha önce yapılan çalışmalarda,

bu bölgedeki savunmasız nöronlar ADİK1a ekspre etmişlerdir (101, 102). PH iskemi gibi serebral laktik asidozla ilişkilidir. Arias ve arkadaşları; 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) ile indüklenen PH fare modelinde ADİK'in blokaj etkisini test etmişlerdir (103). Beklenildiği gibi amiloid SNc nöronlarını MPTP ile indüklenen dejenerasyondan koruduğu bulunmuştur. Bu bulgular ADİK'lerin PH' da önemli bir potansiyeli olduğunu göstermiştir.

3.3.6.3. ADİK'ler ve Huntington Hastalığı

Huntington hastalığı (HH), ölümcül nörodejeneratif bir hastalıktır. İn vitro ve in vivo HH modellerinde ve HH hastalarının beyinlerinde enerji metabolizma eksikliği ve asidoz gözlenmiştir. HH patolojisinde ADİK potansiyel katılımı incelemek amacıyla Wong ve ark, in vivo ve in vitroda amiloid türevi benzamilin etkisini test etmişlerdir (104). Benzamilin, uyarılabilir hücre sisteminde huntingtin-poliglutamin (htt polyQ) agregasyonunu azalttığı görülmüştür. Benzamil ubiquitin-proteazom sistemi (UPS) aktivitesini azalttığı başka deneylerle de gösterilmiştir. Böylece ADİK1a, HH ve diğer polyQ ile ilişkili bozukluklarla savaşmada alternatif bir yol olabilir.

3.3.6.4. ADİK'ler ve Alzheimer Hastalığı

Öğrenme/hafıza ve sinaptik plastisite ADİK1a kanallarına bağlı bir çalışmada ADİK1a kanallarının fonksiyonları azaldığında, AH'ye neden olabileceği öne sürülmüştür (105). Bu çalışmada Maysami ve arkadaşları asit aktiviteli farelerin kortikal ve CHA hücrelerinde bulunan ADİK1a'ların nanomolar amiloid beta peptid konsantrasyonda inhibe edildiği açığa çıkarılmıştır. Buna ek olarak amiloid beta peptid miktarının azalmasıyla kanalların aktivasyonu

yavaşlamıştır. ADİK1a kanalların fonksiyonlarının azalması AH'de öğrenme ve hafıza eksikliğine neden olduğu gözlenmiştir.

3.3.6.5. ADİK'lerin ve Depresyon

Depresyon, genel popülasyonda daha çok genç bireylerde görülen bir rahatsızlıktır ve bu hastalığa neden olan metabolik yollar hakkındaki bilgiler yetersizdir. Coryell ve ark. depresyonla ilgili davranışlarda ADİK fonksiyonun rol oynadığını bulmuşlardır (106). Araştırmacılar genetik olarak bozulmuş ADİK1a'nın farelerde zorunlu yüzme testi, kuyruk asma testi ve beklenmedik stres altında antidepresan benzeri etkiler ortaya çıkardığını göstermişlerdir. Hipokampusta beyin türevli nörotropik faktör (BDNF) azalarak stresi etkiler buda ADİK1a'nın bozulmasına ve inhibisyonuna neden olur. Bu nedenle ADİK1a kanallarının antagonistleri, kişinin depresyonu atlatmasında potansiyel bir etki gösterebilir.

3.3.6.6. ADİK'ler ve Anksiyete Hastalıkları

Anksiyete hastalıkları, nöropsikiyatrik hastalığın zayıflamış halidir. Anksiyete hastalıkları için mevcut tedaviler benzodiazepinler ve selektif serotonin inhibitörleri gibi farmakolojik ajanlar içerir. Bu ajanlar çoğu hastada etkili olurken, birçok yan etkiye de neden olabilir. Bu yüzden etkili ve daha tolere edilmiş ajanların geliştirilmesi gereklidir. Dwyer ve ark. ADİK1a inhibitörlerinin kemirgen modellerinde anksiyete parametrelerinde otonom ve davranışsal etkiye sahip olduğunu bulmuşlardır (107). Stres kaynaklı hipertemi modelinde, ADİK inhibitörlerinden PcTx1, A-317567 ve amilorid stres kaynaklı vücut sıcaklığının artışını engellemişlerdir. Son çalışmalarda da ADİK3'ün anksiyete benzeri davranışlarda etkili olduğu gösterilmiştir (108).

Çalışmanın amacı; Amiloid beta (1-42) intrasera broventriküler enjeksiyonu ile oluşturulan fare Alzheimer modelinde beyin dokularında ADİK'lerin ekspresyonlarının belirlenmesi, ADİK'lerin amiloid beta (1-42) indüklediği apoptotik süreçlerdeki görevlerinin araştırılması ve bir ADİK blokeri olan amiloridin AH'deki öğrenme üzerine olası etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Çalışma Gruplarının Tanımı

Tez çalışmasında kullanılan fareler Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden (FÜDAM) temin edildi. Yetişkin 34-37 gram ağırlığında Balb C ırkı toplam 38 adet dişi fare kullanıldı. Tüm hayvanlar standart ışık 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık ve 25°C ısıda, yeteri kadar su ve yem verilerek standart plastik kafeslerde çalışmanın sonuna kadar bekletildi. Çalışma grupları ve hayvan sayıları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan hayvan sayısı ve gruplar.

Çalışma Grupları	Hayvan Sayısı(n)
1. Beta-amiloid grubu	10
2. Sham Grubu	10
3. Beta-amiloid +Amilorid Grubu	10
4.Kontrol Grubu	8
Toplam	38

4.1.1. Beta-amiloid Grubu

Alzheimer hastalığının farelerde oluşturulması için stereotaksik aparat yardımıyla intrasera broventriküler (i.s.v) olarak Amiloid beta 1-42 (400 nmol) enjeksiyonu yapıldı. 4514.04 gr/mol molekül ağırlığındaki A β (1-42)'ya 1.2 μ l Dimetilsülfat (DMSO) ve 161 μ l %0.9 izotonik eklenerek çözüldü. A β (1-42) çözeltisi 37°C sıcaklıkta etüvde 5 gün inkübe edilerek fibrile olması sağlanarak kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı. Farelere anestezi olarak 0.1ml %2 Basilazin ve 0.4 ml Ketamin insülin enjektörüne çekilerek her fareye 0.12 ml olacak şekilde intramusküler (i.m) verildi. Anestezi uygulandıktan sonra farelerin gözlerine % 0.9 izotonikten bir damla damlatıldı. Fare stereotaksik aparata yerleştirilerek Bregma noktası belirlendi. Bregma noktasına göre stereotaksik alet

ile [Anterior Posterior (yatay); - 0.8 mm, Medial Lateral (üstten); +1.0 mm, Dorsal ventral (derinlik); -3.0 mm] 30 sn içerisinde sağ ventriküle A β (1-42) (400 nmol/3 μ l) enjekte edildi. Difüzyonu sağlamak için iğne 1 dk gecikmeli olarak çıkarıldı. Diş çimentosu ve sıvı yapıştırıcı karıştırılarak farenin kafatasında açılan kısımlar kapatıldı. Deri cerrahi dikiş ipliğiyle dikildi. İ.s.v enjeksiyon yapıldıktan sonra farelere 5 gün boyunca günde 1 defa i.m antibiyotik (0.17 ml anestezi /1ml izotonik) uygulandı.

4.1.2. Sham Grubu

Beta-amiloid grubu ile aynı işlemlere tabi tutuldu. Fakat A β (1-42) yerine i.s.v olarak 3 μ l izotonik uygulandı.

4.1.3. Beta-amiloid + Amilorid Grubu

Intraserabroventriküler olarak A β (1-42) enjeksiyonundan sonra amilorid 7.günden başlanarak 15 gün boyunca günde 1 defa intraperitoneal (i.p) olarak 5 mg/kg dozda verildi. Amilorid izotonikte çözülerek hazırlandı.

4.1.4. Kontrol Grubu

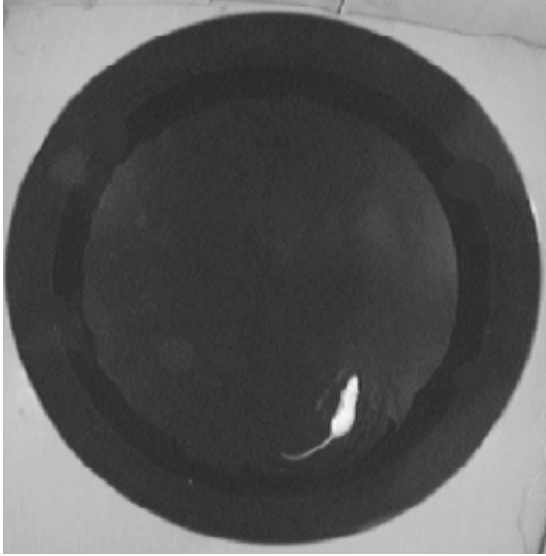
Bu gruptaki farelere herhangi bir işlem uygulanmadı. 6 günlük öğrenme testleri yapıldıktan sonra dekapite edildi. Kontrol grubu dışında kalan tüm gruplara A β (1-42) enjeksiyonundan 15 gün sonra Morris'in su tankı olarak bilinen öğrenme testi uygulandı. Çalışmamızda; beta-amiloid ve sham gruplarına Amiloid beta (1-42) enjeksiyonu yapıldıktan 21 gün sonra dekapite edildi. Beta-amiloid + Amilorid grubu ise 28 gün sonra dekapite edildi.

Çalışma için; Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanlığına başvuru yapılarak, ilgili etik kurulun 31.12.2012 tarihli, 12/15 sayılı ve 128 karar

numarasıyla etik kurallara uygun olduğuna dair izin alınmıştır. Tez çalışması için maddi destek Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon birimince desteklenen TF.13.24 no'lu projeden sağlanmıştır.

4.2. Morris Yüzme Testi (Morris Water Maze)

Laboratuvar hayvanlarında öğrenme ve hafızanın araştırılmasında kullanılmak üzere, ilk defa 1980'li yıllarda Richard Morris tarafından tanımlanmıştır. Günümüzde en sık kullanılan öğrenme testidir. Test kemirgenlerde nörokognitif bozuklukların test edilmesinde kullanılmaktadır (110).



Şekil 9. Morris yüzdürme testi (109)

Öğrenme testleri A β (1-42)'in öğrenme üzerindeki olumsuz etkilerinin ortaya konması için yapıldı. Öğrenme testleri olarak; Morris water maze testi (Morris'in su tankı testi) ve probe test uygulandı. Morris'in su tankı sirküler bir tank olup 120 cm çapında galvanizli ve 50 cm yüksekliğindedir. Su tankı 25 cm kadar su ile dolduruldu ve suyun 2 cm altına bırakılan 10x10 cm lik platform bırakıldı. Suyun ısısı 24 $\pm$ 2°C'de sabit tutuldu. Tankın yerleştirildiği konum ve

platform yeri deney süresince sabit tutuldu. Deneklerin bulunduğu yerin uzaysal konumunu algılayabilmeleri için görsel bir işaret tank dışına konuldu. Platform sanal olarak 4 eşit parçaya ayrılan tankın bir çeyreğinin ortasına bırakıldı. Fare diğer $\frac{1}{4}$ oranındaki alanlardan birine bırakılarak yüzerek platformu bulması için 60 sn zaman verildi.

Platformu bulunca 30 sn platform üzerinde dinlenmesine izin verildi ve sonra alınıp ayrı bir kafeste 30 sn bekletildi. Tekrar su tankına bırakılarak aynı işlem her hayvan için 4 kez tekrarlanıp platformu bulma süreleri kaydedildi. 60 sn içinde platformu bulamayan fare alınıp platforma bırakıldı ve 30 sn platform üzerinde kalması sağlandı. Her hayvan için 5 gün süreyle aynı denemeler yapıp deneklerin öğrenme yeteneği zaman olarak (sn) kaydedildi.

Belleğin pekiştirilme işlemini test etmek için 5 günlük testten 24 saat sonra probe testi yapıldı. Bu testte platform tanktan alındı ve denekler yüzdürüldü. Denekler doğal olarak platformun önceden bulundukları tankın dörtte birlik kısmında daha çok arama yaparlar. Bu süre belleğin pekiştirilmesini ölçer. Deneklerin eski platformun bulunduğu dörtte birlik alanda yüzdükleri süre kaydedildi.

6 gün süren öğrenme testinden sonra hayvanlar dekapite edildi. Western Blot ve Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) yöntemleri için hipokampus, beyincik ve total beyin olarak ayrılarak hızlı bir şekilde sıvı azotta donduruldu ve deney gününe kadar -80°C’de saklandı. İmmünohistokimya ve Tunel yöntemleri için her gruptan 2 adet hayvanın beyin dokusunun yarısı alınarak falkon tüpü içindeki %10 formaldehite bırakıldı.

