

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**ALÜMİNYUM VEYA BİPERİDEN İLE OLUŞTURULAN
ÖĞRENME FONKSİYON BOZUKLUĞU ÜZERİNDE
KAFEİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Mürşit Enis AKYÜZ

**TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Eda KUMCU**

ADANA-2025

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**ALÜMİNYUM VEYA BİPERİDEN İLE OLUŞTURULAN
ÖĞRENME FONKSİYON BOZUKLUĞU ÜZERİNDE
KAFEİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Mürşit Enis AKYÜZ

**TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Eda KUMCU**

**Bu tez Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TDK-2021-13352
No'lu Proje ile desteklenmiştir**

ADANA-2025

KABUL ve ONAY



T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI
ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Mürşit Enis AKYÜZ

Kayıtlı olunan Program : Tıbbi Farmakoloji
Tezin Konusu : Alüminyum veya biperiden ile oluşturulan öğrenme fonksiyon bozukluğu üzerinde kafeinin etkisinin araştırılması

Tezin Türü : Yüksek Lisans : Doktora:

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof. Dr. Eda KUMCU

Danışmanın İletişim Bilgileri :

Telefon

E-Posta

Öğrencinin İletişim Bilgileri

Telefon

E-Posta

Adresi

**Bu belgenin Lisansüstü eğitim tezleri savunmaya alınmadan önce öğrenci tarafından doldurulup imzalanarak Enstitü Müdürlüğüne teslim edilmesi gerekmektedir.*

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince, tüm bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, sadece tez danışmanlığı ile kalmayıp insani olarak da her konuda her koşulda emeğini ve sonsuz desteğini esirgemeyen sevgili danışman hocalarım Prof. Dr. Fazilet AKSU, Prof. Dr. Eda KUMCU ve Prof. Dr. M. Ata SEÇİLMİŞ'e, araştırma desteği vererek tezimi mümkün kılan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projelerine, bu süreçte çok değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşan tüm Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı ve Sağlık Bilimleri enstitüsü hocalarına ve araştırma görevlilerine, doktora ve yüksek lisans öğrencilerine ve çalışanlarına, Tıbbi Fizyoloji öğretim üyesi Prof. Dr. Kübra AKILLIOĞLU ve Uz. Dr. Meltem DÖNMEZ KUTLU'ya, Akdeniz Üniversitesi İstatistik Danışmanlık Uygulama Ve Araştırma Merkezi öğretim görevlisi Dr. Ebru KAYA BAŞAR'a, SABİDAM Müdürü Arş. Gör. Çağrı AVCI başta olmak üzere tüm SABİDAM çalışanlarına, Niğde Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Işıl AYDEMİR'e, Niğde Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Derya Deniz KANAN'a tüm eğitim hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen, bana her konuda şüphe etmeyi öğreten ve eğitimim için her şeyi feda etmeye hazır olan sevgili annem Zühal AKYÜZ ve pandemide kaybettiğim canım babam Mehmet Ali AKYÜZ, kardeşlerim İtir İrem TUNCEREN ve Gizem YALDIRIK'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	ii
ETİK BEYANI	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
GRAFİKLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Alzheimer Hastalığı	3
2.1.1. Alzheimer Hastalığı Risk Faktörleri	3
2.1.2. Alzheimer Hastalığının Fizyopatolojisi	4
2.1.3. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi.....	6
2.1.4. Alzheimer Hastalığının Genetik Faktörleri.....	7
2.2 Alüminyum – Alzheimer Hastalığı ilişkisi	7
2.3. Kafein ve Alzheimer	8
2.3.1. Adenozin Reseptörleri.....	8
2.3.2. Kafein ve Alzheimer Hastalığı İlişkisi.....	12
2.4. Alzheimer Hastalığı Hayvan Deney Modelleri.....	13
2.5. Santral Sinir Sisteminde Kolinerjik Sistemin Rolü.....	15
2.6. Morris Water Maze Davranış testi	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Gereç	17
3.1.1. Deney Hayvanları	17
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	17

3.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	18
3.2. Yöntem.....	18
3.2.1. Çalışma Yeri ve Şartları.....	18
3.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılışı.....	18
3.2.3. Davranış Testleri	19
3.3. Histolojik analizler.....	20
3.3.1. Doku Örneklerinin alınması ve Parafin Doku Takibi.....	20
3.3.2. Histokimyasal Boyama	21
3.3.2.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması	21
3.3.2.2. Congo Red Boyaması.....	22
3.4. İstatistiksel Analizler.....	23
4. BULGULAR.....	25
4.1. Deney Süresince Farelerde Gözlenen Özellikler	25
4.2. Morris Su Tankı Testi	25
4.2.1. Eğitim Denemeleri	25
4.2.2. 6. Gün Deneyleri	29
4.3. Histopatolojik Bulgular.....	31
4.3.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Bulguları	31
4.3.1.1. Serebral Korteks Histopatolojisi	31
4.3.1.2. Congo Red Boyama Bulguları	34
5. TARTIŞMA.....	38
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	43
KAYNAKÇA.....	44

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Tablo 3.1. Parafin Takip Protokolü	21
Tablo 3.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü.....	22
Tablo 3.3. Congo Red Boyama Protokolü.....	23
Tablo 4.1. Farelerin ilk ve son kiloları arasındaki farkın gruplara göre karşılaştırılması.	25
Tablo 4.2. Her bir gruptaki farelerin zamana göre ve her bir zaman noktasında grupların platformu bulma süresinin karşılaştırılması.....	26
Tablo 4.3. Her bir gruptaki farelerin eğitim günlerine göre ve her bir eğitim gününde grupların arasında perifer zamanı karşılaştırılması.....	28
Tablo 4.4. 6. gündeki uygulamalardaki kadran 3'te geçirine süre (sn) ve perifer zamanlarının (sn) karşılaştırılması	29

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 2.1. Adenozin metabolizmasının ekto-enzimler ve adenozin ve pürinerjik reseptörlerle olan bağıını gösteren şema. (72) No'lu kaynaktan alınmıştır.....	9
Şekil 2.2. O ₂ azalması sonucunda artan adenozin seviyeleri adenozin reseptörlerini aktive ederek fizyolojik değişikliklere neden olur (10) No'lu kaynaktan alınmıştır.	10
Şekil 2.3. Kafeinin kimyasal yapısı	13
Şekil 2.4. Morris Water Maze su tankı ve bölmeler. Mevcut çalışmamızda kullanılan su tankının yukarıdan kamera görüntüsü, bilgisayar ortamında sarı renkte görülen çizgilerle bölmelere ayrılmıştır. A resminde mavi ile boyalı kısım, platformun bulunduğu bölmeyi işaretlemektedir. B resminde ise tankın periferi mavi ile boyanmıştır.	16
Şekil 4.1. Günlere göre gruplardaki platformu bulma sürelerinin değişimi	27
Şekil 4.2. Günlere göre gruplardaki periferde geçirilen zamanların değişimi.....	28
Şekil 4.3. 6. günde uygulamalardaki kadran 3'te geçirilen sürenin (sn) karşılaştırılması	30
Şekil 4.4. 6. günde uygulamalardaki perifer zamanlarının (sn) karşılaştırılması	30

RESİMLER DİZİNİ

<u>Resim No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Resim 4.1	Kontrol grubu farelerin beyin dokusuna ait histolojik görüntüleri 31
Resim 4.2.	Kafein grubu farelerin beyin dokusuna ait histolojik görüntüleri..... 32
Resim 4.3.	Kafein+Biperiden grubu farelerin beyin dokusuna ait histolojik görüntüler 32
Resim 4.4.	Biperiden grubu farelerin beyin dokusuna ait histolojik görüntüleri 33
Resim 4.5.	AlCl ₃ grubu farelerin beyin dokusuna ait histolojik görüntüleri 33
Resim 4.6.	AlCl ₃ + Kafein grubu farelerin beyin dokusuna ait histolojik görüntüleri 34
Resim 4.7.	Kontrol grubu farelerin beyin dokusunda korteks ve hipokampüsün CA1 bölgesine ait histolojik görüntüleri 36
Resim 4.8.	Kafein grubu farelerin beyin dokusunda korteks ve hipokampüsün CA1 bölgesine ait histolojik görüntüleri 36
Resim 4.9.	Kafein+Biperiden grubu farelerin beyin dokusunda korteks ve hipokampüsün CA1 bölgesine ait histolojik görüntüleri 36
Resim 4.10.	Biperiden grubu farelerin beyin dokusunda korteks ve hipokampüsün CA1 bölgesine ait histolojik görüntüleri 37
Resim 4.11.	AlCl ₃ grubu farelerin beyin dokusunda korteks ve hipokampüsün CA1 bölgesine ait histolojik görüntüleri 37
Resim 4.12.	AlCl ₃ + Kafein grubu farelerin beyin dokusunda korteks ve hipokampüsün CA1 bölgesine ait histolojik görüntüleri 37

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik No:

Sayfa No:

- Grafik 4.1.** Tüm gruplarda beyin korteks bölgesindeki β -amiloid plak sayılarının karşılaştırılması..... 35
- Grafik 4.2.** Tüm gruplarda beyin hipokampus CA1 bölgesindeki β -amiloid plak sayılarının karşılaştırılması 35



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A1	: Adenozin-1 reseptörü
A2a	: Adenozin-2a reseptörü
A2b	: Adenozin-2b reseptörü
A3	: Adenozin-3 reseptörü
AC	: Adenilat siklaz
ADP	: Adenozin difosfat
AH	: Alzheimer hastalığı
Al	: Alüminyum
AlCl₃	: Alüminyum Klorür
AlCl₃-6H₂O	: Alüminyum klorür deksahidrat
AMP	: Adenozin monofosfat
APOEε4	: Apolipoprotein E
APP	: Amiloid prekürsör protein
ATP	: Adenozin trifosfat
BACE-1	: beta amiloid prekürsör protein temizleyici enzim-1 (beta-sekretaz)
Bip	: Biperiden
cAMP	: siklik adenozin monofosfat
CD39	: Ektonükleozid trifosfat difosforilaz
CD73	: 5'-nükleotidaz
CNTs	: Konsantratif nükleozit transporterları
CYP1A2	: Sitokrom P450 enzimi 1A2
D2R	: Dopamin-2 reseptörü
DM	: Diyabetes mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
E-NTPDase	: Ektonükleozid trifosfat difosforilaz
ENTs	: Dengeleyici nükleozit transporterları
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
GABA	: Gama aminobütirik asit
i.p.	: İntraperitoneal

KBB	: Kan-beyin bariyeri
kg	: Kilogram
M1	: Muskarinik-1 reseptör
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
NFY	: Nörofibriler yumaklar/üçgenler
O₂	: Oksijen
P2X	: Pürinerjik nükleotid reseptörü-2X
P2Y	: Pürinerjik nükleotid reseptörü-2Y
PAM	: Pozitif allosterik modülatör
PH	: Parkinson Hastalığı
PKA	: Protein kinaz-A
PLCG2	: 1-fosfatidilinozitol -4,5-bifosfanat fosfodiesteraz gamma
RhoA	: Ras homolog aile üyesi protein
SABİDAM	: Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi
sAPP	: Çözünebilir amiloid prekürsör protein
SF	: Serum fizyolojik sıvısı
sn	: saniye
SSS	: Santral sinir sistemi
TAU	: Tubulin ilişkili protein

ÖZET

Alüminyum veya Biperiden ile Oluşturulan Öğrenme Fonksiyon Bozukluğu Üzerinde Kafeinin Etkisinin Araştırılması

Yaygın bir halk sağlığı sorunu olan demansın en sık sebebi Alzheimer Hastalığıdır. Alzheimer Hastalığı, beyin çeşitli bölgelerinde β -amiloid birikimi ve nörofibriler yumaklar oluşumu ile karakterizedir. Kafeinin bilişsel fonksiyonlar üzerine etkisini araştıran çok sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmada farelerde Alüminyum veya bir selektif muskarinik M1 reseptör antagonisti olan biperiden ile oluşturulan deneysel Alzheimer modelinde bir adenosin reseptör antagonisti olan kafeinin etkileri araştırıldı. Bu amaçla hafıza ve öğrenmeyi ölçmek için Morris Water Maze testi uygulandı. Ayrıca deneklerin beyin dokuları histopatolojik yönden incelendi.

Beş gün boyunca her gün 4 kez tekrarlanan Morris testinde kontrol deneklerin platformu bulma süreleri ilk güne göre ikinci günden başlayarak azaldı. Bu gruptaki histopatolojik incelemelerde serebral kortekste hücrel hasar veya hipokampüste β -amiloid birikimine dair herhangi bir patolojiye rastlanmadı. Biperiden uygulanan gruplarda platformu bulma süresinde azalma gözlenmedi. Alüminyum uygulanan grupta ise sadece 5'inci günde azalma görüldü. Alüminyum veya biperiden uygulanan gruplarda yapılan histopatolojik incelemede hipokampüste β -amiloid birikimi gözlenirken, kortekste ise hücrel hasara ait bulgular görüldü. Kafeinin gerek tek başına gerekse alüminyum veya biperidenle beraber uygulandığı gruplarda deney hayvanlarının platformu bulma sürelerinde bir azalma görülmezken, bu grupların beyin dokularında yapılan incelemelerde β -amiloid birikiminde ve hücrel hasarda önemli oranda azalma olduğu görüldü.

Bu bulgular, sadece alüminyumun değil biperidenin de beyin dokularında β -amiloid birikimine neden olduğunu, yüksek dozda uygulanan kafeinin öğrenme fonksiyonunu bozarken biperiden veya alüminyuma bağlı β -amiloid birikimini ve hücrel hasarı azalttığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Demans, Alzheimer, alüminyum, biperiden, kafein

ABSTRACT

Investigation of the Effect of Caffeine on Learning Dysfunction Induced by Aluminum or Biperiden

The most frequent cause of Dementia, which is a common public health issue, is Alzheimer's Disease. Alzheimer's Disease is characterized by the accumulation of β -amyloid plaques and the formation of neurofibrillary tangles in various regions of the brain. Many studies have investigated the effects of caffeine on cognitive functions. This study explored the effects of caffeine, an adenosine receptor antagonist, in an experimental Alzheimer's model performed in mice treated with aluminum or biperiden, a selective muscarinic M1 receptor antagonist. For this purpose, the Morris Water Maze test was applied. Additionally, the brain tissues of the subjects were examined histopathologically.

In the Morris test, which was repeated four times daily for five days, the control group's time to find the platform decreased starting from the second day compared to the first day. Histopathological examinations in this group did not reveal any cellular damage in the cerebral cortex or β -amyloid accumulation in the hippocampus. In the biperiden-treated groups, there was no decrease in the time to find the platform. In the aluminum-treated group, a decrease was only observed on the 5th day. Histopathological examinations in the aluminum or biperiden-treated groups revealed β -amyloid accumulation in the hippocampus and cellular damage in the cortex. In groups treated with caffeine alone or in combination with aluminum or biperiden, no reduction in platform finding time was observed. However, significant reductions in β -amyloid accumulation and cellular damage were found in the brain tissues of these groups.

These findings suggest that not only aluminum but also biperiden causes amyloid accumulation in brain tissues, and that high-dose caffeine use reduces amyloid deposition and cell damage caused by biperiden or aluminum, while impairing learning function.

Keywords: Dementia, Alzheimer, aluminium, biperiden, caffeine

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Toplumların ortalama yaşam ömrü uzadıkça, demans önemli bir iş gücü kaybı, halk sağlığı sorunu ve ekonomik olarak ülkeleri zorlayan bir sağlık sorunu olarak öne çıkmaktadır. Santral Sinir Sisteminde (SSS) nörodejeneratif süreçlerin sonucunda ortaya çıkan demansın en sık sebebi Alzheimer hastalığıdır. 2018’de yayımlanan “Alzheimer’s Disease International”ın raporuna göre Dünya çapında 50 milyon insan demanstan muzdariptir ve bu sayının yarısından daha büyük bir kısmı orta ve dar gelirli ülkelerde yaşayan kişilerden oluşmaktadır. 2050 yılında dünyada bu sayının üç katına çıkacağı ifade edilmektedir (1). Avrupa’da yapılan son değerlendirmelerde ise demans hastalığı olan kişi sayısının 2050 yılı itibariyle iki katına çıkacağı öngörülmektedir (2). Araştırmalar demans sıklığının yüksek gelirli ülkelerde sabit kaldığı ya da azaldığı yönünde bulguları içermekle birlikte, belirli bir koruyucu faktöre işaret edilememektedir (3).

Alzheimer hastalığı progresif nitelikte olup, hafıza ve kognitif yeteneklerin ilerleyici bir şekilde kaybı ile kendisini göstermektedir. Beyin dokusunda β -amiloid plaklar ve tau proteinlerinin neden olduğu nörofibriler üçgenler/yumaklar (NFY) görülmesi belirleyici nitelik olarak göze çarpmaktadır. (1) Ancak bu yapıların temizlenmesini hedef alan deneysel çalışmalar sonucunda Alzheimer Hastalığının belirtilerinde bir gerileme olmaması, ilgili yapısal değişikliklerin sebep değil sonuç olduğuna işaret etmektedir (4). Alzheimer Hastalığı’nın fizyopatolojisi ile ilgili bilimsel araştırmalar hâlen devam etmektedir.

SSS hastalıklarında deneysel bir model oluşturmanın zorluğu bilinmekle birlikte, Alzheimer hastalığı ile ilgili araştırmalar genetiği değiştirilmiş hayvanlar veya kimyasal ajanlar kullanılmak suretiyle oluşturulan deneysel Alzheimer modelleri üzerinde yapılmaktadır. Alüminyum maruziyeti sonucunda farelerde oluşan Alzheimer modeli buna bir örnek olarak verilebilir (5,6). Günlük yaşamda ve tıpta oldukça geniş alanda kullanılan Alüminyumun kronik maruziyetine dair şüpheler gittikçe artmaktadır. Alüminyum’un Alzheimer Hastalığı patogenezinde rol alan faktörleri artırdığı ve hastalığa yol açtığına dair görüşler bulunmaktadır. Nitekim içme suyuna ilave yoluyla alüminyuma maruz bırakılan deneysel hayvan modellerinde öğrenme ve hafızada Alzheimer Hastalığına benzer etkiler gözlenmiştir (7).

Bir muskarinik reseptör alt tipi olan M1 reseptörlerinin öğrenme ve bellek üzerindeki etkilere aracılık ettiğinin bilinmesi SSS’deki hafıza ve bellek yollarına dair çalışmalarda

ilgili reseptörlerin önemini arttırmıştır (8). M1 reseptörü Alzheimer Hastalığının tedavisinde bir ilaç hedefi olarak düşünülmüş ve deneysel çalışmalarda onay alan M1 reseptör agonistleri için klinik çalışmalar başlatılmıştır (9). Ancak bu grup maddelerin (ör: ksanomelin, sevimelin) SSS'e etki etmesi gereken konsantrasyona ulaşabilmesi için hastaya verilmesi gereken ilaç dozu oldukça yüksek olduğundan, tedavi edici doza ulaşmadan çok önce ortaya çıkan yan etkiler nedeniyle çalışmalar devam ettirilememiştir.

Kafein, bir adenosin reseptör antagonisti olup, SSS üzerinde stimüle edici etki yapmaktadır. Oksijen ihtiyacı artan veya enerji tüketimi nedeniyle oksijen kaynağı azalan hücrede adenosin trifosfat (ATP)/adenosin dengesi adenosin lehinde değişmektedir ve ekstraselüler sıvıda adenosin seviyeleri artmaktadır. Hücrede adenosin reseptörlerinin aktivasyonu, GABA/glutamat düzeylerinde değişime neden olmakta ve uyku/uyanıklık döngüsünün kontrolünde rol oynamaktadır (10). Kafein üzerine yapılan çalışmalar, uzun dönem kafein kullanımının Alzheimer hastalığı üzerine koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir. Ancak koruyucu etkisinin mekanizması henüz açıklanamamıştır (11).

Alzheimer Hastalığının etiolojisine dair teoriler bulunmakla birlikte, yeni fizyopatolojik bulgular bu hastalığa karşı profilaktik veya semptomatik tedavilerin geliştirilme sürecine katkıda bulunabilir.

Yaptığımız literatür araştırmalarına göre, Alzheimer Hastalığının klinik sonucu olan öğrenme, hafıza, bilinç bozukluğunun ve β -amiloid birikiminin bir çevresel etken olan alüminyum ile oluşabildiği bilinmektedir (12,13). Bunun yanında, bir selektif M1 reseptör antagonisti olan biperidenin bilişsel fonksiyonlar üzerine etkisi netlik kazanmamakla birlikte, β -amiloid birikimindeki rolü hiç araştırılmamıştır. Çalışmamız biperidenin β -amiloid birikimi üzerinde etkisini araştıran ilk çalışmadır. Bu çalışmada farelerde alüminyum veya biperiden ile deneysel olarak oluşturulan öğrenme bozukluğu, beyin dokularında oluşabilecek β -amiloid birikimi ve hücresel hasar üzerine kafeinin olası etkileri araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Demansın en sık nedenlerinden olan Alzheimer Hastalığı (AH) progresif bir hastalıktır. Alman psikiyatr Alois Alzheimer'ın 1906 yılında, demansın klinik özelliklerini tanımlaması sonrasında, 1910 yılında Emil Kraepelin tarafından adlandırılmıştır. Alois Alzheimer'ın incelediği vaka 51 yaşında bir kadın hastadır ve ilk yıllarda Alzheimer hastalığı 65 yaş altında bir demans formu olarak kabul edilmiştir. Ancak ilerleyen yıllarda, 65 yaş üstü demans olgularının çoğunun da benzer klinik semptomlara sahip olduğu görülmüştür. Günümüzde hastalığın, demansın bir nedeni olduğu ve en büyük risk faktörünün 65 yaş üstü olmak olduğu kabul edilmiştir. Başlarda, çeşitli alanları etkileyen ilerleyici kognitif bozulmalar ve bozulmuş nörodavranışsal belirtilere bakılan bir demans aşaması klinik olarak tanı koyduruyordu. Günümüzde Alzheimer Hastalığı tanısı genel olarak, "National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association" tarafından belirlenmiş kriterlerle konulmaktadır (14). Tanı kriterleri klinik olmakla birlikte, "preklinik AH" tanımı da mevcut olup nörogörüntüleme yöntemleri ve serum biyomarkerleri de tanıda yardımcı olmaktadır.

AH, SSS'de β -amiloid plaklar ve nörofibriler yumak (NFY)'larla karakterize, progresif, nörodavranışsal bozukluklar ile başlayarak demansa ilerleyen ölümcül bir hastalıktır. Hastalığa yönelik tedavi yaklaşımları günümüzde ya hastalığın ilerleyişini yavaşlatmak ya da semptomları gidermekle sınırlıdır. Hastalığın tedavisine dair umut verici çalışmalar devam etmekle birlikte, fizyopatolojisindeki boşlukları aydınlatma çalışmaları da devam etmektedir.

2.1.1. Alzheimer Hastalığı Risk Faktörleri

AH'nın en güçlü iki risk faktörü, ilerlemiş yaş (>65) ve herhangi bir Apolipoprotein E-4 (APOE ϵ 4) allelinden birisine sahip olmaktır (1). 60 yaş öncesi AH görülme oranı düşük iken, 65 yaş sonrası ilerleyen her beş yıl için üç kat, 75 yaş sonrası bir buçuk kat artmaktadır (15). Bunun yanında, birinci derece akrabalarında AH öyküsü olanlarda risk artmıştır. En güçlü risk faktörlerinden olan APOE ϵ 4 alleli, geç başlangıçlı AH vakalarının neredeyse yarısından sorumlu tutulmaktadır (16). Yapılan çalışmalar, AH riskinin %60-80 oranında

kalıtsal olduğunu göstermektedir (17). APOE ϵ 4 alleli en yüksek riske sebep olmakta ise de bugüne kadar en az 40 genetik varyasyonun AH riskini artırdığı saptanmıştır (18).

AH için bir diğer risk faktörü kadın cinsiyettir. Eğitim durumu da risk faktörü olarak değerlendirilmekte, düşük eğitim seviyesi, bir buçuk kat daha yüksek AH riskine sebep olmaktadır (19). Ayrıca uzun süreli alkol kullanımı (20), hipertansiyon (21), Down sendromu (22), menopoza (23,24,25), diyabet hastalığı (26), posterior kortikal atrofi (27), yüksek pestisit düzeyi (28), ateroskleroz, felç, geçici iskemik ataklar, kalp hastalığı, hiperlipidemi, metabolik sendrom, obezite ve diyabet (29), gibi faktörler de demans hastalığında olduğu gibi AH'da da minör risk faktörü olarak kabul edilmektedir.

Bazı çalışmalar sebze, meyve, balık ve doymamış yağ içeren Akdeniz diyeti, C ve E vitamini, selenyum, nonsteroidal antiinflatuar ilaç kullanımı, östrojen kullanımı, egzersiz ve bilişsel aktivitelerin AH riskini azalttığını bildirmiştir (30). Finlandiya'da yapılan uzun süreli randomize kontrollü FINGER çalışması, sağlıklı beslenme, fiziksel egzersiz, kognitif çalışmalar ve sosyal aktivitelerin, risk grubundaki insanların AH'na yakalanma riskini azaltabileceğini göstermiştir (31).

2.1.2. Alzheimer Hastalığının Fiziopatolojisi

AH'nın en önemli patolojik özellikleri, çözünbilir olmayan bir protein olan β -amiloid proteinlerinin birikimi ile oluşan β -amiloid plaklar ve tau proteinlerinin hiperfosforilasyonu sonucunda oluşan çift filamenli sarmal olan nörofibriller yumak (NFY)lardır. Hiperfosforile olmuş tau proteini mikrotübüller yoluyla nöronal hasara neden olur (32). AH'nın erken evrelerinde hipokampus ve temporal lobların medial kısımlarında belirgin olan serebral atrofi de makro patolojik bulgulardandır.