4.3. Kullanılan Aletler

- -20°C derin dondurucu: Arçelik, Türkiye
- -80°C derin dondurucu: Nuaire, Meksika
- Etüv: Gallenkamp, Economy Incubator Size, Ukranya
- Falkon Tüp: Corning® 430766, 15 mL Centri füge Tube, Meksika
- Homojenizatör: Next Advance, Averill Park NY, Bullet Blender Storm, ABD
- Homojenizatör Boncuğu: Next Advance, GB05-RNA 0.5mm Dia, RNase-Free Glass Beads, ABD
- Mini Plate Spin: Labnet C1000, ABD
- Otomatik Pipetler: Socorex, Acura 825, Switzerland, İsviçre
- PZR ve Qubit tüpleri (0.6ml): Neptune, Katalog: 3737.S.X, Biotix Laboratory Media, İngiltere
- Plate Yapıştırıcı: AB Applied Biosystems, MicroAmp, Optical Adhesive Film, ABD
- Plate: AB Applied Biosystems, MicroAmp, Fast Optical 96-Well Reaction Plate With Barcode (0.1 mL), Singapur
- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): Biometra, Almanya
- Qubit® 2.0 Fluormeter: Invitrogen by life technologies, Avustralya
- Real Time- PZR: AB Applied Biosystems, ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR Instrument, Foster City, CA
- Santrifüj: Sigma, Almanya
- Spin: Labnet International, Katalog No:C1031B-230V, Kore
- Vorteks: Elektro-Mag, Türkiye

4.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 2-Merkaptoethanol: C_2H_6OS , Biotechnology Grade, AMRESCO, Katalog No:36/37/39.15, Ohio
- Amiloride hydrochloride hydrate: $C_6H_8ClN_7O.HCl.xH_2O$, Sigma, Katalog No:101250776, Molekül Ağırlığı:266.09, ABD
- Amyloid β Protein Fragment 1-42: $C_{203}H_{311}N_{55}O_{60}S$, Sigma, Katalog No:107761-42-2, Molekül Ağırlığı:4514.04, ABD
- Antibiyotik: Genta® 40 mg, İ.E. Ulagay İlaç Sanayii Türk A.Ş, İstanbul, Türkiye.
- Basilazin %2: baVet, Senden- Börsensel,Almanya
- cDNA Kiti: AB Applied Biosystems, High- Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Part No:437522 REVB, Foster City, CA
- Diş Çimentosu: Adhesor® Carbofine Zinc polycarboxylate cement, 80G.PLV. 2054809, Jicin, Çek Cumhuriyeti
- Ketalar: Pfizer, İstanbul, Türkiye
- Qubit RNA Buffer: Invitrogen/Molecular Probes, ABD
- Qubit RNA Reagent: Invitrogen/Molecular Probes, ABD
- Qubit® RNA Kiti: Invitrogen/Molecular Probes, Qubit® RNA Assay Kit For Use With The Qubit® 2.0 Fluorometer, ABD
- RNA Kiti: Invitrogen, Ambion by life technologies™ , PureLink™ RNA Mini Kit, Katalog No: 12183018A, ABD
- TaqMan® Gene Expression Master Mix: AB Applied Biosystems, Katalog No:4369016, ABD

- Temizleme Solüsyonu: Bioshop, Nuclease Removal Reagent (500 mL), Kanada
- Yapıştırıcı: Adhesor® Carbofine Zinc polycarboxylate cement, 40G.LIQ 2025858, Jicin, Çek Cumhuriyeti

4.5. Kullanılan Yöntemler

4.5.1.Total RNA İzolasyonu

Kullanılan Çözeltiler:

Lizis buffer: Kullanıma hazır şekilde kitin içinde bulunuyor.

Wash I: Kullanıma hazır şekilde kitin içinde bulunuyor.

Wash II: Kullanıma hazır şekilde kitin içinde bulunuyor.

%70'lik etanol

Deneyin Yapılışı: Hipokampus dokularından RNA izolasyonu için PureLink™ RNA Mini Kiti kullanıldı. Çalışma prosedürü aşağıdaki gibidir:

Kit içerisindeki lizis buffer'den 1ml ve 2-merkaptoetanol'dan 10 µl falkon tüpüne alınıp karıştırılarak Lizis tampon çözeltisi elde edildi. Hipokampus dokusu, doku ile eşit miktarda homojenizatör boncuğu ve hazırladığımız çözeltiden 600 µl alınarak kilitli eppendorf tüplere bırakıldı. Homojenizatörde 3 dakika (dk) 8. hızda parçalama işlemi yapıldı. Örnekler 12.000xg'de 2 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. RNA içeren sıvı fazın hepsi yeni bir eppendorfa alınarak üzerine 500 µl %70'lik etanol eklendi ve vortekslendi. Örneklerden 700 µl alınarak kit içerisindeki kolonlara aktarıldı ve 12.000xg'de 15 saniye(sn) oda sıcaklığında santrifüj edildi. Kalan örneklerde kolonlara aktarılarak aynı şekilde santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpünün altında biriken sıvı boşaltıldı.

Yıkama işlemleri kitin içindeki Wash I ve Wash II ile yapıldı. Örnekler 700 µl Wash I eklenerek 12.000xg'de 15 sn santrifüj edildi. Toplam tüpü değiştirildi. Örnekler 500 µl Wash II eklenerek 12.000xg'de 15 sn santrifüj edildi ve bu işlem iki defa tekrarlandı. Tüpün altındaki sıvı boşaltılarak hiçbir şey eklenmeden 12.000xg'de 2 dk santrifüj edildi. Kolonlar alınarak yeni ependorf tüplere bırakıldı ve üstüne 30 µl RNase içermeyen su eklenerek oda sıcaklığında 1 dk bekletildi ve 12.000xg'de 2 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Ependorf tüpün dibindeki sıvı kısım bu aşamadan sonra RNA içermektedir. RNA örnekleri kullanılmaya kadar -80°C'de saklandı.

4.5.2. Spektrofotometrik RNA Ölçümü

RNA ölçümü için Qubit® RNA Assay Kit For Use With The Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen/Molecular Probes) kullanıldı.

RNA miktarı µg/ml olarak ölçüldü. cDNA sentezi için RNA miktarlarının eşitlenmesi amacıyla okunan en düşük RNA değeri standart alındı. Komplementer DNA sentezi (cDNA) için her bir gruptaki örneklerden RNA havuzu hazırlandı ve 1.grup: kontrol, 2.grup: Beta-amiloid, 3.grup: amiloid+ Beta-amiloid ve 4.grup: sham olmak üzere toplam dört RNA havuzu elde edildi.

4.5.3. Komplementer DNA Sentezi

Kullanılan Çözeltiler: High- Capacity cDNA Reverse Trancription Kiti: Kit içinde 10XRT Buffer, 25XdNTP mix, 10XRT Random Primers, MultiScribe™Reverse Transcriptase hazır halde bulunmaktadır.

Deneyin Yapılışı: cDNA sentezi için havuz yapılan RNA örneklerinden 10 µl kullanıldı. cDNA sentezi toplam 20µl hacimde gerçekleştirildi. Sentez için

10µl RNA örneği, 2 µl 10XRT random primer, 2 µl 10XRT buffer, 0.8 µl 25XdNTP mix, 4.2 µl nükleaz içermeyen su ve en son olarak 1µl MultiScribe™Reverse Transcriptase enzimi kullanıldı. Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi. 25°C’de 10 dk, 37°C’de 120 dk, 85°C’de 5 dk ve 4°C’de ∞ olacak şekilde cihazda bekletildi. Oluşan cDNA örnekleri -20°C’de saklandı.

Tablo 4. cDNA karışım miktarı

Bileşik	Hacim (µl)	Katalog No
10X RT Tamponu	2.0	4319981
25X dNTP karışımı (100mM)	0.8	4367381
MultiScribe™Revers Transkriptaz	1.0	4319983
10XRT Random Primer	2.0	4319979
Nükleaz içermeyen H2O	4.2	
Reaksiyon toplamı	10.0	

Tablo 5. cDNA sentezi için uygulanan PZR programı

PZR	1. Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman	10 dk	120 dk	5 dk	∞

4.5.4. Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA

Amplifikasyonu:

Revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA’lar sekans spesifik primerlerin varlığında Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile amplifiye edildi. Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH), ACCN1, ACCN2 ve ACCN3 genlerinin belirlenmesi için aşağıdaki tabloda verilen primerler kullanıldı. RT-PZR analizleri sonucunda gen ekspresyonundaki farklılıkların hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanıldı.

Tablo 6. RT-PZR’ da kullanılan primerler

TaqMan Gene Expression Assay Gex: AB Applied Biosystems, ABD, 250µl	
Primer	Katalog Numarası
Gapdh	Mm99999915-91
Accn1	Mm00475691-ml
Accn2	Mm01305997-ml
Accn3	Mm00805460-ml

Real Time-PZR üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. RT-PZR plate hazırlanırken cDNA örneklerinde her bir kuyucuğa 2µl kondu. Buz üzerinde her bir örnek için 5µl TaqMan Master Mix, 2.5 µl nükleaz içermeyen su ve 0.5 µl primer hibridizasyon probu olacak şekilde örnek sayısına göre hesaplanan bileşen miktarları ependorflara bırakıldı ve vortekslendi. Plate’deki cDNA örneklerinin üzerine 8µl hazırlanan karışımdan bırakılarak plate’in üzeri optik yapıştırıcı filmle kapatıldı. Plate örneklerin tamamen dibe çökmesi ve oluşan kabarcıkların yok edilmesi amacıyla Mini plate spin cihazında 1 dakika santrifüj edildi.

Tablo 7. RT-PZR için her bir kuyucuğa konan bileşikler

Bileşikler	Hacim(µl)X Örnek Sayısı
cDNA	2.0
Primer	0.5
TaqMan Mix	5.0
Nükleaz içermeyen H2O	2.5
Toplam	10.0

Gen ekspresyon seviyeleri, Applied Biosystems 7500 Real-Time PZR sistemi ile ölçüldü. Çalışmada GAPDH kontrol gen (housekeeping) olarak kullanıldı. Isı koşulları 50°C’de 2 dakika, 95°C’de 10 dakika X 40 siklüs, 95°C’de 15 saniye ve 60°C’de 1 dakika olacak şekilde ayarlandı.

Tablo 8. Uygulanan RT-PZR programı

RT-PZR X 40 döngü				
	1. Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık	50°C	95°C	95°C	60°C
Zaman	2dk	10dk	15sn	1dk

4.5.5. İmmünohistokimya

Dekapitasyonun ardından farelerin beyin dokuları hızla çıkarılıp %10 formaldehitte tespit edilip, rutin histolojik takip serilerinden geçirildikten sonra parafin bloklara gömüldü.

Boyama yöntemi aşağıdaki Tablo 9’da ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 9. İmmünohistokimyasal boyama yöntemi

Sıra	İşlem	Süre
1	Xylol I	10 dakika
2	Xylol II	10 dakika
3	Xylol	10 dakika
4	% 100 Alkol	10 dakika
5	% 96 Alkol	10 dakika
6	% 80 Alkol	10 dakika
7	Distile su	5 dakika
8	Mikrodalga	7+5 dakika
9	Oda ısısında soğutma	20 dakika
10	PBS (Phosphate Buffered Saline)	3X5 dakika
11	H ₂ O ₂	10 dakika
12	PBS	3X5 dakika
13	Normal blok solüsyonu	5 dakika
14	Primer antikor	60 dakika
15	PBS	3X5 dakika
16	Sekonder antikor	30 dakika
17	PBS	3X5 dakika
18	Streptavidin ALP (Alkalen fosfataz)	20 dakika
19	PBS	3X5 dakika
20	Fast Red	5 dakika
21	Distile su	5 dakika
22	Zıt boya olarak Mayer’s hematoksilen	10 saniye
23	Akarsu	5 dakika
24	Özel kapatma maddesi ile kapatma	

Parafin bloklardan 5–6 mm kalınlığında kesilen kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilip antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH:6'da mikrodalga fırında (750W) 12 dakika kaynatıldı. Zemin boyasını engellemek için Ultra V Block (TA-125-UB, Lab Vision Corporation, ABD) solüsyonu ile 5 dakika muameleden sonra primer antikorlar (mouse monoclonal ADİK4 antibody, sc-377063, Santa Cruz Biotechnology, ABD, Rabbit polyclonal Anti-ACCN1 antibody, ab77384, Abcam, Cambridge, UK, Rabbit polyclonal Anti-ACCN2 antibody, ab87514, Abcam, Cambridge, UK) ile 60 dakika inkübe edildi. Dokular, primer antikor uygulanmasından sonra sekonder antikor (biotinylated Goat Anti-Poliyvalent (anti-mouse/rabbit IgG), TP-125-BN, Lab Vision Corporation, ABD) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Sekonder antikor uygulanmasından sonra Streptavidin Alkaline Phosphatase (TS-060-AP, Lab Vision Corporation, ABD) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra distile su içerisine alındı. Dokulara Fast Red Substrate System (TA-125-AF, Lab Vision Corporation, ABD) solüsyonu damlatılıp ışık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra eş zamanlı olarak distile su ile yıkamaya alındı. Mayer's hematoksilen ile zıt boyaması yapılan dokular distile sudan geçirilerek uygun kapatma solüsyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, ABD) ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Olympus BX 50 mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde boyanmanın şiddeti ve yaygınlığı esas alındı. İmmün boyanmanın şiddeti ve yaygınlığı 0'dan +3'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı (Tablo 6).

Tablo 10. İmmünohistokimyasal boyanma yaygınlığının derecesi

Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Az
+2	Orta
+3	Şiddetli

4.5.6. Tunel Yöntemi

Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesilen kesitler polilizinli lamlara alındı. ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, ABD) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi. Boyama yöntemi aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 7).

Tablo 11. TUNEL boyama prosedürü

	İşlem	Süre
1	60°C etüv	Bir gece
2	Xylol	3X15 dakika
3	%100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4	PBS	5 dakika
5	Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	
6	1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dakika
7	PBS	3X5 dakika
8	Endojen peroksit blokajı (% 3 H ₂ O ₂)	3 dakika
9	PBS	3X5 dakika
10	Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11	Çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) 37°C'de	60 dakika
12	Stop/Wash Buffer (2ml) +Distile su (68ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13	Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14	PBS	3X5 dakika
15	DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16	PBS	3X5 dakika
17	Distile su	5 dakika
18	Harris hematoksilen	1 dakika
19	Distile su	5 dakika
20	%80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dakika
21	Xylol	2X5 dakika
22	Kapatma medyumunu kullanılarak lamel ile kapatma.	

Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskobunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris Hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi.

TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde boyanmanın yaygınlığı esas alındı. TUNEL boyamanın yaygınlığı 0'dan +3'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı (Tablo 8).

Tablo 12. TUNEL boyama yaygınlığının derecesi

Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Az
+2	Orta
+3	Şiddetli

4.5.7. Western Blot Analizi ile Protein Miktarının Ölçümü

Kullanılan Çözeltiler

Hipotonik Tampon:

- 2-[4-(2-Hidroksietil)-1-piperazin] etansülfonik asit [HEPES (pH 7.8)] 10 mM
- Potasyum klorür (KCl) 10mM
- Magnezyum klorür ($MgCl_2$) 2mM
- Dithiothreitol (DTT) 1mM
- Etilendiamin-tetraasetik-asit (EDTA) 0.1mM
- Fenilmetilsülfonil florid (PMSF) 0.1mM

Tampon Çözeltisi:

✓ KCl	50mM
✓ Sodyum klorür (NaCl)	300mM
✓ HEPES (pH 7.8)	50mM
✓ EDTA	0.1mM
✓ DTT	1mM
✓ PMSF	0.1mM
✓ % 20 Gliserol	

Beyin dokusu 1:10 (w/v)‘ luk soğuk hipotonik tampon çözeltisinde homojenize edildi. % 10’luk Nonidet P-40 (NP-40) çözeltisinden 90 µl doku homojenatlarına ilave edilerek karışım 15.000 g’de 3 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantlar yeni tüplere alındı. Pellet, %10’luk NP-40 50 µl ilaveli soğuk hipotonik tampon çözeltisinin 500 µl’si ile bir kere yıkandı. 200 µl tampon çözeltisiyle süspanse edildi ve 15.000 g’de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant yeni tüplere bırakıldı. Protein konsantrasyonu Lowry prosedürüne uygun bir şekilde protein ölçüm kiti kullanılarak (Sigma, St. Luis, MO, ABD) ölçüm yapıldı. Sonra süpernatantlara, % 2’lik β-merkaptoetanol içeren sodyum dodecyl sülfat-poliakrilamid jel (SDS-PAGE) elektroforezi tamponu ilave edildi. Elektroforez için SDS-PAGE jel içinde eşit miktarlarda (55 µg) protein kullanıldı. Ardından nitrosellülöz membranlara (Schleicher and Schuell Inc, Keene, NH, ABD) aktarıldı. Fosfat tampon tuzu (PBS) içinde nitrosellülöz membranlar 5 dakika süreyle 4 kez yıkandı. Primer antikor uygulamasından önce % 1’lik sığır serum albümini içerisinde yarım saat bekletildi. Primer antikor (mouse monoclonal ADİK4 antibody, sc-377063, Santa Cruz Biotechnology, ABD,

Rabbit polyclonal Anti-ACCN1 antibody, ab77384, Abcam, Cambridge, UK, Rabbit polyclonal Anti-ACCN2 antibody, ab87514, Abcam, Cambridge, UK) % 0.05 Tween-20 içeren aynı tampon içinde 1:1000 oranında seyretildi. Nitrosellülöz membran bir gece 4°C’de primer antikorlarıyla inkübe edildi. Daha sonra blotlar yıkandı ve sekonder antikorla [horseradish peroksidaz-conjugated goat anti mouse IgG (Abcam, Cambridge, UK)] inkübe edildi. Spesifik bağlanma, H₂O₂ ve diaminobenzidin alt birimleri kullanılarak tespit edildi. Protein yükleme β-aktin antikoruna (A5316; Sigma) karşı monoklonal mouse antikoruna kullanılarak kontrol işlemi yapıldı. Protein düzeyleri görüntü analiz sistemiyle (Image J; National Institute of Health, Bethesda, ABD) dansitometrik olarak analiz edildi.

4.6. İstatistiksel Değerlendirme

Bu tez çalışmasında istatistiksel değerlendirme; Fırat Üniversitesi Lisanslı (193.255.124.131) IBM SPSS 21.0 paket program kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirmede $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir. Gruplar arasındaki ekspresyon düzeyleri arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Student’s t testi kullanılmıştır. Uzaysal öğrenme verileri tekrarlayan ölçümler için iki yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi ve Tukey testi ile Post Hoc analizi yapılmıştır. Proteinlerin dansimetrik düzeylerindeki farklar ve probe test Mann-Whitney U testi ile belirlenmiştir.

5. BULGULAR

5.1. Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyon Sonuçları

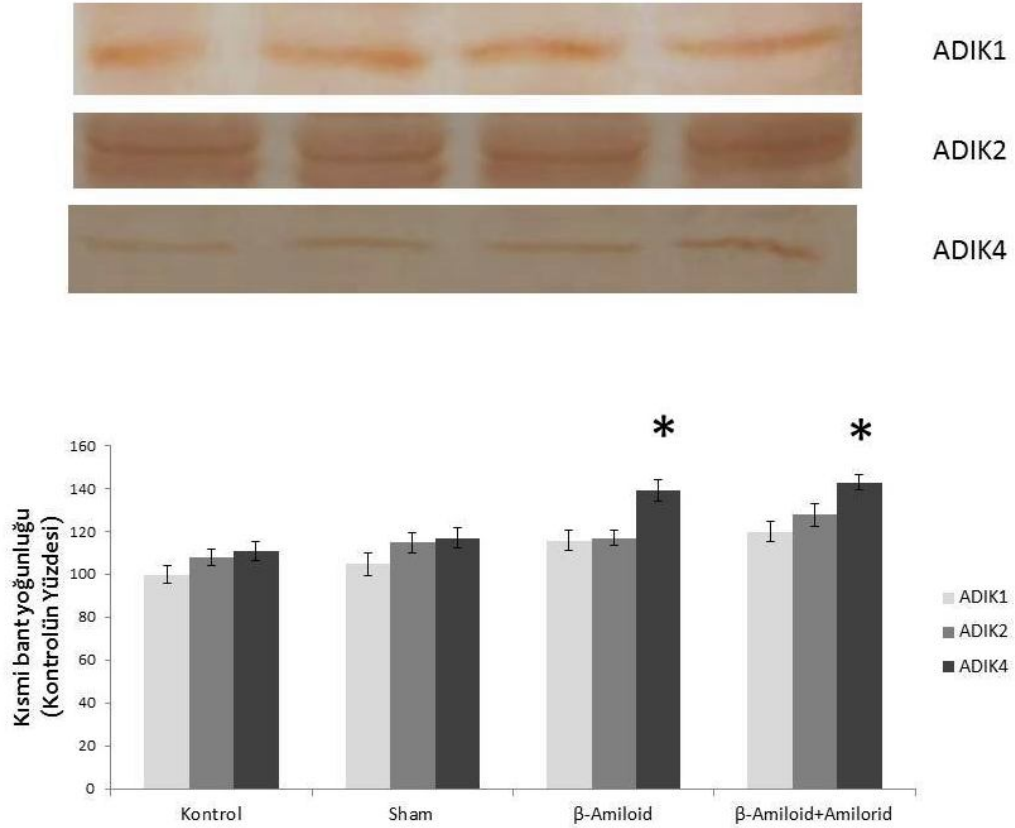
Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyon Analizi sonuçlarına göre kontrol grubu ile diğer gruplardaki ADİK1,2 ve 3 gen ekspresyonları karşılaştırıldığında ekspresyondaki azalmanın istatistiki olarak anlamlı düzeyde olmadığı belirlendi ($p>0.05$) (Şekil 10).



Şekil 10. Kontrol, sham, beta amiloid, beta amiloid+amilorid gruplarında ADİK1, ADİK2 ve ADİK3 iyon kanallarının mRNA kat artışı grafiği. Real time PZR sonuçları ADİK1, 2 ve ADİK 3 açısından gruplar arasında anlamlı farklılık olmadığını gösterdi. Her bir RT-PZR 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Sonuçlar her bir grupta 7-8 hayvan için ortalama $\pm$ SD olarak ifade edildi. Genlerin ekspresyon düzeyleri GAPDH'e göre normalize edildi. Hata barları standart sapmaları göstermektedir.

5.2. Western Blot Sonuçları

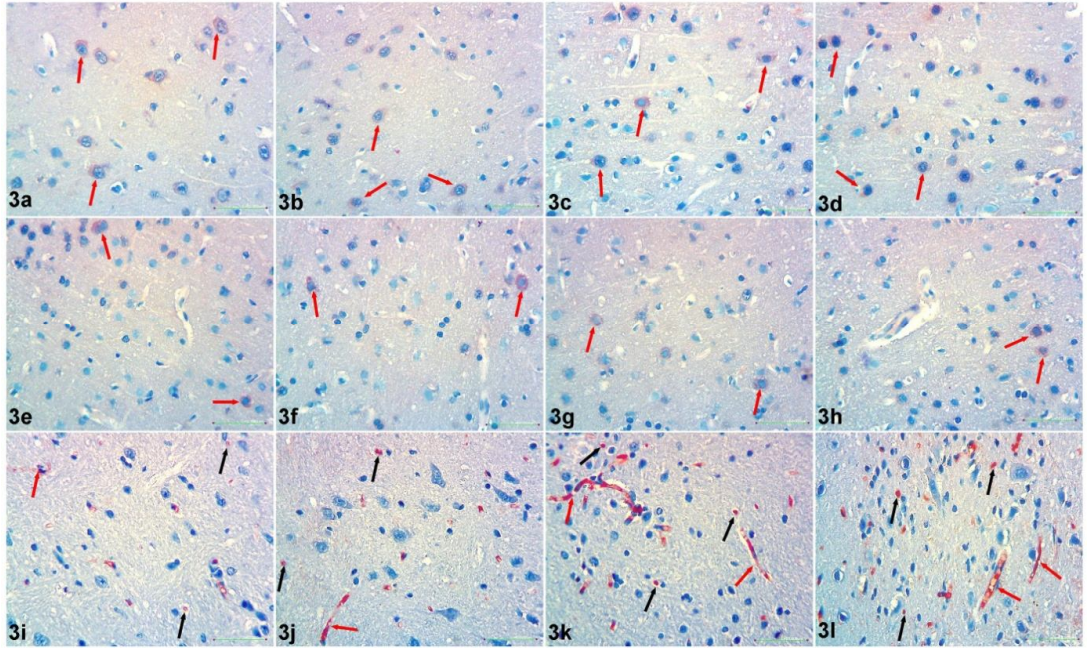
Western Blot analizleri sonucunda ADİK1 ve ADİK2 açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmezken, ADİK4'ün kontrol ve sham gruplarıyla karşılaştırıldığında beta amiloid ve beta amiloid+Amilorid gruplarında istatistiki olarak anlamlı oranda arttığı belirlendi.