SSS'de oluşan amiloid prekürsör protein (APP), fizyolojik olarak α -sekretaz ile çözünbilir (soluble) amiloid prekürsör protein α (sAPP α)'ya dönüşür ve fizyolojik mekanizmalar ile bu protein çözünerek yok edilir. Alzheimer Hastalığının fiziopatolojisinde ise APP, β -sekretaz (BACE-1) enzimi aracılığıyla çözünür (soluble) amiloid prekürsör protein β (sAPP- β)'ya dönüşür. Her iki çözünür protein, α -sekretaz ile çözünür ancak sAPP- α proteini tam olarak çözünürken sAPP- β proteinin çözülmesinden geriye çözünemeyip plaklara neden olan β -amiloid proteinler kalır (33).

Subkortikal nükleuslarda oluşan dejenerasyon ve biyokimyasal bozukluk, kortikal nörotransmisyonun bozulmasına neden olur. Nükleus bazalis (kolinerjik), substansia

nigra'nın A4 subgrup çekirdekleri (dopaminerjik), lokus seruleus (noradrenerjik) ve median rafe (serotonerjik) çekirdeği en çok etkilenen bölgelerdir. Kolinerjik sistemin öğrenme ve bellek üzerindeki rolü özellikle M1 reseptörleri aracılığıyla olmaktadır. Bu nedenle kolinerjik sistemi etkileyen ilaçlar AH ile gözlenen öğrenme ve bellek kaybı tedavisinde en sık kullanılan ilaçlardır (34).

Kognitif bozukluk klinik olarak görülmeden önce, nöronlar, mikroglialar ve astroglialarda bozulma (dejenerasyon) başlamaktadır. Bu durum hastalığın sinsi ilerlemesine neden olmaktadır (35). β -Amiloid birikimi tau patolojisine sebep olmakla birlikte bu yolak tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir (36).

Alzheimer hastalığının fizyopatolojisinde nöroinflamasyonun yeri olduğu bilinmektedir. Biriken amiloid plakların nöroinflamasyona neden olduğu düşünülmektedir. Ancak son zamanlardaki çalışmalar, inflamasyonun yalnızca nörodejenerasyonun bir sonucu olmadığını, aynı zamanda bu süreçte önemli bir yeri olabileceğini de düşündürmektedir. Birikmiş olan protein kümeleri, protein agregasyonunu ve nörodejenerasyonu daha da kötüleştiren nöroinflamasyonu indükleyebilir. Görülen odur ki, inflamasyon protein agregasyonundan daha erken gerçekleşmeye başlamaktadır. SSS hücrelerindeki genetik varyasyonlar veya periferik bağışıklık hücreleri tarafından indüklenen nöroinflamasyon, bazı duyarlı popülasyonlarda protein birikimini indükleyebilir. Nörodejenerasyonun patogenezinde çok sayıda sinyal yolu ve bir dizi SSS hücresinin rol oynadığı öne sürülmüştür, ancak bunlar hala tamamen anlaşılmaktan uzaktır (37).

Fizyolojik koşullarda, bağışıklık tepkisi yararlıdır, kendini sınırlar ve doku hasarı onarıldıktan veya enfeksiyon ortadan kaldırıldıktan sonra çözülür. Ancak bazı durumlarda, inflamatuvar bir uyarının temizlenememesi nedeniyle normal çözünürlük mekanizmaları doğru işlemeyebilir ve bunun sonucunda nörotoksik faktörlerin salınmasına ve hastalığın şiddetlenmesine yol açabilen kronik inflamasyon meydana gelir (37). Kalıcı bir uyarın, endojen faktörler (örn. protein agregatları), çevresel faktörler (örn. sistematik enfeksiyon, bağırsak komensal disbiyozu, yaşlanma, diyet), ve genetik duyarlılık (örn. progranülin (PGRN) mutasyonları, apolipoprotein E4 (APOE4) mutasyonları) tarafından oluşturulabilir (38).

Aktive edilmiş mikroglia ve astrositler nöronları korumak için birden fazla reseptör aracılığıyla A β 'yi fagosite eder (39), ancak agregatları temizleyememek kalıcı kronik inflamasyona ve sitokinler, kemokinler, reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrik oksit (NO)

dahil olmak üzere çeşitli proinflatuar ve toksik ürünlerin salınmasına yol açar; bu da bağışıklık tepkilerini güçlendirir ve nörotoksositeye yol açar (40). Glial hücrelerin aktivasyonu, başlangıçtaki A β agregasyonu ile daha sonraki tau agregatlarının gelişimi arasında bir bağlantı sağlayabilir, Mikroglia aktivasyonu tau agregasyonunu önceler ve tau hiperfosforilasyonunu teşvik eder, bu da daha sonra nörofibriler yumakların oluşumuna yol açar (41). Sinir liflerinde tau düğümlerinin birikmesi nöronal fonksiyon kaybına ve en sonunda apoptoza ve bağışıklık hücresi aktivasyonuna yol açar. Ayrıca, hiperfosforile edilmiş tau'nun membran çift katmanlarını bozabileceği ve TLR4 aracılığıyla insan makrofajlarını aktive edebileceği gösterilmiştir. Son zamanlarda, çözünür ve oligomerik amiloid protein yüklü nöronların benzersiz bir inflammatuar profil sergilediği bulunmuştur. Bu nöron-spesifik inflammatuar yanıt, çözünmeyen A β plak ve tau yumak oluşumundan önce bile gerçekleşebilir ve bu durum, A β 'nin intranöronal birikiminin hastalığın gelişimi sırasında çok erken bir olay olduğunu ve Alzheimer hastalığı patogenezinde önemli bir immünolojik bileşen olduğunu düşündürmektedir (37).

Özetle, patojenik protein agregasyonu ve nöroinflamasyonun nörodejenerasyonu kötüleştirmek için karşılıklı bir durum sergilediği açıktır. Ancak hangisinin başlatıcı olduğu hala net değildir (37).

2.1.3. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi

2018'deki "Alzheimer's Disease International"ın raporuna göre Dünya çapında 50 milyon insan demanstan muzdariptir ve bu sayının (2/3'ü orta ve dar gelirli ülkelerde yaşayanlardan oluşacak şekilde) 2050 yılında 3 katına çıkacağı düşünülmektedir (1). AH'nin de 2050 yılına kadar 100 milyon insanı doğrudan etkileyeceği tahmin edilmektedir (42). Dünya çapında halk sağlığı sorunu olarak AH'nin önemi artmakta ve bu hastalıkla mücadele sağlık harcamalarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bunda hastalığa dair etkin bir tedavi olmaması, hastalığın semptomlarına yönelik tedavi yöntemlerinin hâkim olmasının yanı sıra hastalığın ileri evrelerinde artan bakım masrafları, işgücü kaybı ve bakım verenin sosyal hayattan ve iş yaşamından kopması da etkindir (43). Radikal bir tedavisi olmayan bu hastalık ölüm sebeplerinde dördüncü veya beşinci sırada yer almaktadır (44). Türkiye'de 2015'te yapılan bir araştırmaya göre Alzheimer hastalığının prevalansı %6,4 civarındadır (45).

2.1.4. Alzheimer Hastalığının Genetik Faktörleri

Alzheimer Hastalığı %60-80 oranında kalıtsal faktörlere bağlıdır (17). AH riskini artıran 40'tan fazla genetik allel bulunmuştur. Bunların çoğunluğu nadir görülen alleler olup, en sık görülen APOEε4 alleli 3-4 kat artmış riskle ilişkilendirilmiştir (18). Allelere sahip olup olmadığı üzerinden yapılan bir poligenik risk skorlaması, kontrol grubu ile AH grubunu %75-85 oranında doğru tespit etmiştir (46, 47).

APOEε4 alleli riski artırmakta iken, APOEε2 alleleline sahip olmak AH riskini, sahip olmayanlara göre 2 kat azaltmaktadır (48). Nadir bir allel olan APP^{S2}'deki Ala673Thr Icelandic mutasyonu, uzun süreli kognitif sağlıkla ilişkilendirilmiştir. Yine nadir bir mutasyon olan PLCG2 genindeki Pro522Arg amino asit değişikliği, sadece AH değil Demans'ın tüm tiplerine karşı 2 kat risk azalması sağlamakta ve 100 yaşına kadar sürebilen kognitif sağlıkla ilişkilendirilmektedir (49 , 50).

2.2 Alüminyum – Alzheimer Hastalığı ilişkisi

Alüminyum (Al), uzun süredir ilaç sektörü ve günlük yaşamda sıkça kullanılan bir metaldir. Son yıllarda Alüminyuma kronik maruziyetin sistemik etkileri konusunda tartışmalar giderek artmaktadır. Metalin çevresel etkenlerde bulunması bir sağlık sorunu olarak görülmemekle birlikte, geçmişte kullanılan alüminyum içeren fosfat bağlayıcıları nedeniyle diyaliz demansına (51) ve demir eksikliği olmaksızın mikrositer anemiye (52) neden olduğu gösterilmiştir. Alüminyum bir nörotoksin olarak tanımlanmıştır (53). İçme suyunda yüksek doz alüminyum maruziyeti serebral dokuda azalmaya, konsantrasyon ve kısa-dönem hafıza problemlerine yol açmaktadır (13). Alüminyum kan-beyin bariyerini aşabilmekte ve beyin dokusunda birikmektedir (54 , 55). İnsan vücudundaki herhangi bir biyolojik süreç alüminyum gerektirmemektedir. Ancak alüminyumun beyindeki yüzlerce reaksiyonu etkileyebildiği, aksonal transport, nörotransmitter sentezi, sinaptik ileti, protein fosforilasyonu ve defosforilasyonu, gen ekspresyonu ve inflamatuvar cevap gibi olayları bozabildiği bilinmektedir (56). Alüminyumun amino asitlerle bağlanması sonucu agregasyon ve fazla fosforile olmuş proteinler oluşmakta ve bu mekanizma nöronlar ve glial hücrelerde apoptoza yol açmaktadır (57).

Alüminyum maruziyeti nörodejenerasyona yol açmaktadır (58). Yapılan çalışmalar alüminyumun nörofibriler dejenerasyona yol açtığını ve nörofibriler yumak/üçgen (NFY)'lerin oluşumuna neden olduğunu göstermiştir (59,60). AH hastalarının beyin

dokusunda yüksek oranda alüminyum bulunduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (61, 12, 62). Alüminyumun bu etkisinin, tau proteinin fosforilasyonunu engelleyerek tau agregasyonuna yol açması üzerinden olduğu düşünülmektedir (63) ancak bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

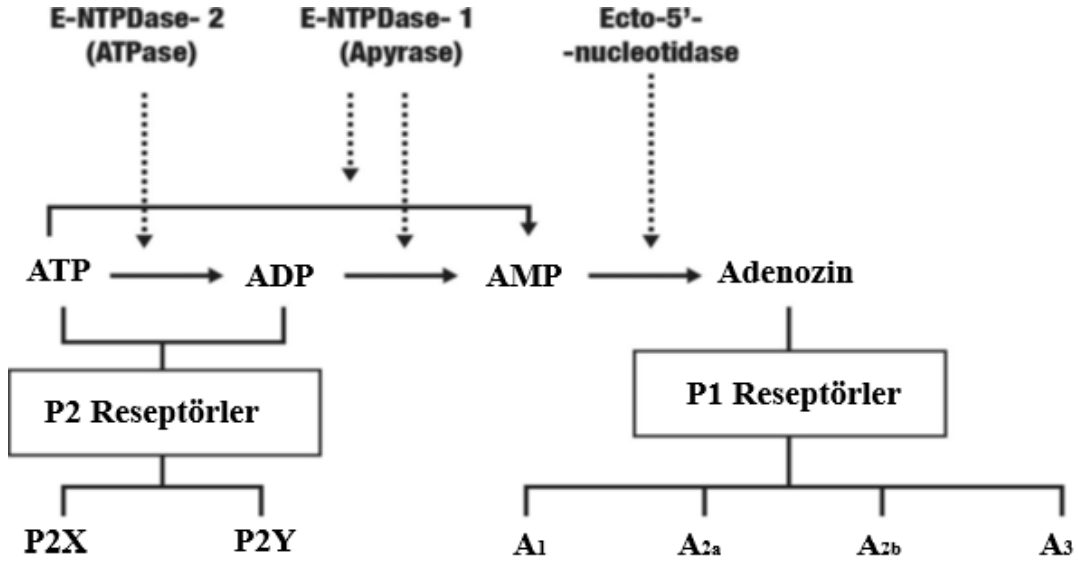
Tau proteini üzerinden etkisinin yanında, Alüminyumun β -amiloid proteinin üretimini ve agregasyonunu artırdığı, çözülmesini engellediği görülmüştür (64,65). Farelerde oral Al maruziyeti, β -amiloid plakların oluşumunu artırmıştır (66) β -amiloid plakların alüminyum ile birleşmesi sonucu daha toksik düzeye ulaşarak, sadece AH oluşumunda değil, hastalığın ilerlemesini de hızlandırdığı düşünülmektedir (67).