Şekil 11. Kontrol, sham, beta amiloid, beta amiloid+amilorid gruplarının beyin homojen, zatlarındaki ADİK1, ADİK2 ve ADİK4 iyon kanallarının protein yoğunluğu. Western blotlar ve dansitometrik analizler ADİK1 ve ADİK2 açısından tüm gruplarda farklılık olmadığı gösterildi ancak ADİK4'ün kontrol ve sham gruplarıyla karşılaştırıldığında beta amiloid ve beta amiloid+amilorid gruplarında anlamlı olarak arttığı belirlendi. Tüm sütunlara protein homojenizatından eşit miktarda (55 μ g) yüklendi. Tüm proteinlerin bant yoğunlukları Lab Works programı kullanılarak doğrulandı. Sonuçlar her bir grupta 8-10 hayvanın ortalama $\pm$ SD olarak ifade edildi. Hata barları standart sapmaları göstermektedir.

5.3.İmmünohistokimya Sonuçları

ADİK1 ve ADİK2'nin nöronal ve glial hücrelerin özellikle sitoplazmalarını boyadığı gözlemlendi. ADİK4'ün immünreaktivitesinin vasküler aralıkta (redarrow) ve nöroglial hücrelerin nükleuslarında olduğu gözlemlendi. Western blot sonuçlarıyla uyumlu olacak şekilde ADİK4'ün boyanmasının şiddet ve yaygınlığının kontrol ve sham gruplarıyla karşılaştırıldığında beta amiloid ve beta amiloid+Amilorid gruplarında arttığı belirlendi.



Şekil 12. İmmünohistokimyasal boyama sonuçları

İmmünohistokimyasal boyamalar sonucu ADİK4 immünreaktivitesi kontrol ve sham grubunda ADİK4 immünreaktivitesi vasküler aralıkta +1 şiddetinde ve yaygınlığında gözlenmekle beraber (redarrow) nöroglial hücrelerin nükleuslarında da (blackarrow) +1 şiddetinde izlendi (şekil 12: 3a ve 3b). Kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında beta amiloid ve beta amiloid +amilorid grubunda grubun da ADİK4 immünreaktivitesinde vasküler aralıkta (redarrow) ve

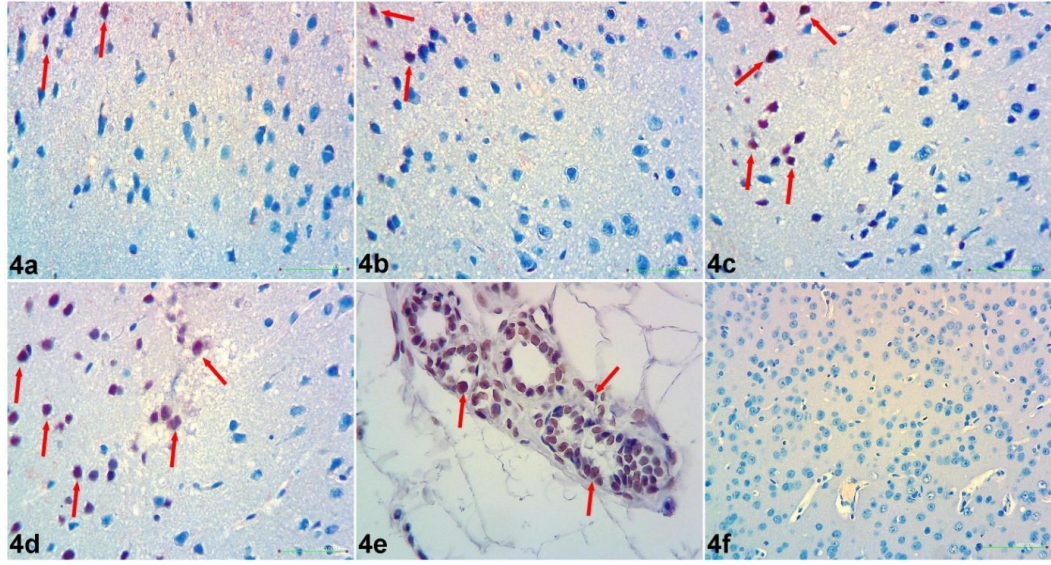
nörogial hücrelerin nükleuslarında (blackarrow) belirgin bir artış vardır ve +2 şiddetinde değerlendirildi (şekil 12: 3c ve 3d).

ADİK2 immünreaktivitesi kontrol ve sham gruplarında nöronal perinükleer lokalizasyonda (redarrow) +1 şiddetinde ve yaygınlığında gözlemlendi (şekil 12: 3e ve 3f). Kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında ise ADİK2 immünreaktivitesinde beta amiloid ve beta amiloid +Amilorid grubunda nöronal perinükleer lokalizasyonda (redarrow) belirgin bir değişim gözlenmedi ve +1 şiddetinde ve yaygınlığında değerlendirildi (şekil 12: 3g ve 3h).

ADİK 1 immünreaktivitesi kontrol ve sham grubunda nöronalperinükleer lokalizasyonda (redarrow) +1 şiddetinde (şekil 12: 3i ve 3j). Kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında ADİK1 immünreaktivitesinde beta amiloid grubunda nöronalperinükleer lokalizasyonda (redarrow) belirgin bir değişim gözlenmedi ve +1 şiddetinde ve yaygınlığında değerlendirildi (şekil 12: 3k ve 3l).

5.4. Tunel Sonuçları

Tunel deneylerinde kontrol ve sham gruplarıyla karşılaştırıldığında beta amiloid ve beta amiloid+Amilorid gruplarında apoptotik hücrelerin sayısının arttığı belirlendi. Beta amiloid ve beta amiloid+Amilorid grupları karşılaştırıldığında ise beta amiloid+Amilorid grubunda apoptotik hücre sayısının sadece beta amiloid verilen gruba göre azaldığı belirlendi.



Şekil 13. Kontrol, sham, beta amiloid, beta amiloid+amilorid gruplarının beyin kesitlerinde yapılan TUNEL boyama. Kontrol grubunda apoptotik hücrelerin yayılımı +1 (4a), sham grubundaki yayılım +1 (4b), beta amiloid grubundaki yayılım +3 (4c) ve beta amiloid+amilorid grubundaki apoptotik hücrelerin yayılımı +2 (4d) olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak meme dokuları (4e) kullanıldı. Negatif kontrol (4f). Skala bar: 50µm.

5.5. Öğrenme Deneyi Sonuçları

Bu deneyin sonuçları platform varlığında ardışık dört günün sonuçları ve platform olmaksızın yapılan beşinci günün sonuçları şeklinde ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur.

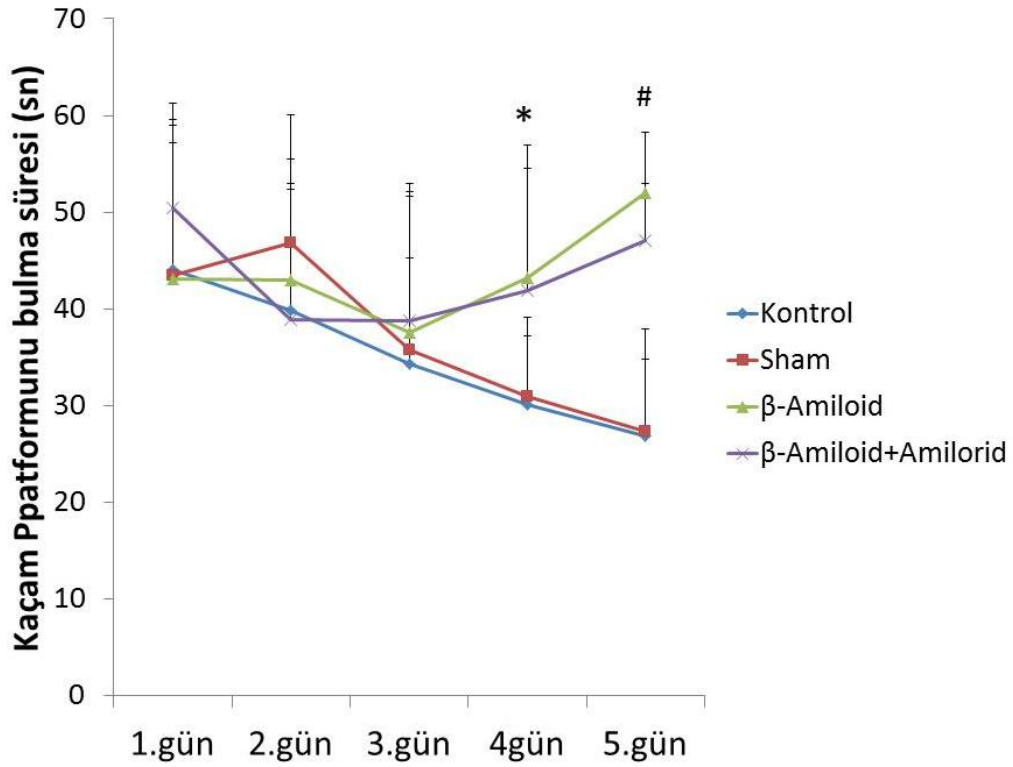
1.Gün: kontrol grubunda tüm yönlerin birinci gün ortalaması $44,03 \pm 15,54$, sham grubunun $43,47 \pm 13,74$, beta amiloid grubunun $43,10 \pm 15,87$ ve beta amiloid+Amilorid grubunda $50,50 \pm 10,7$ 'dir.

2.Gün: kontrol grubunda tüm yönlerin ikinci gün ortalaması $39,81 \pm 13,18$, sham grubunun $46,82 \pm 13,30$, beta amiloid grubunun $43,03 \pm 12,42$ ve beta amiloid+Amilorid grubunda $38,84 \pm 13,56$ 'dır.

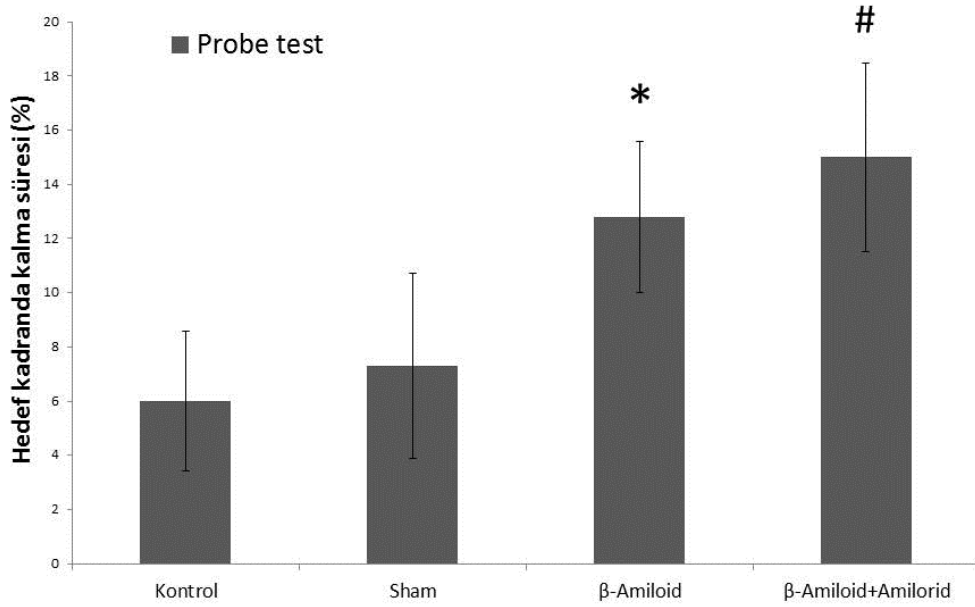
3.gün: kontrol grubunda tüm yönlerin üçüncü gün ortalaması $34,37 \pm 17,80$, sham grubunun $35,80 \pm 9,42$, beta amiloid grubunun $37,55 \pm 14,15$ ve beta amiloid+Amilorid grubunda $38,81 \pm 14,12$ 'dir.

4.gün: kontrol grubunda tüm yönlerin dördüncü gün ortalaması $30,15 \pm 9,01$, sham grubunun $30,97 \pm 6,20$, beta amiloid grubunun $43,26 \pm 11,23$ ve beta amiloid+Amilorid grubunda $41,96 \pm 15,03$ 'tür.

5.gün: kontrol grubunda tüm yönlerin beşinci gün ortalaması $26,91 \pm 10,97$, sham grubunun $27,36 \pm 7,41$ beta amiloid grubunun $51,95 \pm 6,29$ ve beta amiloid+Amilorid grubunda $47,09 \pm 5,88$ 'dir (şekil 14).