Alüminyum ayrıca, lipid peroksidasyonunu artırarak oksidatif strese neden olmaktadır (68). Bu etkisi, demir metali ile girdiği etkileşim sonucunda olmaktadır (69). Alüminyumun şelatörü olan desferrioksamin kullanılan AH hastalarında kognitif gerilemenin azaldığı görülmesi de Alüminyum-AH ilişkisine dair kanıtları güçlendirmektedir (70).

2.3. Kafein ve Alzheimer

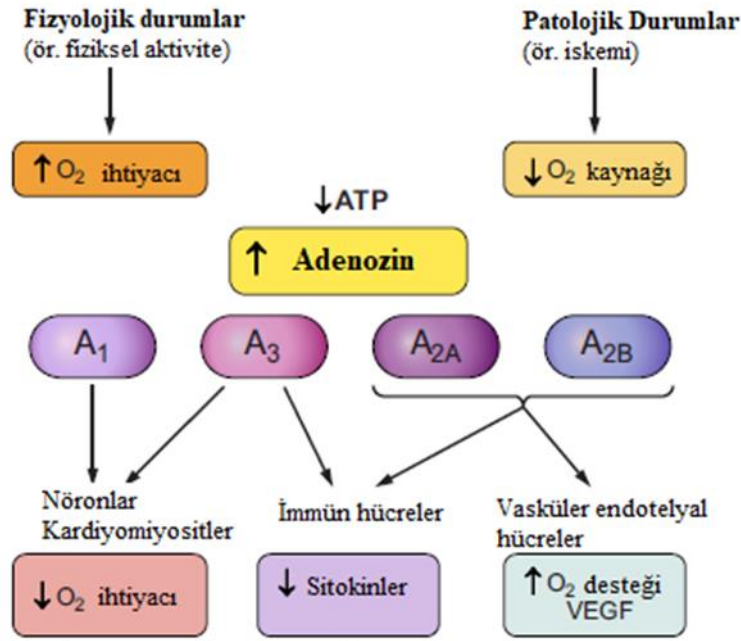
2.3.1. Adenozin Reseptörleri

Adenozin vücutta yaygın olarak bulunan, etkisini G protein bağımlı dört adet reseptör aracılığıyla gösteren endojen bir pürin nükleotididir. 1981'de bir bakteride yapılan araştırma ile hücre enerji mekanizmasındaki rolü ilk defa ortaya konulmuştur (71). Oksidatif enerji üretimi ile Adenozin molekülüne fosfat bağlanması yüksek enerjili bir bileşik oluşturmaktadır. Adenozin Mono Fosfat (AMP), Adenozin Di Fosfat (ADP) ve nihayet Adenozin Tri Fosfat (ATP) oluşturan hücreler, enerji gereksinimleri durumunda ATP'yi bir fosfat bileşimini ektonükleozid trifosfat difosforilaz (CD39) enzimi aracılığıyla kopararak ADP veya AMP'ye dönüştürmek suretiyle kullanırlar.



Şekil 2.1. Adenozin metabolizmasının ekto-enzimler ve adenozin ve pürinerjik reseptörlerle olan bağımlı gösteren şema. (72) No'lu kaynaktan alınmıştır.

Enerji gereksiniminin arttığı ve/veya oksijen yetersizliği gibi sebeplerle yeterli ATP üretilmediği durumlarda AMP'deki yüksek enerjili fosfat da 5'-nükleotidaz (CD73) enzimi aracılığıyla koparılır ve ortaya Adenozin molekülü çıkar (73). Oksijen ihtiyacı artan veya enerji tüketimi nedeniyle oksijen kaynağı azalan hücrede adenozin trifosfat (ATP)/adenozin dengesi adenozin lehinde değişmektedir ve interselüler bölgede adenozin seviyeleri artmaktadır. Hücrede adenozin reseptörlerinin aktivasyonu, GABA/glutamat düzeylerine değişime neden olmakta ve uyku/uyanıklık döngüsünün kontrolünde rol oynamaktadır (10).



Şekil 2.2. O₂ azalması sonucunda artan adenosin seviyeleri adenosin reseptörlerini aktive ederek fizyolojik değişikliklere neden olur (10) No'lu kaynaktan alınmıştır.

Adenosin molekülünün artışı, hücrenin enerji ihtiyacının karşılanamadığının bir göstergesi olarak görülebilir. Adenosin molekülü, daha az olarak “konsantratif nükleozid transporterları” (CNTs) ve daha fazla “dengeleyici nükleozid transporterları” (ENTs) aracılığıyla hücre zarını geçer. ENTs konsantrasyon gradyenti yönünde geçişe izin verirken CNTs konsantrasyon farkının tersi yönünde geçişini sağlamaktadır. Fizyolojik koşullarda adenosin akışı daha çok hücre dışından hücre içine doğru olmakta ise de hipoksi durumunda hücre dışına doğru daha fazla olmaktadır (74).

Adenosinin etkileri 4 adet reseptör aracılığıyla olmaktadır. İsimlendirmeleri, A1, A2a, A2b ve A3 şeklindedir. Adenosin reseptörleri, sinir sisteminde olduğu kadar, kardiyovasküler, solunum, gastrointestinal, ürogenital ve immün sistemlerde yaygın olarak bulunmaktadır (75). Bu reseptörlerden A2b reseptörü adenosine en az afiniteye sahiptir. A1 ve A3 reseptörleri Gi, A2a ve A2b reseptörleri ise Gs bağımlıdır. A1 ve A2a reseptörleri birbirine aksi yönde etki etmekte, adenosin düzeyleri düşük olduğunda A1 reseptörü etkisi ortaya çıkmakta, Gi bağımlı reseptör, adenilat siklaz (AC), protein-kinaz-A (PKA) ve dolayısıyla -merkezi sinir sisteminde inhibitör etkisi olan- GABA'nın geri alınımını azaltmaktadır. Adenosin düzeyleri yüksek olduğunda ise daha çok A2a reseptörlerini aktive etmektedir. A2a reseptörleri, A1 reseptörlerini inhibe etmekte ve hem bu yolla hem de Gs proteini aracılığıyla AC/cAMP/PKA yolu ile GABA geri alınımını artırmaktadır (76).

A1 reseptörü, kalp atriumunda, böbrekte, adipoz dokuda ve pankreasta bulunmaktadır ve kalpteki etkileri negatif kronotropik, inotropik; böbrekte renal kan akımını ve renin salınımını azaltmak, pankreas ve adipoz dokuda da lipolizi ve insülin sekresyonunu azaltmak yönünde olmaktadır (77,78,79,80). Merkezi sinir sisteminde ise A1, temel olarak korteks, serebellum, hipokampus, otonom sinir ganglionları, spinal kord ve glial hücrelerde üretilmektedir (81). Uyku/uyanıklık döngüsü, ağrı iletimi, sedasyon, konvülsiyon ve anksiyeteye dair etkileri, muhtemelen bu geniş dağılımından kaynaklanmaktadır (82). A1 agonistlerinin anti-nosiseptif ve antihiperalezik etkileri üzerine çalışmalar mevcuttur (83). Ancak bu agonistlerin sistemik uygulanmasında ortaya çıkan SSS ve kardiyovasküler yan etkiler nedeniyle klinik çalışmalarda başarılı olunamamıştır (10).

A2a reseptörleri vücutta yaygın olarak bulunmakla birlikte en yoğun striatumda ve immün sistemde yerleşmektedir. A2a reseptörlerinin pre ve postsinaptik nöronlarda yerleştiği gösterilmiştir. Periferik immün hücre göçünü, Kan-Beyin Bariyerini (KBB) nöronal glutamat salınımını organize etmesi, bu yerleşimi ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (84). Striatumda A2a'lar dopamin 2 reseptörü (D2R) ile birlikte bulunmaktadır (85). A2a'ların aktivasyonu D2R'a agonistlerin bağlanmasını azaltmaktadır. Bu durum A2a antagonistlerinin Parkinson Hastalığı için yeni bir terapötik ajan olarak değerlendirilmesine yol açmıştır (86). İlk olarak Japonya'da kullanıma giren A2a antagonisti istradefylline, 2019 yılında Parkinson Hastalığı için FDA onayı almıştır.

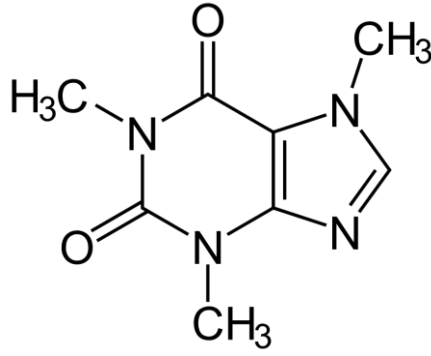
A2a'ların, AH, Huntington, epilepsi gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde bir hedef olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar devam etmektedir (87,88). AH hastalarının Amiloid prekürsör protein (APP) üreten astrositlerinde A2a'lar arttığı gözlemlenmiştir. Astrositlerinde A2a üretimi olmayacak şekilde transgenik olarak üretilen farelerde uzun dönem hafızanın güçlendiği görülmüştür (89). A2a'ların blokajı, hipokampüste glutamat/GABA oranını normale döndürmekte, nöroinflamatuvar markerların ve TAU hiperfosforilasyonunun önüne geçmektedir (87). Kafein'in nöroprotektif etkisinin esasen A2a reseptörünün antagonizması nedeniyle olduğuna dair görüşler mevcuttur (90).

A2b reseptörleri daha çok periferde bulunmaktadır. Gastrointestinal sistemde, mesanede ve endotel, immün sistem hücreleri trombositler gibi birçok hücrede bulunmaktadır. SSS'te ise astrosit nöron ve mikroglialarda bulunmaktadır (86),(91). A2b reseptörü diğer adenosin reseptörlerine kıyasla adenosine daha düşük afiniteye sahiptir (92).

A3 reseptörlerinin beyin dokusundaki konsantrasyonları nispeten düşüktür ve talamus, hipotalamus, korteks, retina ganglion hücreleri ve pia dokusunda görülmektedir (93). Bazı kanser hücrelerinde aşırı ekspresyonun görülmesi, antitümöral bir rolü olabileceğini düşündürmüştür (94). A3 reseptörleri genel olarak Gi aracılığıyla cAMP seviyelerini düşürmekte ise de diğer bir yolak olarak RhoA ve fosfolipaz-D yolağını da etkilemektedir. A3 reseptörünün nöroprotektif etkisinden RhoA yolağının sorumlu olduğu düşünülmektedir (10).

2.3.2. Kafein ve Alzheimer Hastalığı İlişkisi

Kafein, kahve çekirdekleri, kola içeceği, çay yaprakları ve kakao içerisinde bulunan doğal bir ksantin alkaloididir (95). Bazı opioid (ör: Kodein) veya ateş düşürücü (ör: Parasetamol) ilaçlarda olarak kullanılabilirdiği gibi, enerji içecekleri, spor takviyeleri gibi rekreasyonel gıdalarla da kullanılabilir. Metil grupları 1,3,7 pozisyonunda bulunup '1,3,7-trimetilksantin' olarak isimlendirilmektedir (96). Kafeinin etkisi, daha sık A1 ve A2a reseptörleri olmak üzere adenosin reseptör antagonizması yoluyla olmaktadır. Bu reseptörlerin blokajı ile glutamaterjik, dopaminerjik, serotoninerjik, kolinerjik ve noradrenerjik yolaklar ile GABA reseptör fonksiyonunu modüle ettiği düşünülmektedir. Kafein, Adenosin reseptörlerini bloke ederek GABA'nın inhibe edici etkilerini azaltır (97,98,99). Kafeinin oral biyoyararlanımı yüksek olup diyetle alımı sonrası %99 oranda gastrointestinal sistemden emilmektedir ve ortalama 15-20dk içerisinde plazma doruk konsantrasyonuna ulaşmaktadır (100). Temel eliminasyon yolu, (%70-80) karaciğerde CYP1A2 enzimi ile indüklenen metabolizasyondur (101). Dolayısıyla CYP1A2 enziminin down veya up-regülasyonu, kafeinin metabolizasyonunu değiştirmektedir. Sigara içenlerde kafeinin eliminasyonu hızlanmakta, kan kafein seviyeleri daha hızlı düşmektedir (96). European Food Safety Authority (EFSA)'nın raporuna göre günde 400mg'a kadar kafein alımı, ek hastalığı olmayan sağlıklı yetişkinler için güvenli kabul edilmektedir (102).



Şekil 2.3. Kafeinin kimyasal yapısı

Kafeine yönelik son dönemlerde yapılan çalışmalar, Tip-2 DM, kardiyovasküler hastalıklar, Parkinson Hastalığı ve muhtemelen Alzheimer Hastalığına yönelik koruyucu etkilerinin olabileceğini göstermiştir (103,104). Yetişkinlerde kafein kullanımı ile AH arasında negatif korelasyon gösteren çalışmalar mevcuttur ancak kafein kullanımı ile beraber olabilecek farklı yaşam tarzlarının de etkisi olabileceği göz ardı edilmemelidir (105–107). Ayrıca kafeinin nöroprotektif etkisi değerlendirilirken, en sık alım yolu olan kahve ve çay içerisindeki antioksidanların da bu etkiye katkısı olduğu düşünülmektedir. Örneğin kahvenin içerisinde kafeinin yanısıra, Kan-Beyin-Bariyerini onardığı düşünülen klorojenik asit, antioksidan özelliği olan kafeik asit ve oksidatif stresi azalttığı gösterilmiş olan trigonelline gibi bileşikler de bulunmaktadır (96,108).

Kafeinin kognitif faaliyetleri artırdığına yönelik değil, kognitif fonksiyonların normalleşmesine yardımcı olduğuna dair bulgular daha güçlüdür. Kognitif faaliyetleri zaten azalmış olan deneklerin kafeinden yararlanımı oldukça düşük veya yoktur (109,110). Mevcut literatürdeki gerek insan çalışmaları gerekse hayvan in vivo ve in vitro çalışmaları, kafeinin AH'na yönelik koruyucu etkisini göstermektedir ancak bu bağlantının yolaklarının açıklanması için daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır (96).

2.4. Alzheimer Hastalığı Hayvan Deney Modelleri

Alzheimer hastalığının fizyopatolojisinin aydınlatılması ve ilaç çalışmaları için oluşturulan hayvan modelleri, transgenik olan ve transgenik olmayan olarak ikiye ayrılabilir. Transgenik modeller, tau üretimine neden olanlar ve β -amiloid birikimine neden olanlar olarak ikiye ayrılabilir. Transgenik olmayan modeller kimyasal bileşik uygulamaları, iatrojenik lezyon oluşturma, SSS'ne direkt olarak β -amiloid uygulanması, hiperinsülinemi

ile insülin/fosfoinazitid-3-kinaz yolağı uyarılması, streptozosin ile indüklenen model, yüksek kolesterolle beslenme ve D-galaktoz uygulanması olarak sayılabilir.

Patolojik sonuçları bilinmesine rağmen Alzheimer hastalığının fizyopatolojik yolağı tam olarak açıklanabilmiş değildir. Risk faktörleri arasında genetik mutasyonlar görülmüştür ancak tüm genetik varyasyonlar göz önüne alındığında dahi hastalığın ancak %70-80 oranında tahmin edilebilmesini sağlamıştır. Oluşan β -amiloid plaklar ve tau proteinlerinin neden olduğu NFY'lar ise hastalığın sebebi değil sonucu olarak düşünülmektedir. Hastalığa neden olabilen dış etkenler (yüksek kolesterol, insülin direnci, alüminyum maruziyeti gibi) hastalığa yol açmakla birlikte hem genetik olarak değişiklik göstermekte hem de hangi yollarla hastalığa sebep olduğu tam açıklanamamaktadır. SSS'de öğrenme ile ilgili öneminin bilindiğı muskarinik reseptörleri antagonize etmek, kognitif bozukluğa neden olmakta ise de tam bir Alzheimer modeli olup olmadığı tartışmalıdır. Tüm bunlar, tam bir Alzheimer modeli oluşturabilmek için bilimsel çalışmaların önünde engel olarak durmaktadır.

Hastalığın genetik yatkınlığını temel alan transgenik modeller, zigot hâlindeki, embriyonun pronükleusuna mikroenjeksiyon yoluyla rekombinant DNA'nın verilmesi ile üretilmektedir. Bu şekilde doğan hayvanlar anaç kabul edilerek, normal rodentler ile çiftleştirilmesinden sonra doğan yavrularda transgenin varlığı araştırılarak kendi aralarında çiftleştirilme yolu ile üretim hatları oluşturulur.

Transgenik olmayan modellerde, direkt olarak SSS'ne β -amiloid protein uygulaması kullanılabilir. Hastalığın fizyopatolojisini açıklamaktan çok, ilaç üretimi ve davranışsal testlerin kıyaslanması için kullanılmaktadır. Diğer bir transgenik olmayan yöntem, ovariectomi yapılarak östrojen eksikliğine neden olunmuş rodentlere D-Galaktoz uygulaması yöntemidir (111). Bu uygulama ile 6 hafta sonunda nöronal kayıp ve β -amiloid plaklar gözlenmiştir (112).

Yüksek kolesterolle beslenme veya hiperinsülinemi yoluyla metabolik süreçlerle Alzheimer benzeri model üretilebildiğı gibi, metabolizması sonucunda pankreastaki beta hücrelerini yok eden bir metabolit oluşturan streptozosinin intraserebral enjeksiyonunun da beyin dokusunda küçülme, tau ve β -amiloid plak oluşturma yoluyla Alzheimer hastalığı modeli oluşturabildiğı görülmüştür (113).

Vücutta herhangi bir mekanizma için esansiyel olmayan alüminyumun kronik maruziyeti sonucunda Alzheimer hastalığının oluşabildiğı görülmüştür. Alüminyumun

intraperitoneal ve oral kronik maruziyetleri ile AH hayvan modelleri oluşturulmuştur (57,114).

SSS'de öğrenme ile ilişkisi gösterilmiş olan M1 reseptörlerinin antagonizması da bir Alzheimer modeli olarak karşımıza çıkmaktadır (115,116). En sık kullanılan skopolamin, non-selektif bir muskarinik reseptör antagonistidir (117). Skopolamin, antikolinergik Alzheimer modeli oluşturmak için neredeyse bir altın standart molekül olarak kullanılsa da, yaygın periferik etkileri ve tüm muskarinik reseptörlere olan afinitesi, davranış testlerindeki gerilemeye yan etkilerin sebep olmasının göz ardı edilemeyeceğini de akılda tutmak gerekir (118).

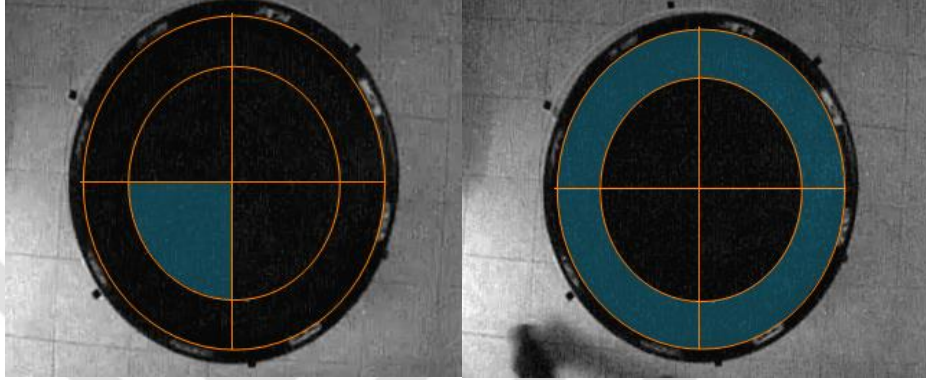
2.5. Santral Sinir Sisteminde Kolinergik Sistemin Rolü

Nörotransmitter olarak asetilkolinin kullanıldığı kolinergik sistem, G-protein kenetli 5 adet muskarinik reseptör (M1-5) ve iyon kanalı olan nikotinik reseptörler üzerinden etki etmektedir (119). Kolinergik sistemdeki bozulmalar, hafıza kaybı ve kognitif bozuklukla ilişkili bulunmuştur (120). Nitekim günümüzde AH tedavisinde kullanılan temel ilaçlar, kolinesteraz inhibitörleridir (ör:donepezil, rivastigmin, galantamin). Ancak geniş etki ve yan etkileri bulunan kolinesteraz inhibitörlerinin Alzheimer hastalığını tedavi etmekten çok semptomların geriletilmesi veya hastalığın yavaşlatılması gibi etkileri olmaktadır. Son zamanlarda, SSS'de yaygın olarak bulunan ve öğrenme-bellek-kognisyonla ilişkisi görülmüş olan M1 reseptörleri üzerine araştırmalar yoğunlaşmıştır. Öyle ki, M1 reseptör agonisti olan ilaçlar (ör: cevimeline, xanomeline) Faz-0 deneylerinde umut vaat etmiş ancak insan deneylerinde, tedavi edici doza ulaşmadan önce ortaya çıkan geniş yan etkiler nedeniyle çalışmaları durdurulmuştur. Günümüzde hâlâ devam etmekte olan, M1 reseptörlerinin pozitif allosterik modülatörleri (PAM) üzerine çalışmalar devam etmektedir (121).

2.6. Morris Water Maze Davranış testi

Water Maze testi, ilk olarak 1984'te Richard Morris tarafından geliştirilmiş, fare ve sıçanlarda hafıza mekânsal algı ve öğrenmeyi araştıran bir testtir (122). Bulunduğu günden itibaren çeşitli protokol farklılıkları ile denenmesine rağmen testin temel prensibi, su dolu bir tankın içerisine bırakılan deney hayvanlarının, tankın bir bölümünde bulunan platformu bularak sudan çıkması üzerinedir. Genel olarak beyaz hayvanlar için siyah, siyah hayvanlar

için ise beyaz veya pleksiglas tanklar tercih edilmektedir. Platformun etrafında hayvanların görebileceği şekilde belirteçler asılmaktadır. Bu belirteçler genelde yön belirten (N,S,W,E gibi) işaretler olmaktadır. Tank mümkünse bir kamera tarafından izlenmekte ve hayvanların tüm hareketleri kayıt altına alınmaktadır. Tank hayali olarak belirli bölmelere ayrılmış kabul edilmektedir.



Şekil 2.4. Morris Water Maze su tankı ve bölmeler. Mevcut çalışmamızda kullanılan su tankının yukarıdan kamera görüntüsü, bilgisayar ortamında sarı renkte görülen çizgilerle bölmelere ayrılmıştır. A resminde mavi ile boyalı kısım, platformun bulunduğu bölmeyi işaretlemektedir. B resminde ise tankın periferi mavi ile boyanmıştır.

Hayvanlar suyun içerisinde platformu belirli bir süre aramakta, eğer belirlenen sürede bulamazsa platforma araştırmacı tarafından çıkarılarak bir süre bekletilip sonra kafesine alınmaktadır. Süre dolmadan platformu bulan rodentler ise bir süre platformda bekletildikten sonra kafeslerine alınmaktadır. Günler içerisinde hayvanların platformu bulma süresinin kısılması beklenmektedir. Son gün platform ortadan kaldırılmakta, hafıza bozukluğu olmayan fareler platformu arayarak önceden platformun olduğu bölümde daha fazla vakit geçirmektedir. Farelerin platformun olduğu bölüme ilk giriş yapma süreleri, platformu bulma süreleri, periferde geçirdikleri süreler ve son gün platformun olması gerektiği bölmede geçirdikleri süreler kayıt altına alınmaktadır.

Hayvanların ortalama yüzme hızları da ayrı bir parametre olarak değerlendirilmekte, deney grupları arasında fark olup olmaması, grupların hafıza ve bilişsel aktivite dışında bir farkı olmadığı yönünde değerlendirilmektedir (123).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Deneysel Hayvanları

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (SABİDAM) ile Tıp Fakültesi Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya başlamadan önce Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneysel Yerel Etik Kurulu tarafından; 05.03.2020 tarih ve 2020/11 sayılı karar gereğince çalışma izni alınmıştır. Çalışmamızda 25-35 gram ağırlığında 10-12 haftalık 66 adet Swiss albino erkek fareler kullanıldı. Fareler 90 gün boyunca SABİDAM'da 12 saat aydınlık-12 saat karanlık ortamda ışıklandırılan, 22 ± 2 °C'deki odalarda, standart pelet yem ile beslenip, yem ve su alımı serbest bırakılarak, standart kafeslerde barındırıldı. Daha sonra fareler Morris Water Maze testi için Çukurova Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı'na alındı ve davranış deneyleri gerçekleştirildi.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmamızda deneysel Alzheimer modeli oluşturmak amacıyla, ilgili gruplara $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ (Aluminum chloride hexahydrate/Sigma-Aldrich) kullanıldı. Model oluşturulabilmek için hesaplanan alüminyum klorür miktarı hassas terazide tartılarak içme suyunda çözüldü. Hazırlanan solüsyon, farelerin suluklarına doldurularak, literatüre göre günde yaklaşık 50 mg/kg/gün dozunda alüminyum klorür alacakları şekilde hesaplanarak 0.3mg/ml olarak eklendi (124). Ayrıca ilgili gruplardaki farelere Kafein (Caffeine/ Sigma-Aldrich) içme suyuna hassas terazi ile tartılarak 0,3mg/ml dozunda hazırlanarak eklendi. Bu şekilde farelerin, insanlarda günlük 500mg (günde 5 kupa kahve) tüketimine eş kafein alması hedeflendi (124). İlgili gruplara Biperiden (Biperiden hydrochloride/ Sigma-Aldrich) intraperitoneal olarak 3mg/kg olacak şekilde (125) haftada 1 kez uygulandı, diğer gruplara aynı günde i.p olarak sham (SF) uygulandı. Davranış deneylerinin bitiminde farelere servikal dislokasyon anestezisi altında yapabilmek için öncesinde, 100 mg/kg Ketamin hidroklorür (Keta-Control) + 10 mg/kg Ksilazin hidroklorür (Bayer) kombinasyonu intraperitoneal olarak uygulandı.