Şekil 14. Grupların Morris su tankı performansları. Başlama noktasından görünmez platformu bulana kadar geçen sürenin (platformu bulma süresi) günlük değişimi. *4. gün kontrol, sham gruplarıyla β-amiloid grup karşılaştırması. # 5 gün kontrol, sham gruplarıyla β-amiloid ve β-amiloid+Amilorid grup karşılaştırması.



Şekil 15. Probe test; MWM 60 saniyelik süre boyunca hedef kadranda harcadığı zaman oranı. *Kontrol ve sham gruplarıyla β-amiloid grup karşılaştırması. #Kontrol ve sham gruplarıyla β-amiloid+Amilorid grup karşılaştırması.

Morris yüzme testi öğrenme deneyinde kontrol grubuyla sham grubu karşılaştırıldığında tüm günlerde $p > 0,05$ olduğundan farklılık bulunmadı. Hatırlama deneyi olan 6. gün deneyinde (probe trial) $p > 0,05$ olduğundan anlamlı kabul edilmedi.

Kontrol grubuyla β-amiloid grubu karşılaştırıldığında birinci, ikinci ve üçüncü günlerde platformu bulma süreleri açısından $p > 0,05$ olduğundan farklılık bulunmadı, fakat dördüncü ve beşinci günlerde platformu bulma süreleri açısından farklılık bulundu. (4.günde $p=0,011$ ve 5.günde de $p=0,000$)

Kontrol grubuyla β-amiloid+Amilorid grubu karşılaştırıldığında birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü günlerde platformu bulma süreleri açısından $p > 0,05$ olduğundan farklılık bulunmadı, fakat beşinci günde platformu bulma süreleri açısından farklılık bulundu (5.günde $p=0,000$) Hatırlama deneyi olan 6. gün deneyinde (probe trial) $p < 0,05$ olduğundan anlamlı kabul edildi.

Sham grubuyla β -amiloid+Amilorid grubu karşılaştırıldığında birinci, ikinci ve üçüncü günlerde platformu bulma süreleri açısından $p > 0,05$ olduğundan farklılık bulunmadı, fakat dördüncü ve beşinci günlerde platformu bulma süreleri açısından farklılık bulundu.(4.günde $p=0,05$ ve 5.günde de $p=0,000$) Hatırlama deneyi olan 6. gün deneyinde (probe trial) $p < 0,05$ olduğundan anlamlı kabul edildi.

β -amiloid grubuyla β -amiloid+ Amilorid grubu karşılaştırıldığında tüm günlerde $p > 0,05$ olduğundan farklılık bulunmadı. Hatırlama deneyi olan 6. gün deneyinde (probe trial) $p > 0,05$ olduğundan anlamlı kabul edilmedi.

Sham grubuyla β -amiloid grubu karşılaştırıldığında birinci, ikinci ve üçüncü günlerde platformu bulma süreleri açısından $p > 0,05$ olduğundan farklılık bulunmadı fakat dördüncü ve beşinci günlerde platformu bulma süreleri açısından farklılık bulundu.(4.günde $p=0,005$ ve 5.günde de $p=0,000$) Hatırlama deneyi olan 6.gün deneyinde (probe trial) $p < 0,05$ olduğundan anlamlı kabul edildi.

Sonuç olarak kontrol ve deney grubu farelerin platformu bulma süreleri ve platformlu yarı alanda geçirdikleri sürelerin toplam sürenin yüzdesi cinsinden değerleri için gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada anlamlı fark bulundu. Ancak amiloridin yer bulma öğrenmesini etkilemediği bulunmuştur.

6. TARTIŞMA

Bu çalışmada deney hayvanlarında Beta-amiloid (1-42) enjeksiyonu ile indüklenmiş Alzheimer modelinde bozulmuş kognitif fonksiyonlar üzerine ADİK gen ekspresyonlarının ve bir ADİK blokeri olan amiloridin olası etkisi araştırılmıştır. Özellikle sodyum iyon kanallarının AH etyopatogenezindeki rolünün ortaya konması için yaptığımız çalışmamızda 2 adet ana bulgu elde edilmiştir. İlk olarak değerlendirdiğimiz sodyum kanallarından ADİK 1,2 ve 3 açısından gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı farklılık bulunmamasına rağmen ADİK 4'ün kontrol ile karşılaştırıldığında Beta amiloid grubunda anlamlı olarak arttığı belirlendi. İkinci olarak Tunel deneyinde ADİK blokeri olarak amilorid verilen grupta beta amiloid grubuna göre apoptotik hücre sayısının daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Senil demansların çoğunluğundan sorumlu olan AH yavaş ilerler ve beyin nöronlarını etkiler. Şu ana kadar hastalığın ilerlemesiyle ilişkili beyinde birikim gösteren ve fonksiyon bozukluklarına neden olan iki ana protein tanımlanmıştır. Birincisi, aşırı nörotoksisiteye neden olan ve senil plakların büyük bir bölümünü oluşturan beta amiloid ($A\beta$) 40-42 peptitlerdir. Bu peptitler amiloid öncü proteinin β ve γ sekretazlar tarafından kesilmesiyle oluşurlar (111). İkincisi ise tau proteini olup Tau'nun hiperfosforilasyonu ile proteoliz direçli nörofibril yumaklar oluşur. $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$ ve NFT nöronlar için toksiktir ve hücre ölümünü kolaylaştırır (112). AH patogenezinde $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$ ve NFT'nin ilişkisi tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak nöronların sitoplazmalarındaki Ca^{2+} miktarındaki artışın $A\beta_{42}$ birikimiyle ilişkili olduğu görülmüştür. Son zamanlarda $A\beta$ oligomerlerinin nöron plazma

membranında Ca^{2+} geçirgen kanallar olarak rol oynadığı ve bu nedenle hücre içindeki Ca^{2+} konsantrasyonunu doğrudan etkilediği belirlenmiştir (113).

Alzheimer hastalığında bu bilinen ana mekanizmaların dışında kalsiyum iyon kanalları, voltaj kapılı sodyum kanalları ve potasyum kanallarının da hastalığın etyopatogenezi ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir (114, 115, 116).

AH etyopatogenezinde sodyum ve sodyuma geçirgen iyon kanallarının rolleri tartışılmadan önce genel olarak potasyum ve kalsiyum iyonlarının ve bu iyonlara geçirgen bazı iyon kanallarının AH etyopatogenezindeki rollerinin genel olarak değerlendirilmesi gerekmektedir. AH'nın periferik dokularında ve nöronlarında potasyum kanal anomalilerinin olduğu rapor edilmiştir. Hücre uyarılabilirliğinde önemli bir belirleyici olan potasyum kanalları nöronlar, glia ve lenfositler gibi çeşitli hücrelerde hücresel aktiviteyi düzenlerler. Memelilerde potasyum kanal aktivitesini etkileyen in vivo mutasyonların hafıza ve öğrenmeyle ilişkili olarak bilişsel süreci düzenlediği bildirilmiştir. İn vivo AH modellerinde A β 1–40 tarafından Kv4.2 ve Kv 4.3 ve A β 1–42 tarafından Kv3.4 potasyum iyon kanal ekspresyonunda artış olduğu belirlenmiştir (117, 118, 119, 120, 121).

Kalsiyum kanalları ve hücre içi kalsiyum sinyalizasyonundaki değişikliklerin AH etyopatogenezinde önemli roller oynadığı bilinmektedir. Nöronlar, hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonlarında ki herhangi bir değişikliğe karşı oldukça hassastır. Yetersiz hücre içi Ca^{2+} miktarı nöronların anormal fonksiyonlarına yol açarken, fazlası da hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu nedenle Ca^{2+} miktarındaki küçük dalgalanmalar nöronların uzun yaşamları üzerinde çok zararlı etkiler ortaya çıkarabilmektedir. Sinir sisteminin en önemli ikinci habercisi olan Ca^{2+} kaynaklı sinyal iletimi çoğalma, salgılama, gen

ekspresyonu, ATP üretimi ve hafıza oluşumu gibi nöronal fonksiyonları düzenleyerek hücre ölümü ve yaşamı arasındaki dengenin sürdürülmesini sağlar. Nöronal Ca^{2+} girişi farklı Ca^{2+} geçirgen kanallar tarafından sağlanır. Bu kanallara örnek olarak plazma membranındaki voltaj kapılı Ca^{2+} kanalları, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri, α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit (AMAA) reseptörü, nikotinik reseptörü ve depo kontrollü Ca^{2+} kanalları verilebilir. Bu kanalların aynı zamanda AH etyopatogenezinde de bazı fonksiyonlara sahip oldukları gösterilmiştir (113).

Alzheimer hayvan modellerinde endoplazmik retikulumdan serbest bırakılan Ca^{2+} iyonlarındaki artışın hafıza kaybına neden olduğu ve AH bağlı hücresel patolojilerin oluşumunu kolaylaştırdığı gösterilmiştir. Nöronlarda L tipi voltaj duyarlı Ca^{2+} kanalları artışı, yaşlı sıçanlarda hafıza bozukluğuna ve hipokampal plastisite değişikliğine sebep olmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise AH patogenezinde depo kontrollü Ca^{2+} kanallarının da önemli olabileceği görülmüştür (122, 123) .

Alzheimer hastaların etyopatogenezinde önemli rolü olduğu belirlenen diğer bir grup iyon kanalı ise sodyuma geçirgen iyon kanallarıdır. Sodyum iyonunun AH'deki rolü ile ilgili olarak elde edilen en önemli bulgu AH hastalarının beyin nöronlarındaki hücre içi sodyum miktarlarında artışların tespit edilmesidir. Victor ve ark Alzheimer'lı hastalar ve sağlıklı kontrol gruplarının belirli beyin bölgelerindeki sodyum ve potasyum iyon miktarlarını karşılaştırdıklarında Na^{+} 'nın frontal (%25) ve parietal kortekste (%20), K^{+} 'nın serebeller de (%15) istatistiksel olarak önemli derecede arttığını bulmuşlardı (124). Mellon ve ark Alzheimer hastalarının beyinlerinde yapılan manyetik

rezonans sodyum görüntüleme çalışmaları sonucunda, Alzheimer hastalarının beyinlerinde hücre içi sodyumun kontrolle karşılaştırıldığında %10 daha fazla olduğunu belirlemişlerdir (125). Hücre içi sodyum miktarındaki artışın temel nedeninin hücre içi sodyumun hücre dışına ve potasyumun hücre içine girmesini sağlayan Na^+/K^+ -ATPaz enziminin bozulması sonucu hücre içine fazla Na^+ girişi olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu bulguyu destekleyecek şekilde Dickey ve ark. Alzheimer'ın bir modeli olan APP+Presenilin 1 transgenik farelerin hipokampuslarında Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinin ve protein seviyesinin düştüğünü bulmuşlardır (126). Benzer şekilde Amiloid beta-protein fragment 25-35 ($\text{A}\beta$ 22-35)'in intraserebroventriküler enjeksiyonunu takiben 12 gün sonra yapılan mikroarray analizleri sonucunda özellikle Na^+/K^+ -ATPase geninin ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir (127).

Alzheimer hastalarındaki hücre için sodyum artışındaki nedenlerden birinin de hücre içine sodyum girişini sağlayan iyon kanal ekspresyonlarındaki artışlar veya aktivitelerindeki değişimler olabileceği düşünülmektedir. Bu görüşü destekleyen en önemli bulgu beta sekretaz olarak bilinen BACE1 (β -site APP cleaving enzyme 1) in kortikal bölgelerde voltaj kapılı sodyum kanallarının β 2 alt ünitesinin ($\text{Nav}\beta$ 2) kesimidir (128). Membran bağlı bir aspartik proteaz olan BACE1 beyinde oldukça fazla miktarda eksprese olmaktadır. Aynı zamanda AH'de amiloid peptitlerin oluşması için amiloid öncü proteinleri kesen hız kısıtlayıcı enzim olarak görev yapmaktadır. BACE1 düzeyleri AH hastalarında ve APP farelerde artmıştır. Artmış BACE1 düzeyleri ve aktivitesi AH hastalarında $\text{Nav}\beta$ 2 kesimi ile beraberlik göstermektedir (128). BACE1 null farelerin nöronlarının elektro fizyolojik özellikleri değişmiştir ve bu fareler spontan ataklar

geçirirler. Bu farelerde sodyum kanallarındaki eksikliklerden dolayı voltaj bağımlı sodyum akım inaktivasyonunda pozitif bir kayma gösterirler. Alzheimer hastalarının beyinlerinde artmış BACE1 düzeyleriyle paralel olarak Nav 1.1 α alt birimin ve Nav $\beta 2$ C terminal faragmentininde arttığı belirlenmiştir (129). Bu bulgular Alzheimer hastalarında değişmiş sodyum iyon düzenlenmesinin olduğunun ve sürece en önemli katkının BACE1 ve Nav 1.1 α tarafından yapıldığını göstermesine rağmen diğer sodyum iyon kanallarının bu yolak dışında asidoz ya da pH değişimleriyle katkıda bulunup bulunamayacağı bilinmemektedir. Çalışmamızda değerlendirilen ADİK iyon kanaları özellikle pH duyarlı olarak aktive olan sodyum kanaları olup Alzheimer hastalarının beyinlerindeki pH değişimleriyle aktive olabilecekleri düşünülmektedir.