3.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Deneysel Alzheimer modeli oluşturulan farelerin davranış, öğrenme ve belleklerini değerlendirmek amacıyla Morris Water Maze deney düzeneği kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışma Yeri ve Şartları

Çalışmada kullanılan fareler SABİDAM' da barındırıldı. Çalışma boyunca farelere alüminyum klorür, kafein verilmesi, ilaç uygulanması, su tüketimi takibi ve farelerdeki ağırlık değişimi gibi rutin çalışmalar Çukurova Üniversitesi SABİDAM' da yapıldı. Morris Water Maze testi için fareler 90 günlük ilaç uygulamalarının ardından Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Nörofizyoloji laboratuvarına götürülerek bir hafta ortama alışması için bekletildi ve bu laboratuvarında Morris Water Maze deneyleri gerçekleştirildi. Çalışmanın sonunda fareler SABİDAM'a götürülerek servikal dislokasyon ve dokuların alınması işlemi uygulandı. Oluşan tıbbi atıklar kırmızı renkli tıbbi atık poşetlerine konuldu.

3.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılışı

Çalışmada kullanılan alüminyum klorür ve kafein içme suyuna oral yoldan, biperiden ise intraperitoneal (i.p.) yoldan uygulandı.

Çalışmada toplam 6 grup oluşturuldu:

- 1. Kontrol grubu (n=11):** Bu gruptaki farelerin 7/24 normal içme suyu ve yiyeceğe erişimi vardı. Biperiden verilen gruba biperidenin uygulandığı gün, i.p. yolla bu gruba sham olması amacıyla sadece SF içeren solüsyon uygulandı.
- 2. Alüminyum grubu (n=11):** Bu gruptaki farelerin içme suyuna, hassas terazi ile hesaplanarak 50mg/kg/gün olacak şekilde alüminyum 90 gün boyunca eklendi. Biperiden verilen gruba biperidenin uygulandığı gün, i.p. yolla bu gruba sham olması amacıyla boş SF uygulandı.
- 3. Kafein grubu (n=11):** Bu gruptaki farelerin içme suyuna, hassas terazi ile hesaplanarak 0,3mg/ml olacak şekilde kafein 90 gün boyunca eklendi. Biperiden

verilen gruba biperidenin uygulandığı gün, i.p. yolla bu gruba sham olması amacıyla boş SF uygulandı.

- 4. Biperiden grubu (n=11):** Bu gruptaki farelerin 7/24 normal içme suyu ve yiyeceğe erişimi vardı. Deneyin son 1 ayında haftada 1 gün i.p. yolla 3 mg/kg olacak şekilde biperiden uygulandı.
- 5. Alüminyum+Kafein grubu (n=11):** Bu gruptaki farelerin içme suyuna, hassas terazi ile hesaplanarak 50mg/kg/gün olacak şekilde alüminyum ve hassas terazi ile hesaplanarak 0,3mg/ml olacak şekilde kafein 90 gün boyunca eklendi. Biperiden verilen gruba biperidenin uygulandığı gün, i.p. yolla bu gruba sham olması amacıyla boş SF uygulandı.
- 6. Kafein+Biperiden grubu (n=11):** Bu gruptaki farelerin içme suyuna, hassas terazi ile hesaplanarak 0,3mg/ml olacak şekilde kafein 90 gün boyunca eklendi. Deneyin son 1 ayında haftada 1 gün i.p. yolla 3 mg/kg olacak şekilde biperiden uygulandı.

Doksan günlük uygulama süresinin sonunda hafıza ve bellek fonksiyonlarını değerlendirmek amacıyla farelere Morris Water Maze testi uygulandı. Her grup için 6 günlük deney sürelerinin bitiminden sonra, çalışmada kullanılan test ajanlarının beyin dokuları üzerine etkilerini inceleme amacıyla dokular kimyasal yolla anestezi uygulanan farelerden hızla izole edilerek histopatolojik incelemeye alınmak üzere formaldehite konuldu.

3.2.3. Davranış Testleri

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim dalındaki Nörofizyoloji laboratuvarına götürülen hayvanlara Morris Water Maze davranış testi uygulandı.

150cm çapında 50cm derinliğinde siyah renkte su tankı, içerisinde platformu 1cm aşacak şekilde su ile dolduruldu, her deneyden önce su elektrikli ısıtıcı ile 25+/-1 derece olacak şekilde ısıtıldı, deney esnasında su sıcaklığı ara ara kontrol edildi. Tankın içerisinde farelerin görebileceği yüzeye su seviyesinin üstüne, Güney(S)-Kuzey(N)-Batı(W)-Doğu(E)-Güneydođu(SE)-Güneybatı(SW)-Kuzeydođu(NE)-Kuzeybatı(NW) yönleri belirten beyaz renkte kağıtlar üzerine siyah yazılar yazıldı. Platform SE yönüne yakın bir şekilde, merkez ile periferin ortasına gelecek şekilde yerleştirildi

Kafesler sıra ile tankın olduğu odaya alındı, her fareye günde 4 kere olacak şekilde yüzme testi uygulandı: fareler her seferinde rastgele olacak şekilde bir bölmeden nazikçe suya bırakıldı. Farelere platformu bulması için 60sn süre verildi. Bu süre içerisinde platformu bulabilen fare eğer platformda 10sn beklerse deneyi sonlandırmış kabul edilerek nazikçe alınarak kurutuldu. 60sn sonunda platformu bulamayan fareler 60sn sonunda nazikçe alınarak platforma bırakıldı, 10sn bekletilerek platformdan alındı ve kurutuldu. Bu işlem her fare için günde 4 kere olacak şekilde tekrarlandı. Testin altıncı günü ise platform kaldırıldı, tüm fareler sırayla, yine günde 4 kere olacak şekilde suya nazikçe ve her seferinde platformun karşı köşesi olan kuzeybatı (NW)'dan suya bırakıldı. Farelerin 60sn yüzmesi beklendi ve 60 sn sonunda sudan alınarak kurutuldu. Tüm bu süreçler kamera ile kayıt altına alındı ve EthoVision^(R) ile video görüntülerinin analizi Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı tarafından yapıldı.

Deneyler sırasında günler içerisinde platformu bulma süreleri ve periferde geçirdikleri sürenin azalması öğrenmenin göstergesi olarak değerlendirildi. 6. gün ise, normalde platformun bulunduğu kadranda olan 3'üncü kadranda geçirdikleri toplam sürenin fazlalığı, periferde geçirdikleri sürenin azlığı hafıza ve belleğin göstergesi olarak değerlendirildi.

3.3. Histolojik analizler

3.3.1. Doku Örneklerinin alınması ve Parafin Doku Takibi

Deney süresinin tamamlanmasını takiben, hayvanların genel anestezi altında ötenazisi yapıldı. Kafatası kemikleri sütür boyunca diseksiyon makası yardımı ile açılarak beyinler çıkarıldı ve %10'luk nötral formalin solüsyonunda 48 saat fikse edildi. Fiksasyondan sonra dokular, 1 gece akarsu altında yıkanarak nötral formalin solüsyonunun uzaklaştırılması sağlandı. Dokular, %50'den %100'e artan etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Ksilen ile şeffaflştırma işleminin ardından parafin infiltrasyonu yapıldı ve dokular parafin bloklara gömüldü (Tablo 3.1) (126).

Tablo 3.1. Parafin Takip Protokolü

İşlem	Kullanılan Madde	Süre
Fiksasyon	% 10'luk Nötral Formalin	48 saat
Fiksasyon Solusyonunun Uzaklaştırılması	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	% 50 Etil Alkol	30 dakika
	% 60 Etil Alkol	30 dakika
	% 70 Etil Alkol	30 dakika
	% 80 Etil Alkol	30 dakika
	% 90 Etil Alkol	1 saat
	% 95 Etil Alkol	1 saat
	% 100 Etil Alkol	1 saat
Şeffaflaştırma	Alkol-Ksilen (1:1)	30 dakika
	Ksilen	1 saat
	Ksilen	1 saat
İnfiltrasyon (60°C Etüvde)	Ksilen-Parafin (1:1)	30 dakika
	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Bloklama	Parafin	

3.3.2. Histokimyasal Boyama

3.3.2.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması

Parafin bloklardan mikrotom (RM 2135, Leica) ile 5 µm'lik seri parafin kesitleri alındı. Parafin doku kesitlerinin bir kısmı genel histolojik yapıyı belirlemek amacıyla Hematoksilen ve Eozin yöntemi ile boyandı. Kesitler, deparafinizasyon amacıyla 1 gece 60°C'lik etüvde ve ardından iki değişim ksilenden geçirildi. Ardından azalan etil alkol serilerinden (%95, %80, %70 ve %60) geçirilerek rehidrate edildi ve 5 dakika akarsu altında yıkandı. Yıkama işleminden sonra doku kesitleri 5 dakika Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile, ardından 30 saniye Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Akarsu altında 5 dakika yıkama yapıldıktan sonra dehidratasyon için artan etil alkol serilerinden (%80 ve %95) ve şeffaflaştırma amacıyla iki değişim ksilenden geçirildi. Daha sonra boyanan doku örnekleri entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 3.2). Tüm gruplara ait

örnekler kamera ataçmanlı (SC50, Olympus, Germany) ışık mikroskobu (BX43, Olympus, Japan) altında incelenerek gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi (126).

Tablo 3.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 Etil Alkol	2 dakika
	% 80 Etil Alkol	2 dakika
	% 70 Etil Alkol	2 dakika
	% 60 Etil Alkol	2 dakika
Yıkama	Akarsu	5 dakika
Boyama	Hematoksilen	5 dakika
Yıkama	Akarsu	5 dakika
Diferansiyasyon	Asit-Alkol	1-2 saniye
Yıkama	Akarsu	5 dakika
Boyama	Eozin	20 saniye
Yıkama	Akarsu	5 dakika
Dehidratasyon	% 80 Etil Alkol	1 dakika
	% 95 Etil Alkol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 saat
	Ksilen	1 saat
Kapama	Entellan	

3.3.2.2. Congo Red Boyaması

Parafin bloklardan alınan 5 µm'lik parafin kesitlerinin bir kısmı nöronlarda β-amiloid plaklarını belirlemek amacıyla Congo Red yöntemi ile boyaması yapıldı.

Doku kesitleri, 1 gece 60°C'lik etüvde ve ardından iki değişim ksilen işlemleri ile deparafinize edildi. Daha sonra azalan etil alkol serileri ile rehidratasyon ve 5 dakika akarsu altında yıkamanın ardından Congo Red (234610, Merck, Darmstadt, Germany) ile boyandı. Akar su altında 5 dakika yıkama yapıldıktan sonra alkali alkolde dedifferensiyasyon işlemi uygulandı. Dehidratasyon için artan etil alkol serilerinden ve şeffaflaştırma amacıyla iki

değişim ksilenden geçirildi. Daha sonra doku örnekleri entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 3.3). Tüm gruplara ait örnekler kamera ataçmanlı (SC50, Olympus, Germany) ışık mikroskobu (BX43, Olympus, Japan) altında incelenerek gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi (127,128).

Tablo 3.3. Congo Red Boyama Protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 Etil Alkol	2 dakika
	% 80 Etil Alkol	2 dakika
	% 70 Etil Alkol	2 dakika
	% 60 Etil Alkol	2 dakika
Yıkama	Akarsu	5 dakika
Boyama	Congo Red	15-20 dakika
Yıkama	Distile su	5 dakika
Dedifferensiasyon	Alkali Alkol (%50 alkol + %1 sodyum hidroksit)	5-10 kez batır çıkar
Yıkama	Akarsu	1 dakika
Boyama	Hematoksilen	5 dakika
Yıkama	Akarsu	5 dakika
Dehidratasyon	% 80 Etil Alkol	1 dakika
	% 95 Etil Alkol	1 dakika
	% 95 Etil Alkol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	5 dakika
	Ksilen	5 dakika
Kapama	Entellan	

3.4. İstatistiksel Analizler

Tanımlayıcı istatistikler frekans, yüzde, ortalama ve standart sapma değerleri ile sunulmuştur. Normallik varsayımı Shapiro Wilk Testi ile kontrol edilmiştir. Uygulamaların sayısal verileri arasındaki farkın analizinde veriler normal dağılıma uymadığı için Kruskal

Wallis H testi kullanılmıştır. Anlamlı çıkan farkların analizinde Bonferroni Dunn prosedürü uygulanmıştır.

Her bir uygulama grubuna ait sayısal ölçümlerin zamana bağlı değişimlerini karşılaştırmak amacıyla Friedman S testi kullanılmıştır. Friedman S testi sonrası ikili karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmesi kullanılarak yapılmıştır. Analizler SPSS 23.0 programı ile yapılmıştır. Tüm testlerde istatistiksel olarak $p < 0,05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Deney Süresince Farelerde Gözlenen Özellikler

Doksan gün boyunca kontrol grubunda (n=11) yer alan hayvanlardan bir tanesi, Aüminyum+Kafein alan (n=11) hayvanlardan üç tanesi, kafein+biperiden alan (n=11) hayvanlardan bir tanesi, biperiden alan (n=11) hayvanlardan bir tanesi, sadece kafein alan (n=11) hayvanlardan iki tanesi, sadece alüminyum alan (n=11) hayvanlardan iki tanesi doksan günlük süreçte hayatını kaybetti. Sonuç olarak deneyler 56 fare ile gerçekleştirildi.

Doksan günlük sürede tüm gruptaki hayvanlarda kilo azalması görüldüyse de sadece kafein alan gruptaki ağırlık kaybı diğer gruplara göre anlamlı derecede fazlaydı. Tablo 4.1’de farelerin ilk ve son kiloları arasındaki farkın gruplara göre karşılaştırılması yer almaktadır. Gruplara göre kilo farkları bakımından istatistiksel olarak fark gözlemlendi ($p<0,0001$). Kafein uygulanan grubun kilo kaybı diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı olarak fazladır. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Farelerin ilk ve son kiloları arasındaki farkın gruplara göre karşılaştırılması.

Kilo_farkı (mg)	Tedavi	n	Ort±SS
	Kontrol	10	7.20±3.88
	AlCl ₃	9	5.89±4.11
	Kafein	9	16.33±3.16*
	Biperiden	10	5.50±4.45
	AlCl ₃ +Kafein	8	8.38±4.47
	Kafein+biperiden	10	2.22±2.33

Kruskal Wallis H testi kullanılmıştır.

*:Kontrolle göre istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

4.2. Morris Su Tankı Testi

4.2.1. Eğitim Çalışmaları

Gruplara 5 gün boyunca, her gün her deney hayvanı için 4’er kere olmak üzere yüzme testi uygulandı. Grupların günler içerisinde platformu bulma süresinin kısalması ve periferde geçirdikleri sürenin azalması, öğrenme ve belleğin göstergesi olarak değerlendirildi.

Tablo 4.2’de her bir deney grubunun kendi içinde günlere göre ve her bir eğitim gününde gruplar arasında platformu bulma süresinin karşılaştırılması yer almaktadır. Kontrol grubunda süre bakımından eğitim günleri arasında, 3. günden itibaren istatistiksel

olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0,0001$). Ancak ne alüminyum ne de biperiden uygulanan grupta platformu bulma süreleri bakımından eğitim günleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi. Bununla beraber, kafein grubunda da platformu bulma süreleri bakımından eğitim günleri arasında istatistiksel olarak fark gözlemlenmedi. Alüminyum ve kafeinin birlikte kullanıldığı ya da Biperiden ve kafeinin kombine uygulandığı gruplarda da süre bakımından 5 eğitim günü arasında istatistiksel olarak fark gözlemlenmedi.

Tablo 4.2. Her bir gruptaki farelerin günlere göre ve her bir günde gruplar arasında grupların platformu bulma süresinin karşılaştırılması (sn)

Gruplar	Test Günü 1	Test Günü 2	Test Günü 3	Test Günü 4	Test Günü 5	p ¹
	Ort±SE	Ort±SE	Ort±SE	Ort±SE	Ort±SE	
Kontrol	56,08±1,91	49,60±2,99	40,61±3,18 ⁺	38,54±3,13 ⁺	40,34±3,3 ⁺	<0,0001
AlCl₃	58,13±1,44	56,33±1,7	56,42±1,94 [*]	53,14±2,68 [*]	48,38±3,42	0,075
Biperiden	58,20±1,25	56,49±1,68	58,33±1,22 [*]	55,41±2,1 [*]	56,84±1,45 [*]	0,378
Kafein	56,00±2,18	55,45±1,94	53,18±2,67 [*]	50,42±2,93 [*]	44,61±3,52	0,06
AlCl₃+Kafein	55,56±2,55	50,98±3,01	55,24±2,52 [*]	50,23±2,83 [*]	49,66±3,17	0,17
Bip+Kaf	56,19±1,67	55,20±2,28	55,16±2,15 [*]	55,89±1,98 [*]	57,29±1,63 [*]	0,841
p²	0,780	0,288	<0,0001	<0,0001	<0,0001	

p¹: Her bir gruptaki farelerin günlere göre platformu bulma sürelerinin karşılaştırılması, p²: Her bir test gününde grupların karşılaştırılması. Satır boyunca Friedman S testi kullanılmıştır. Sütun boyunca Kruskal Wallis H testi kullanılmıştır.

*: Sütun içerisinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmektedir ($p<0,05$).

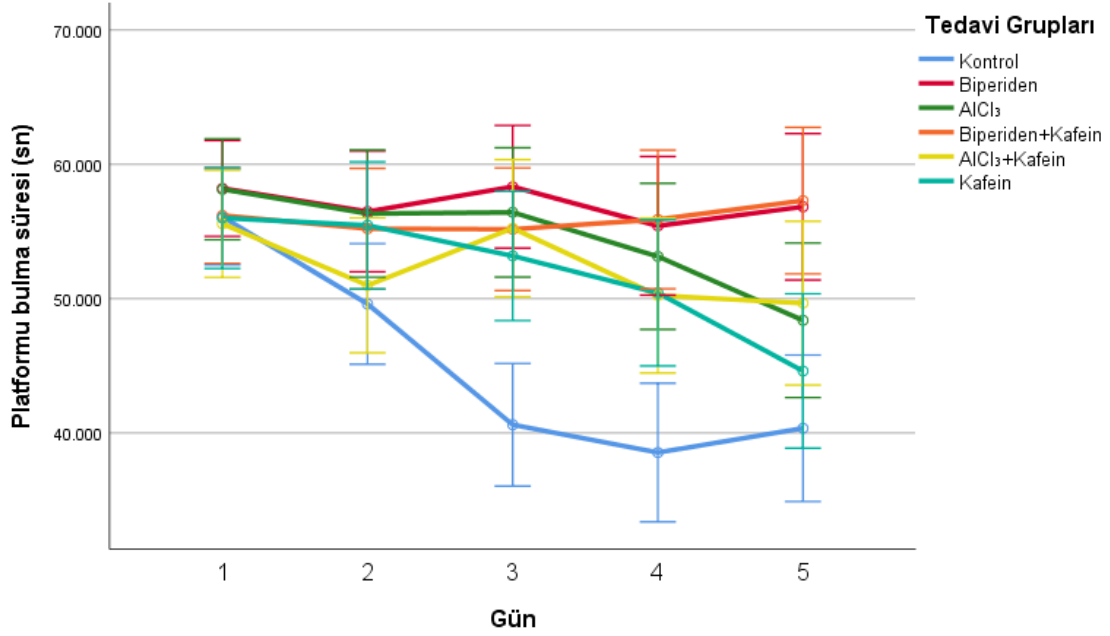
⁺: Satır boyunca mevcut grubun ilk gününden istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

Birinci ve ikinci günlerdeki platformu bulma süreleri gruplar arasında istatistiksel olarak fark göstermedi (Tablo4.2).

Üçüncü ve dördüncü eğitim gününde gruplar arasında platformu bulma süresi bakımından sadece kontrol grubu diğer uygulama gruplarından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulundu ($p<0,0001$). Diğer uygulama grupları arasında istatistiksel olarak fark gözlemlenmedi.

Beşinci eğitim gününde, kafein uygulanan grubun ve kontrol grubunun platformu bulma süreleri, kafein+biperiden ve sadece biperiden uygulanan grupların platformu bulma sürelerinden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azdır ($p<0,0001$). Kafein uygulanan grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmemektedir. Alüminyum ve alüminyum+kafein uygulanan gruplar da diğer gruplardan istatistiksel olarak farklı değildi.

Şekil 4.1’de eğitim gününe göre grupların platformu bulma sürelerinin değişimi görülmektedir.



Şekil 4.1. Günlere göre gruplardaki platformu bulma sürelerinin (sn) değişimi

Tablo 4.3’te her bir deney grubunun kendi içinde günlere göre ve her bir eğitim gününde gruplar arasında periferde geçirilen süre karşılaştırılmıştır. Biperiden, kafein ve kontrol uygulamalarında eğitim günleri arasında perifer zamanı bakımından istatistiksel olarak fark görülmedi. Kafein+biperiden uygulamasında eğitim günleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü. ($p<0.05$). Kontrol uygulamasında birinci, ikinci günler ile üçüncü, dördüncü ve beşinci günler arasında günler arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma görüldü ($p<0,0001$). Alüminyum uygulamasında ise birinci, ikinci ve üçüncü günler ile dördüncü ve beşinci günler arasında periferde geçirilen sürenin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi($p=<0,05$).

Tablo 4.3. Her bir gruptaki farelerin eğitim günlerine göre ve her bir eğitim gününde grupların arasında perifer zamanı karşılaştırılması

	Perifer zaman Gün 1	Perifer zaman Gün 2	Perifer zaman Gün 3	Perifer zaman Gün 4	Perifer zaman Gün 5	p ¹
Treatment	Ort±SE	Ort±SE	Ort±SE	Ort±SE	Ort±SE	
Kontrol	28,40±2,0	24,58±2,34	15,53±2,32 ⁺	14,11±12,12 ⁺	16,63±2,85 ⁺	<0,0001
AlCl₃	27,76±2,36	27,50±2,05	25,08±2,58	18,42±2,28 ⁺	21,01±2,66 ⁺	0,002
Biperiden	42,17±1,97*	43,42±2,4*	46,84±2,28*	42,10±2,77*	44,35±2,89*	0,06
kafein	27,08±2,53	24,29±2,72	26,04±2,73	22,78±2,52	21,78±2,65	0,527
AlCl₃+Kaf	24,42±2,94	22,39±2,98	25,17±2,87	19,72±2,88	24,14±3,06	0,109
Bip+Kaf	34,10±2,24	43,22±2,6* ⁺	43,73±2,38* ⁺	43,05±2,33* ⁺	46,115±2,23* ⁺	0,007
p²	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	

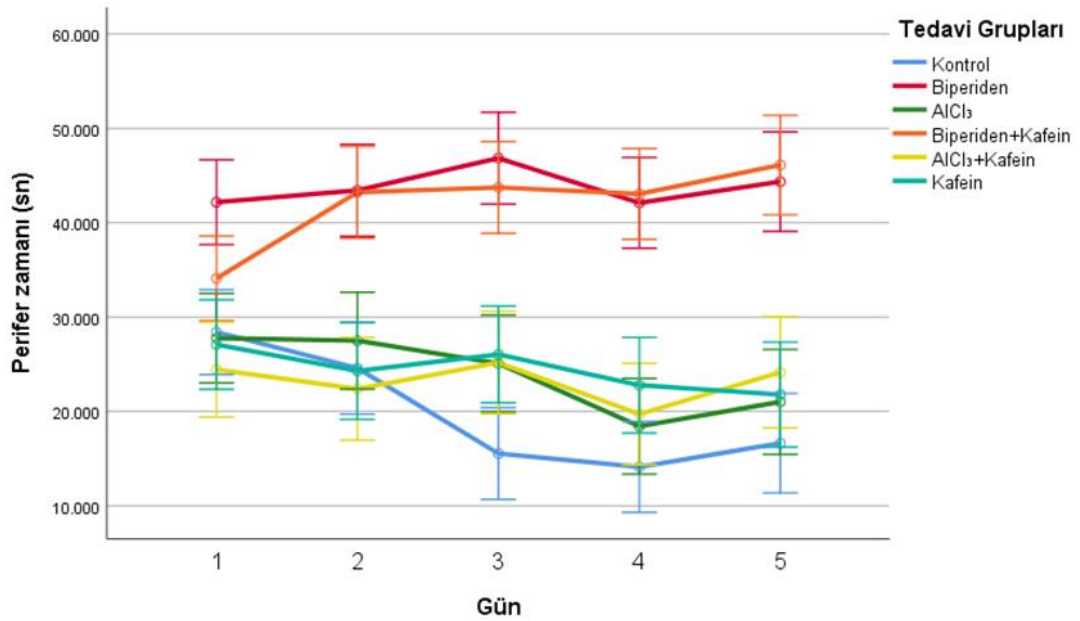
p¹:Her bir gruptaki farelerin günlere göre karşılaştırılması, p²: Her bir eğitim gününde grupların karşılaştırılması. Satır boyunca Friedman S testi kullanılmıştır. Sütun boyunca Kruskal Wallis H testi kullanılmıştır.