Alzheimer hastaların etyopatogenezinde rol alabileceği ileri sürülen sodyum kanalları içerisinde ADİK'ler en önemli adaylardandır. ADİK'lerin çeşitli nörolojik hastalıklardaki rolleri halen tam olarak bilinmemektedir ve bu alandaki çalışmalar hızlı bir şekilde devam etmektedir. Dört farklı alt birimi olan ADİK'lerin çeşitli nörolojik hastalıklarla ilişkili oldukları gösterilmiştir. Sinapslarda lokalize olan ADİK 1a kanalının sinaptik plastisitede öğrenme ve hafıza katkıda bulunduğu belirlenmiştir. Özellikle ADİK1a kanallarının multipl skleroz, huntington epilepsi ve depresyon gibi nörolojik hastalıklarda kritik roller oynadığı gösterilmiştir. Bu nedenle bu kanalların aktivasyonlarının kontrolünün asidoz ilişkili merkezi sinir sistemi bozukluklarında bir tedavi yaklaşımı olabileceği düşünülmektedir (45).

Asidoz, serebral iskemi reperfüzyon hasarı sonrasında beyin hasarı özelliğidir. Asit baz dengesinin vücut sıvısında fazla asit doğrultusunda bozulması

sonucu oluşan patolojik bir durumdur. Asidozun iki tipi vardır; metabolik asidoz ve solunumsal asidoz. Solunumsal asidoz, hipoventilasyona bağlı olarak kandaki karbondioksitin artması sonucudur. Hidrojen iyon konsantrasyonu artar. Metabolik asidoz, böbrekler yoluyla atılması gereken asit iyonlarının birikmesi ve aşırı bikarbonat iyonun kaybedilmesi durumudur (130). Metabolik asidoz genellikle nörodejeneratif hastalıklarda ortaya çıkar. Rat hipokampal nöron hücre kültürlerinde, amiloid betanın hücre ekspresyon seviyelerinin asidozla arttığı rapor edilmiştir (131). Alzheimer hastalığının bir kemirgen modelinde, asidozun amiloid beta birikiminde katkıda bulunduğunu görülmüştür (132, 133). Bu çalışmalar asidozun, amiloid beta ve plak birikiminin bozulmasına sebep olarak Alzheimer hastalarında nöronal fonksiyon bozukluğuna yol açabileceğini göstermektedir (134). Doku inflamasyonu, iskemik yaralanma, travmatik beyin hasarı ve epileptik nöbetler gibi patolojik şartlar ve artan anaerobik glikoz metabolizması nedeniyle biriken laktik asit ve ATP hidrolizinden açığa çıkan protonlar doku pH'sının azalmasıyla sonuçlanan asidoz durumunu meydana getirir. Asidoz, periferel duyu ve merkezi nöronlarda yoğun olarak eksprese olan asit duyarlı iyon kanallarını aktive edebilir. Asidoz aracılı nöronal yaralanmada ADİK1a aktivasyonu önemli bir rol oynar. ADİK1a gibi ADİK2'inde, asidoz kaynaklı nöron ölümünde de rol oynadığı gösterilmiştir (57,79, 135).

Asidoz aynı zamanda bu fonksiyonuna ek olarak AH'de ADİK'lerin aktivitesini değiştirerek katkıda bulunabilir. Bu kanalların ortak özelliği pH değişimlerine duyarlı olmalarıdır. Stabil pH normal hücresel fonksiyonlar için kritiktir. Fizyolojik durumlarda hücre dışı pH = 7.3 ve hücre içi pH = 7.0' dır (136). Bu stabil pH değerleri çeşitli H⁺ transport mekanizmalarıyla

korunmaktadır. Doku inflamasyonu beyin iskemisi, nörotravma ve epileptik nöbet gibi patolojik durumlar artmış anaerobik glikoz metabolizmasından dolayı laktik asidin birikimine ve ATP hidrolizi sonucu H^+ salınımı doku pH'sında belirgin azalmaya neden olur. Bu durum asidoz olarak bilinmektedir. Ciddi iskemik hasarlarda beyindeki pH'sının 6.0'ın altına düştüğü gösterilmiştir (137). pH'daki değişimler nöronların fizyolojisi üzerinde önemli etkilere sahiptir ve patolojik durumlarda nöronal hasarın gidişatını etkiler. Orta derecedeki asidozun NMDA'da kanallarının proton inhibisyonuna neden olarak nöronların uyarıcı hasarın azalttığı rapor edilmiştir. Diğer taraftan ciddi asidoz nöronal hasarı indüklemektedir. Bu pH değişimleri tarafından aktive edilen ADİK'lerin nörolojik hastalıklar için yeni farmakolojik hedefler olabilecekleri öngörülmektedir. Merkezi sinir sistemi hastalıklarıyla ilişkili olan patolojik asidozun iskemide pH = 6.5-6.0, ataklarda pH = 6.8, AH'daki pH = 6.6 değer aralıklarında ADİK1a kanallarını aktive edebileceği gösterilmiştir (138, 139). Çalışmamızda sodyum ve kalsiyuma geçirgen olan ADİK1a kanallarının ekspresyonlarında gruplar arasında farklılıklar bulunmamasına rağmen bu durum kanalın aktivitesindeki artışın ya da azalmanın göstergesi olmadığı açıktır. Bu kanalın Alzheimer hastalarının beyinlerindeki pH değişimleriyle aktive olarak hücre içi sodyum iyonlarının artışına katkıda bulundukları muhtemeldir. Özellikle bu kanalların fare Alzheimer modellerinde Patch Clamp çalışmalarıyla araştırılarak pH değişimleriyle veya amiloid peptid gibi AH'de birikim gösteren proteinlerle aktivitelerinin değişip değişmediğinin gösterilmesi gerekmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz diğer bir bulgu olan sadece sodyuma geçirgen ADİK2 ve ADİK3 kanallarının ekspresyonlarında değişim tespit edilmemiştir. ADİK2 iyon kanalı pH = 5.0 da

aktive olurken ADİK3 iyon kanalı pH = 4.0 da aktive olmaktadır (45). Her iki kanalında AH'lıların beyinlerindeki pH = 6.6 değerlerinde aktive olmaları mümkün görünmektedir. Bu bulgu her iki kanalında Alzheimer hastaların etyopatogenezinde önemli roller üstlenmeyebileceğini göstermektedir. Ancak Maysami ve ark. farelerde Aβ1-42 (100nM) uygulamasının ADİK'lerin aktivasyonunu yavaşlattığını ve genliğini inhibe ettiğini görmüşlerdir. Bu bulgu ekspresyon ve pH değişimlerinden bağımsız olarak ADİK'lerin AH beyinlerinde birikim gösteren çeşitli peptidlerce aktive edilebileceğini göstermektedir (105).

ADİK4 DEG/ENaC iyon akanla ailesinin bir üyesi olup diğer ADİK'ler gibi hücre dışı pH'daki düşmelerle aktive olmaz. Bu özelliğiyle diğer ADİK'lerden ayrılmaktadır. Son zamanlarda yapılan ve ADİK4'ün hücre içindeki lokalizasyonunu belirlemeye yönelik bir çalışmada ADİK4'ün plazma membranından ziyade hücre içi organeller de özellikle endozomal lizozomal yollarda bir rolü olabileceğini ileri sürmektedir (140). ADİK4'ün diğer ADİK'lerin plazma membranındaki fonksiyonel lokalizasyonunu azalttığı belirlenmiştir (141). Çalışmamızda tespit etmiş olduğumuz ADİK4'ün miktarındaki artışın beta amiloid grubunda diğer ADİK'lerin miktarlarındaki artışı azaltarak normale edebileceği ve bu şekilde beta amiloidin neden olduğu nöronal ölüme karşı koruyucu bir fonksiyon gösterebileceği düşünülmektedir.

Amilorid epitelyal sodyum kanalının seçici olmayan antagonistidir. Hipertansiyon tedavisinde kullanılan potasyum koruyucu diüretiktir. İskemik felç, beyin travması ve epilepsi tedavisinde nörolojik korunmada farmakolojik hedefler olarak kabul edilir. Amilorid ve analogları voltaj kapılı kalsiyum kanalı, GABA reseptörleri, mechanosensitive kanalları etkiler. Amilorid aynı zamanda $\text{Na}^+ \text{-H}^+$

değiştirici izoformlarını inhibe eder (142). Çalışmamızda kullanılan amiloridin öğrenme üzerinde ciddi etkilerinin olmadığı belirlenmiştir. Ancak amiloridin diğer gruplarla karşılaştırıldığında TUNEL deneylerinde apoptotik hücre sayısını artırdığı belirlenmiştir. Çalışmamızda ilk olarak kullanılan 10mg/kg/gün (143,144) dozunda hayvanların bir kısmı ilk birkaç gün içinde kaybedilmiştir. Bu nedenle doz 5mg/kg/gün olarak tekrar uygulanmıştır. Bu nedenle amilorid kullanılarak yapılacak hayvan deneyi çalışmalarda kullanmış olduğumuz 5mg/kg/gün ve 10mg/kg/gün dozlarından daha düşük dozlarında etkinliğinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Çalışmamızda her ne kadar bu doz değerleri literatür verilerine göre belirlenmiş olsada literatürde bu konuda in vivo deneylerin oldukça yetersiz olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak, özellikle ADİK4'ün immün lokalizasyonundaki artışlar, ADİK'lerin hücre içerisindeki sodyum iyon düzeylerini etkileyerek Alzheimer etyopatogenezinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Verilerimiz fare Amiloid beta Alzheimer modelinde ADİK1,2,3 ekspresyonlarının değişmediğini göstermiştir. ADİK ailesine ait bu üç üyenin AH'deki fonksiyonlarını ekspresyon değişikliklerinden öte AH'de tespit edilen pH değişiklikleriyle sağlamaları muhtemeldir. AH beyin hücre iyon dengesindeki bir bozulmanın beyin hücrelerindeki ADİK 4'ün aktivitesini ve ekspresyonunu etkileyebileceğini göstermektedir. Çağımızın önemli sağlık sorunları arasında yerini almaya başlayan bellek sorunlarına ilişkin yeni tedavi yaklaşımlarının sağlanabilmesi konunun nörobiyolojisinin daha iyi anlaşılması ile mümkün olabilecektir. Bu nedenle ADİK'lerin etki mekanizmasını daha iyi anlamaya yönelik çalışmaların yapılmasına ihtiyacı vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Adams RD, Victor M, Ropper AH. Principles of neurology. Sixth edition McGraw-Hill Comp. 1997(pp.608).
2. Forlenza OV, Diniz BS, Gattaz WF. Diagnosis and biomarkers of predementia in Alzheimer's disease. BMC Med 2010; 8: 89.
3. Xiang-Ping C, Wang JQ, Zhi-Gang X. Acid-Sensing Ion Channels in Neurodegenerative Diseases: Potential Therapeutic Target. Neurodegenerative Diseases - Processes, Prevention, Protection and Monitoring 2011;477-502.
4. Chu XP, Papasian CJ, Wang JQ, Xiong ZG. Modulation of acid-sensing ion channels: molecular mechanisms and therapeutic potential. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. 2011;3:288-309.
5. Baysal Aİ, Yeşilbudak Z. Alzheimer Hastalığı'nın klinik bulguları. Türkiye Klinikleri Journal of Neurology 2003;1:1-5
6. Özbabalık BD. Alzheimer demans ve serebral iskemi. Türk Serebrovasküler Hastalıklar Dergisi 2007; 13: 33-35.
7. Yoshitake T, Kiyohara Y, Kato I, et al. Incidence and risk factors of vascular dementia and Alzheimer's disease in a defined elderly Japanese population: the Hisayama Study. Neurology 1995;45:1161-1168.
8. Heininger K. A unifying hypothesis of Alzheimer's disease. III. Risk factors. Hum Psychopharmacol 2000; 15: 1-70.
9. Mehta KM, Kalmijn S, Slioter AJ, et al. Head trauma and risk of dementia and Alzheimer's disease: The Rotterdam Study. Neurology 1999;53:1959-1962.
10. Forbes WF, Hill GB. Is exposure to aluminum a risk factor for the development of Alzheimer disease?--Yes. Arch Neurol 1998;55:740-1.
11. Ewins DL, Rossor MN, Butler J, et al. Association between autoimmune thyroid disease and familial Alzheimer's disease. Clin Endocrinol (Oxf) 1991;35:93-96.
12. Geerlings MI, Ruitenberg A, Witteman JC, et al. Reproductive period and risk of dementia in postmenopausal women. JAMA 2001;285:1475-1481.
13. Veld BA, Ruitenberg A, Hofman A, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. N Engl J Med 2001;345:1515-21.
14. Almeida OP, Hulse GK, Lawrence D, Flicker L. Smoking as a risk factor for Alzheimer's disease: contrasting evidence from a systematic review of case-control and cohort studies. Addiction 2002; 97 : 15-28.
15. van Duijn CM, Hofman A. Relation between nicotine intake and Alzheimer's disease. BMJ 1991;302 : 1491-1494.
16. Karakaş HM, Tunçbilek N. Alzheimer hastalığının erken dönemde görüntülenmesi. Türkiye Klinikleri Journal of Neurology 2003;1:74-82.
17. Memiş L, Sezer C. Alzheimer hastalığında patolojik bulgular. Türkiye Klinikleri Journal of Neurology 2003;1(1):27-31.
18. Shi J, Perry G, Smith MA, et al. Vascular abnormalities the insidious pathogenesis of Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 2000; 21: 357-61.
19. Busfield F, Goate AM. The genetics of Alzheimer's disease and mutations in the amyloid protein precursor gene. Academic press 1995;59-78.
20. Lendon CL, Ashall F, Goate AM. Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics. JAMA 1997;277: 825-31.

21. Sherrington R, Rogaev EI, Lians Y, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995;375:754-60.
22. Saunders AM, Schmader K, Breitner JC et al. Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 1994;43:1467-1472.
23. Selkoe DJ. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease Hypothesis: Alzheimer's Disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid β -protein. *Ann N Y Acad. Sci* 2000; 924:17-25.
24. Benveniste EN, Nguyen VT, O'Keefe GM. Immunological aspects of microglia:relevance to Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2001; 39:381-91.
25. Ladu MJ, Shah JA, Reardon CA, et al. Apolipoprotein E and Apolipoprotein E receptor modulate a beta-induced glial neuroinflammatory responses. *Neurochem Int* 2001; 39:427-34.
26. Bisaglia M, Venezia V, Piccoli P, et al. Acetaminophen protects hippocampal neurons and PC12 cultuturs from amyloid beta-peptides induced oxidative stress and reduced NF-Kappa B activation. *Neurochem Int* 2002; 43-54.
27. Harkany T, Abraham I, Konya C, et al. Mechanisms of beta amyloid neurotoxicity. Perspectives of Pharmacotherapy. *Rev Neurosci* 2000;11:329-82.
28. Racchi M, Govoni S. The pharmacology of amyloid precursor protein processing. *Experimental Gerontology* 2003;38:145-57.
29. Howlett DR, Simmons DL, Dingwall C, Christie G. In search of an enzyme: the beta-secretase of Alzheimer's disease is an aspartic proteinase. *Trends Neurosci* 2000;23:565-70.
30. Cole SL, Vassar R. The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol Neurodegener* 2007; 15:2-22.
31. Behl C. Alzheimer's disease and oxidative stress: Implications for novel therapeutic approaches. *Progress in Neurobiology* 1999;57:301-23.
32. St-George-Hyslop PH: Alzheimer Hastalığının Moleküler Genetiği, Alzheimer Hastalığı Terry RD, Katzman R, Bick KL, Sisidia SS (Ed), Gürvit H (Çeviri Editörü) İstanbul Yelkovan yayıncılık 2001; 311:6.
33. Dodel RC, Hampel H, Du Y. Immunotherapy for alzheimer D. *The Lancet Neurology* 2003;2:215-20.
34. Mattson MP, Barger SW, Cheng B, et al. β Amiloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca^{+2} homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 1993; 16:409-14.
35. Greenberg SM, Kosik KS. Secreted beta-APP stimulates MAP kinase and phosphorylation of tau in neurons. *Neurobiol Aging* 1995;16:403-7.
36. Baumann K, Mandelkow EM, Biemat J, et al. Abnormal Alzheimer like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Let.* 1993;336:417-24.
37. Mandelkow EM, Mandelkow E. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 1998;8:425-7.
38. Forlenza OV, Diniz BS, Gattaz WF. Diagnosis and biomarkers of predementia in Alzheimer's disease, *BMC Med* 2010; 8: 89.
39. Eroğlu E. Alzheimer Hastalığı'nda Tedavi. *Türkiye Klinikleri Nöroloji Dergisi* 2003;1:6-12.
40. Akay A, Sümer-Turanlıgil N, Uyanıkgil Y. Ion Channels and Their Roles on The Pathogenesis of Epilepsy. *Archives Medical Review Journal* 2010; 19: 72-84. Turkish.
41. Gründer S, Chen X. Structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels (ASICs): focus on ASIC1a. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2010;2(2):73-94.

42. Deval E, Gasull X, Noël J, et al. Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain. *Pharmacol Ther* 2010;128:549-58.
43. Leng T, Shi Y, Xiong ZG, Sun D. Proton-sensitive cation channels and ion exchangers in ischemic brain injury: New therapeutic targets for stroke? *Prog Neurobiol* 2014;pii:S0301-0082(14)00014-8doi: 10.1016/j.
44. Babini E, Paukert M, Geisler HS, Grunder S. Alternative splicing and interaction with di- and polyvalent cations control the dynamic range of acid-sensing ion channel 1 (ASIC1). *J Biol Chem* 2002; 277: 41597-41603.
45. Babini E, Paukert M, Geisler HS, Grunder S. Alternative splicing and interaction with di- and polyvalent cations control the dynamic range of acid-sensing ion channel 1 (ASIC1). *J Biol Chem* 2002; 277: 41597-41603.
46. Benson CJ, Xie J, Wemmie JA, et al. Heteromultimers of DEG/ENaC subunits form H⁺-gated channels in mouse sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2002; 99: 2338-2343.
47. Jiang Q, Li MH, Papasian CJ, et al. Characterization of acid-sensing ion channels in medium spiny neurons of mouse striatum. *Neuroscience* 2009; 162: 55 – 66.
48. Xiong ZG, Zhu XM, Chu XP, et al. Neuroprotection in ischemia: blocking calcium permeable acid-sensing ion channels. *Cell* 2004; 118: 687-698.
49. Askwith CC, Wemmie JA, Price MP, Rokhlina T, Welsh MJ. Acid-sensing ion channel 2 (ASIC2) modulates ASIC1 H⁺-activated currents in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 2004; 279: 18296-18305.
50. Chen CC, England S, Akopian AN, Wood JN. A sensory neuron specific, proton-gated ion channel. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998; 95: 10240 – 10245.
51. Bässler EL, Nqo-Anh TJ, Geisler HS, Ruppersberg JP, Gründer S. Molecular and functional characterization of acid-sensing ion channel (ASIC) 1b. *J Biol Chem* 2001; 276: 33782-33787.
52. Hoagland EN, Sherwood TW, Lee KG, Walker CJ, Askwith CC. Identification of a calcium permeable human acid-sensing ion channel 1 transcript variant. *J Biol Chem* 2010;285: 41852-41862.
53. Price MP, Snyder PM, Welsh MJ. Cloning and expression of a novel human brain Na⁺ channel. *J Biol Chem* 1996; 271:7879-7882.
54. Waldmann R, Champigny G, Voilley N, Lauritzen I, Lazdunski M. The mammalian degenerin MDEG, an amiloride-sensitive cation channel activated by mutations causing neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 1996; 271:10433–10436.
55. Lingueglia E, de Weille JR, Bassilana F, et al. A modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain and dorsal root ganglion cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 29778–29783.
56. Chu XP, Close N, Saugstad JA, Xiong ZG. ASIC1a-specific modulation of acid-sensing ion channels in mouse cortical neurons by redox reagents. *J Neurosci* 2006; 26: 5329 – 5339.
57. Sherwood TW, Lee KG, Gormley MG, Askwith CC. Heteromeric acid-sensing ion channels (ASICs) composed of ASIC2b and ASIC1a display novel channel properties and contribute to acidosis-induced neuronal death. *J Neurosci* 2011; 31: 9723-9734.
58. Hesselager M, Timmermann DB, Ahring PK. pH Dependency and desensitization kinetics of heterologously expressed combinations of acid-sensing ion channel subunits. *J Biol Chem* 2004; 279: 11006-11015.
59. Waldmann R, Bassilana F, de Weille J, et al. Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons. *J Biol Chem* 1997; 272:20975–20978.
60. Wu LJ, Duan B, Mei YD, et al. Characterization of acid-sensing ion channels in dorsal horn neurons of rat spinal cord. *J Biol Chem* 2004; 279: 43716–43724.

61. Lingueglia E. Acid-sensing ion channels in sensory perception. *J Biol Chem* 2007; 282: 17325–17329.
62. Lin YW, Min MY, Lin CC, et al. Identification and characterization of a subset of mouse sensory neurons that express acid-sensing ion channel 3. *Neuroscience* 2008;151:544-557.
63. Salinas M, Lazdunski M, Lingueglia E. Structural elements for the generation of sustained currents by the acid pain sensor ASIC3. *J Biol Chem* 2009; 284: 31851– 31859.
64. Hattori T, Chen J, Harding AM, et al. ASIC2a and ASIC3 heteromultimerize to form pH-sensitive channels in mouse cardiac dorsal root ganglia neurons. *Circ Res* 2009; 105: 279-286.
65. Deval E, Salinas M, Baron A, Lingueglia E, Lazdunski M. ASIC2b-dependent regulation of ASIC3, an essential acid-sensing ion channel subunit in sensory neurons via the partner protein PICK-1. *J Biol Chem* 2004; 279: 19531-19539.
66. Ikeuchi M, Kolker SJ, Sluka KA. Acid-sensing ion channel 3 expression in mouse knee joint afferents and effects of carrageenan-induced arthritis. *J Pain* 2009; 10: 336 – 342.
67. Sluka KA, Radhakrishnan R, Benson CJ, et al. ASIC3 in muscle mediates mechanical, but not heat, hyperalgesia associated with muscle inflammation. *Pain* 2007; 129: 102 – 112.
68. Mamet J, Lazdunski M, Voilley N. How nerve growth factor drives physiological and inflammatory expressions of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons. *J Biol Chem* 2003;278: 48907 – 48913.
69. Sutherland SP, Benson CJ, Adelman JP, McCleskey EW. Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2001; 98: 711-766.
70. Benson CJ, Eckert SP, McCleskey EW. Acid-evoked currents in cardiac sensory neurons: a possible mediator of myocardial ischemic sensation. *Circ Res* 1999; 84: 921-928.
71. Gründer S1, Geissler HS, Bässler EL, Ruppersberg JP. A new member of acid-sensing ion channels from pituitary gland. *Neuroreport* 2000; 11: 1607-11.
72. Denac H, Mevissen M, Scholtysik G. Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2000; 362: 453–479.
73. Diochot S, Salinas M, Baron A, Escoubas P, Lazdunski M. Peptides inhibitors of acid-sensing ion channels. *Toxicon* 2007; 49: 271–284.
74. Askwith CC, Benson CJ, Welsh MJ, Snyder PM. DEG/ENaC ion channels involved in sensory transduction are modulated by cold temperature. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 6459–6463.
75. Deval E, Baron A, Lingueglia E, et al. Effects of neuropeptide SF and related peptides on acid sensing ion channel 3 and sensory neuron excitability. *Neuropharmacology* 2003; 44: 662–671.
76. Chen X, Qiu L, Li M, et al. Diarylamidines: high potency inhibitors of acid-sensing ion channels. *Neuropharmacology* 2010; 58: 1045–1053.
77. Allard M, Rousselot P, Lombard MC, Theodosis DT. Evidence for neuropeptide FF (FLFQRFamide) in rat dorsal root ganglia. *Peptides* 1999;20: 327–333.
78. Deval E, Noel J, Lay N, et al. ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *EMBO J* 2008;27: 3047–3055.
79. Sherwood TW, Askwith CC. Dynorphin opioid peptides enhance acidsensing ion channel 1a activity and acidosis-induced neuronal death. *J Neurosci* 2009; 29: 14371–14380.
80. Escoubas P, De Weille JR, Lecoq A, et al. Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺ channels. *J Biol Chem* 2000;275: 25116–25121.

81. Diochot S, Baron A, Rash LD, et al. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J* 2004; 23: 1516–1525.
82. Deval E, Gasull X, Noël J, et al. Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain. *Pharmacol Ther* 2010;128:549-58.
83. Frelin C, Barbry P, Vigne P, et al. Amiloride and its analogs as tools to inhibit Na⁺ transport via the Na⁺ channel, the Na⁺/H⁺ antiport and the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Biochimie* 1988;70: 1285–1290.
84. Kleyman TR, Craque EJ Jr. Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J Membr Biol* 1988; 105: 1–21.
85. Dube GR, Lehto SG, Breese NM, et al. Electrophysiological and in vivo characterization of A-317567, a novel blocker of acid sensing ion channels. *Pain* 2005; 117: 88–96.
86. Kuduk SD, Chang RK, Wai JM, et al. Amidine derived inhibitors of acid-sensing ion channel-3 (ASIC3). *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19: 4059–4063.
87. Voilley N, de Weille J, Mamet J, Lazdunski M. Nonsteroid antiinflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J Neurosci* 2001; 21: 8026–8033.
88. Wang W, Duan B, Xu H, Xu L, Xu TL. Calcium-permeable acid-sensing ion channel is a molecular target of the neurotoxic metal ion lead. *J Biol Chem* 2006; 281: 2497–2505.
89. Staruschenko A, Dorofeeva NA, Bolshakov KV, Stockand JD. Subunitdependent cadmium and nickel inhibition of acid-sensing ion channels. *Dev Neurobiol* 2007; 67: 97–107.
90. Wang W, Yu Y, Xu TL. Modulation of acid-sensing ion channels by Cu(2+) in cultured hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience* 2007;145: 631–641.
91. Chu XP, Wemmie JA, Wang WZ, et al. Subunit-dependent high-affinity zinc inhibition of acid-sensing ion channels. *J Neurosci* 2004; 24: 8678–8689.
92. Paukert M, Babini E, Pusch M, Grunder S. Identification of the Ca²⁺ blocking site of acid-sensing ion channel (ASIC) 1: implications for channel gating. *J Gen Physiol* 2004; 124: 383–394.
93. de Weille J, Bassilana F. Dependence of the acid-sensitive ion channel, ASIC1a, on extracellular Ca(2+) ions. *Brain Res* 2001; 900: 277–281.
94. Baron A, Schaefer L, Lingueglia E, Champigny G, Lazdunski M. Zn²⁺ and H⁺ are coactivators of acid-sensing ion channels. *J Biol Chem* 2001;276: 35361–35367.
95. Poirot O, Berta T, Decosterd I, Kellenberger S. Distinct ASIC currents are expressed in rat putative nociceptors and are modulated by nerve injury. *J Physiol* 2006; 576: 215–234.
96. Waxman SG. Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7: 932-41.
97. Stys PK, Lopachin RM. Mechanism of calcium and sodium fluxes in anoxic myelinated central nervous system axons. *Neurosci* 1998; 82: 21-32.
98. Friese MA, Craner MJ, Etzensperger R, et al. Acid-sensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Nature Medicine* 2007; 13: 1483-1489.
99. Vergo S, Craner MJ, Etzensperger R, et al. Acid-sensing ion channel 1 is involved in both axonal injury and demyelination in multiple sclerosis and its animal model. *Brain* 2011; 134: 571-584.
100. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003; 39: 889-909.

101. Wemmie JA, Askwith CC, Lamani E, et al. Acid sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning. *Journal of Neuroscience* 2003; 23: 5496-5502.
102. Pidoplichko VI, Dani JA. Acid-sensitive ionic channels in midbrain dopamine neurons are sensitive to ammonium, which may contribute to hyperammonemia damage. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2006;103:11376-11380.
103. Arias RL, Sung ML, Vasylyev D, et al. Amiloride is neuroprotective in an MPTP model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2008; 31: 334-341.
104. Wong HK, Bauer PO, Kurosawa M, et al. Blocking acid-sensing ion channel 1 alleviates Huntington's disease pathology via an ubiquitin-proteasome system dependent mechanism. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 3223-3235 doi: 10.1093/hmg/ddn218.
105. Maysami S, Branigan D, Simon RP, Xiong ZG. Amyloid Beta Peptide Modulates the Activity of Acid-Sensing Ion Channels in Neurons [abstract]. 39th Society for Neuroscience Annual Meeting 2009; 237:8.
106. Coryell MW, Ziemann AE, Westmoreland PJ, et al. Targeting ASIC1a reduces innate fear and alters neuronal activity in the fear circuit. *Biol Psychiatry* 2000; 62: 1140-1148.
107. Dwyer JM, Rizzo SJ, Neal SJ, et al. Acid sensing ion channel (ASIC) inhibitors exhibit anxiolytic-like activity in preclinical pharmacological models. *Psychopharmacology (Berl)*, 2009; 203: 41-52.
108. Wu WL, Lin YW, Min MY, Chen CC. Mice lacking *Asic3* show reduced anxiety-like behavior on the elevated plus maze and reduced aggression. *Genes Brain Behav* 2010; 9: 603-614 doi: 10.1111/j.1601-183X.2010.00591.x.
109. <http://www.watermaze.org/05.03.2014>.
110. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 1984; 11: 47-60.
111. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002;297:353-6.
112. Small SA, Duff K. Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron* 2008;60:534-42. doi: 10.1016/j.neuron.
113. Popugaeva E, Bezprozvanny I. Role of endoplasmic reticulum Ca²⁺ signaling in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Front Mol Neurosci* 2013; 6: 29. doi: 10.3389/fnmol.
114. Anekonda TS, Quinn JF. Calcium channel blocking as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease: the case for isradipine. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812:1584-90 doi: 10.1016/j.bbadis.
115. Gomes GM, Dalmolin GD, Cordeiro Mdo N, et al. The selective A-type K⁺ current blocker Tx3-1 isolated from the *Phoneutria nigriventer* venom enhances memory of naïve and Aβ(25-35)-treated mice. *Toxicon* 2013; 76: 23-7 doi: 10.1016/j.toxicon.
116. Corbett BF, Leiser SC, Ling HP, et al. Sodium channel cleavage is associated with aberrant neuronal activity and cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2013; 33: 7020-6 doi: 10.1523/jneurosci.
117. Pannaccione A, Boscia F, Scorziello A, et al. Up-regulation and increased activity of KV3.4 channels and their accessory subunit MinK-related peptide 2 induced by amyloid peptide are involved in apoptotic neuronal death. *Mol Pharmacol* 2007; 72: 665-73.
118. Plant LD, Webster NJ, Boyle JP, et al. Amyloid beta peptide as a physiological modulator of neuronal 'A'-type K⁺ current. *Neurobiol Aging* 2006; 27: 1673-83.
119. Pan Y, Xu X, Tong X, Wang X. Messenger RNA and protein expression analysis of voltage-gated potassium channels in the brain of Abeta(25-35)-treated rats. *J Neurosci Res* 2004; 77: 94-9.

120. Angulo E, Noé V, Casadó V, et al. Up-regulation of the Kv3.4 potassium channel subunit in early stages of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2004; 91: 547-57.
121. Campolongo P, Ratano P, Ciotti MT, et al. Systemic administration of substance P recovers beta amyloid-induced cognitive deficits in rat: involvement of Kv potassium channels. *PLoS One* 2013;8:e78036 doi: 10.1371/journal.
122. Thibault O, Pancani T, Landfield PW, Norris CM. Reduction in neuronal L-type calcium channel activity in a double knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:546-9 doi: 10.1016/j.bbadis.
123. Yamamoto S, Wajima T, Hara Y, Nishida M, Mori Y. Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:958-67.
124. Vitvitsky VM, Garg SK, Keep RF, Albin RL, Banerjee R. Na⁺ and K⁺ ion imbalances in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:1671-81. doi:10.1016/j.bbadis.
125. Mellon EA, Pilkinton DT, Clark CM, et al. Sodium MR imaging detection of mild Alzheimer disease: preliminary study. *AJNR Am J Neuroradiol* 2009;30:978-84 doi: 10.3174/ajnr.
126. Dickey CA, Loring JF, Montgomery J, et al. Selectively reduced expression of synaptic plasticity-related genes in amyloid precursor protein + presenilin-1 transgenic mice. *J Neurosci* 2003;23:5219-26.
127. Kong LN, Zuo PP, Mu L, Liu YY, Yang N. Gene expression profile of amyloid beta protein-injected mouse model for Alzheimer disease. *Acta Pharmacol Sin* 2005;26:666-72.
128. Corbett BF, Leiser SC, Ling HP, et al. Sodium channel cleavage is associated with aberrant neuronal activity and cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2013;33:7020-6 doi: 10.1523/JNEUROSCI.
129. Kovacs DM, Gersbacher MT, Kim DY. Alzheimer's secretases regulate voltage-gated sodium channels. *Neurosci Lett*. 2010, 10;486(2):68-72 doi: 10.1016/j.neulet.2010.08.048.
130. Wang J, Hu YH, Lian ZG, et al. Does closure of acid-sensing ion channels reduce ischemia/reperfusion injury in the rat brain? *Neural Regen Res* 2013;8:1169-1179.
131. Brewer GJ. Effects of acidosis on the distribution of processing of the beta-amyloid precursor protein in cultured hippocampal neurons. *Mol Chem Neuropatho* 1997;31:171-186.
132. Atwood CS, Moir RD, Huang X, et al. Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J Biol Chem* 1998;273:12817-12826.
133. Pirchl M, Marksteiner J, Humpel C. Effects of acidosis on brain capillary endothelial cells and cholinergic neurons: relevance to vascular dementia and Alzheimer's disease. *Neurol Res* 2006;28:657-664.
134. Marksteiner J, Humpel C. Beta-amyloid expression, release and extracellular deposition in aged rat brain slices. *Mol Psychiatry* 2008;13:939-952.
135. Li M, Inoue K, Branigan D, et al. Acid-sensing ion channels in acidosis-induced injury of human brain neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010 ;30:1247-60. doi: 10.1038/jcbfm.
136. Chesler M. The regulation and modulation of pH in the nervous system. *Prog Neurobiol* 1990;34:401-27.
137. Rehncrona S. Brain acidosis. *Ann Emerg Med* 1985;14:770-6.
138. Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, et al. A proton- gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature*. 1997;386(6621):173-177.
139. Vukicevic M, Kellenberger S. Modulatory effects of acidsensing ion channels on action potential generation in hippocampal neurons. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004; 287(3):C682-690.

140. Friedrich K, Polleichtner G, Grunder S. Intracellular localization and trafficking signals of ASIC4. *Acta Physiologica* 2012;204:689.
141. Donier E, Rugiero F, Jacob C, Wood JN. Regulation of ASIC activity by ASIC4--new insights into ASIC channel function revealed by a yeast two-hybrid assay. *Eur J Neurosci* 2008;28:74-86.
142. Santos-Torres J, Ślimak MA, Auer S, Ibañez-Tallon I. Cross-reactivity of acid-sensing ion channel and Na⁺-H⁺ exchanger antagonists with nicotinic acetylcholine receptors. *J Physiol* 2011;589:5109-23.
143. Yamada K, Tanaka T, Mamiya T, Shiotani T, Kameyama T, Nabeshima T. Improvement by neracetam of b-amyloid-(1-42)-induced learning and memory impairments in rats. *British Journal of Pharmacology* 1999; 126:235 - 244.
144. Vergo S, Craner MJ, Etzensperger R, et al. Acid-sensing ion channel 1 is involved in both axonal injury and demyelination in multiple sclerosis and its animal model. *Brain* 2011;134:571-84.

8.ÖZGEÇMİŞ

SOYADI : ÖZ

ADI: Esin

DOĞUM TARİHİ: 14/12/1984

DOĞUM YERİ: Elazığ/Türkiye

ADRES: Sürsürü Mah. Meriç Sok. Bahar Apt. No:6/5 ELAZIĞ

E-MAIL: esnoz_05@hotmail.com

YABANCI DİL: İngilizce, YDS: 38,75

ALES: 75.915

EĞİTİM:

1999-2002 Balakgazi Lisesi/ ELAZIĞ

2006-2010: Fırat Üniversitesi/ Fen Fakültesi/ Kimya Bölümü/ ELAZIĞ

(Akademik Ort.: 3,74 Fen Fakültesi 1.)

2011 – ... Yüksek Lisans, Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi

Biyoloji Anabilim Dalı/ ELAZIĞ

BİLGİSAYAR BECERİLERİ:

Microsoft Word: İyi

Microsoft Excel: İyi

Microsoft Power Point: İyi