*: Sütun boyunca kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir (p<0,05).

+ : Satır boyunca mevcut grubun ilk gününden istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0,05).

Birinci eğitim gününde periferde geçirilen en yüksek süre biperiden uygulamasında görüldü ve tek başına biperiden uygulaması ile gözlenen periferde geçirilen süre diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla bulundu (p<0,0001).

İkinci, üçüncü, dördüncü ve beşinci eğitim gününde periferde geçirilen en yüksek süre biperiden ve biperiden+kafein uygulamalarında görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p<0,0001).



Şekil 4.2. Günlere göre gruplardaki periferde geçirilen zamanların (sn) değişimi

4.2.2. 6. Gün Deneyleri

Tablo 4.4'te 6. günde tüm uygulamalardaki kadran 3'te ve periferde geçirilen süreler karşılaştırılmıştır.

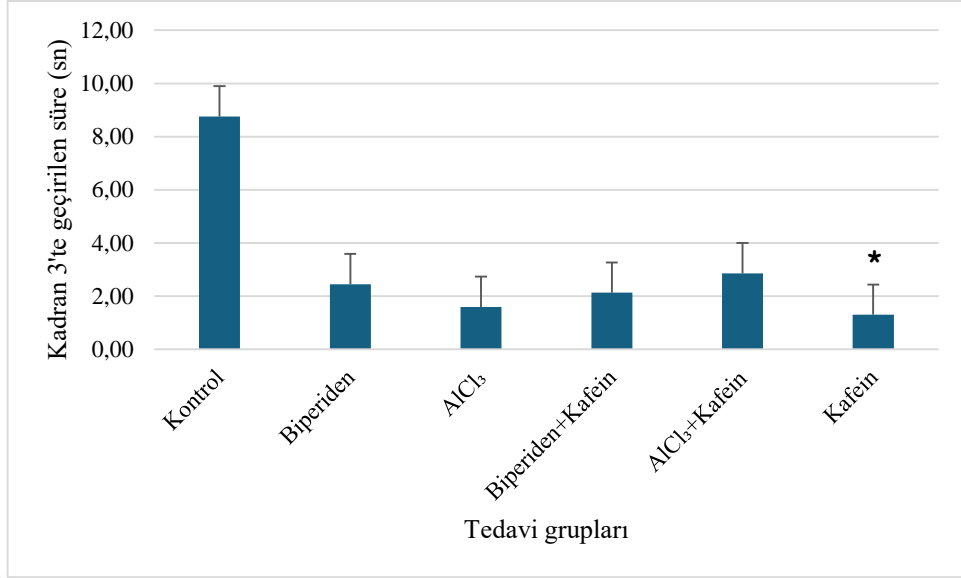
Tablo 4.4. 6. gündeki uygulamalardaki kadran 3'te geçirilen süre (sn) ve perifer zamanlarının (sn) karşılaştırılması

	Ort±SE	p
Kadran 3'te geçirilen süre (sn)		0,035
Kontrol	8,76±3,15	
AlCl₃	1,59±0,76	
Biperiden	2,45±1,35	
Kafein	1,30±0,62*	
AlCl₃+Kaf	2,86±1,09	
Bip+Kaf	2,13±0,67	
Perifer zamanı		0,005
Kontrol	34,77±3,24	
AlCl₃	45,93±2,57*	
Biperiden	51,25±3,92*	
Kafein	46,23±3,10*	
AlCl₃+Kaf	48,99±3,14*	
Bip+Kaf	50,58±1,66*	

Kruskal Wallis H testi kullanılmıştır.

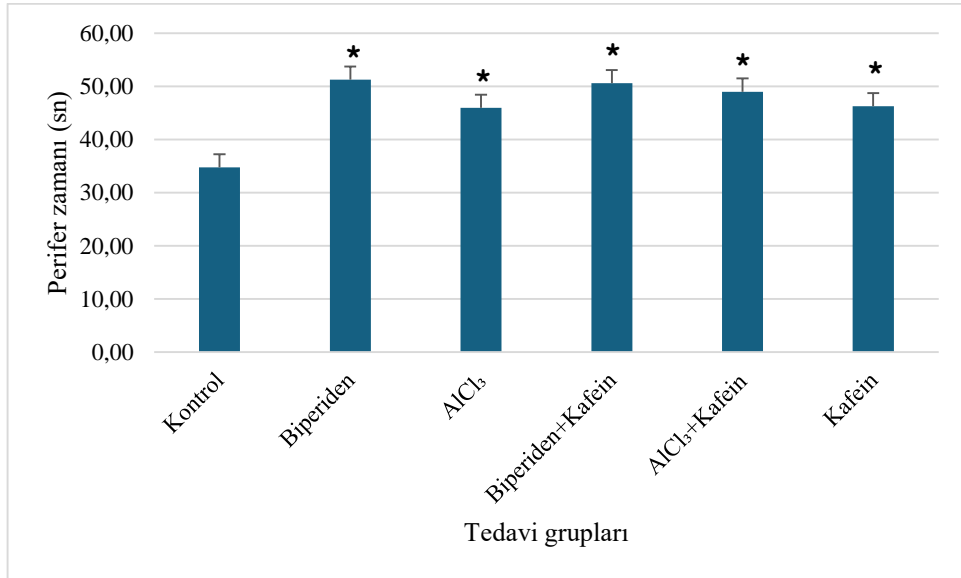
*:Kontrol grubundan istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0,05).

Kadran 3'te geçirilen süre değerlendirildiğinde kontrol grubunun en uzun süre kalan grup olduğu gözlemlendi. Gruplar arası değerlendirilme yapıldığında, kafein uygulanan grubun kadran 3'te geçirdiği sürenin kontrol grubuna göre istatistiksel yönden anlamlı olarak düşük olduğu görüldü (p<0,05) (Şekil4.3)



Şekil 4.3. 6. günde uygulamalardaki kadran 3'te geçirilen sürenin (sn) karşılaştırılması.
* kontrol grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

6. Günde periferde geçirilen en yüksek süreler, biperiden ve kafein+biperiden uygulamalarına aittir. Ancak istatistiksel olarak sadece kontrol grubu diğer tüm uygulamalardan anlamlı olarak farklıdır ve en düşük perifer zamanına sahiptir. ($p < 0,05$). Şekil 4.4'te 6.gündeki perifer zamanlarının karşılaştırması görülmektedir.



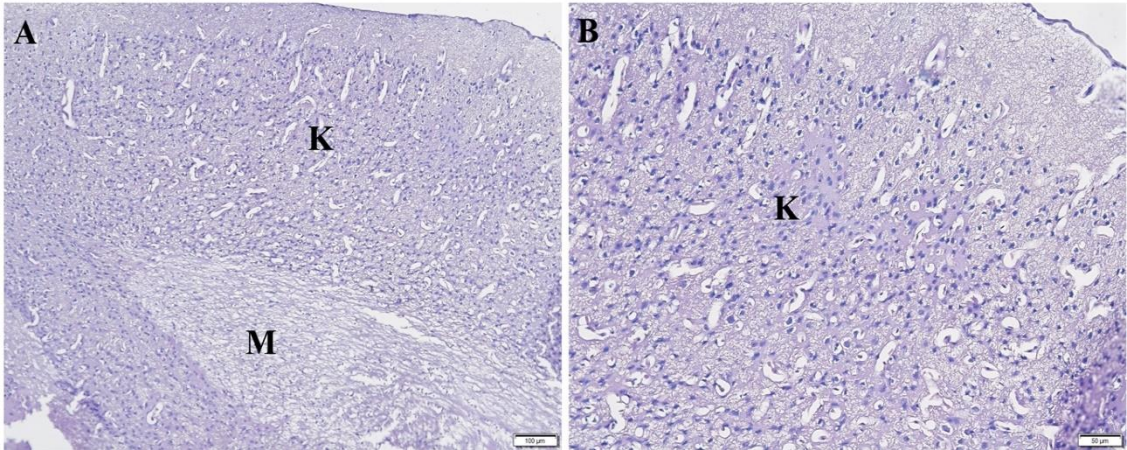
Şekil 4.4. 6. günde uygulamalardaki perifer zamanlarının (sn) karşılaştırılması.
* kontrol grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

4.3. Histopatolojik Bulgular

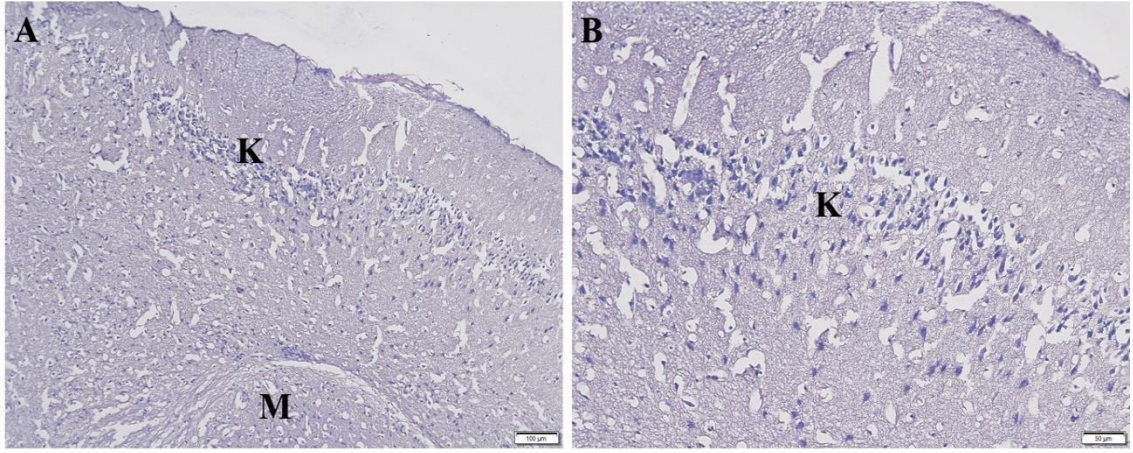
4.3.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Bulguları

4.3.1.1. Serebral Korteks Histopatolojisi

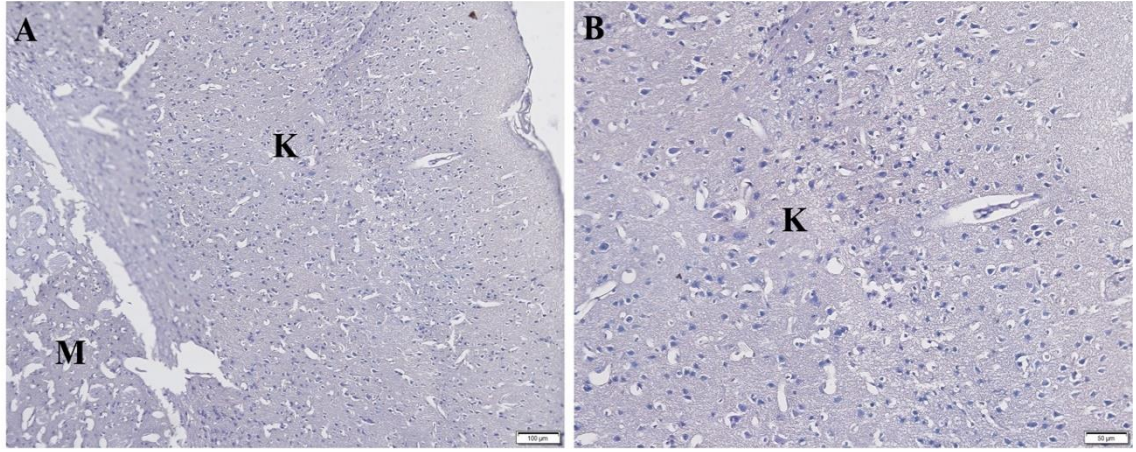
Tüm gruplara ait serebral korteks bölgeleri hematoksilen ve eozin boyaması yapılarak incelendi. Kontrol farelerin serebral korteks bölgelerinin histolojik yapısının normal olduğu saptandı. Pia mater'den medullaya kadar stratum granularis eksterna, stratum pyramidalis eksterna, stratum granularis interna, stratum pyramidalis interna ve stratum multiformis olmak üzere altı tabakanın varlığını koruduğu izlendi. Özellikle piramidal nöronların hücre sınırlarının düzgün olduğu, hücre çekirdeğinin yuvarlak ve merkezde yerleşim gösterdikleri görüldü. Kafein ve kafein + biperiden gruplarında da beyin histolojik yapısı, kontrol grubunda olduğu gibi normal idi (Resim 4.1, 4.2 ve 4.3).



Resim 4.1. Kontrol grubu farelerin beyin dokusuna ait histolojik görüntüleri, Hematoksilen ve Eozin boyama. K: Korteks, M: Medulla. Büyütmeler: 100 μ m (A), 50 μ m (B).

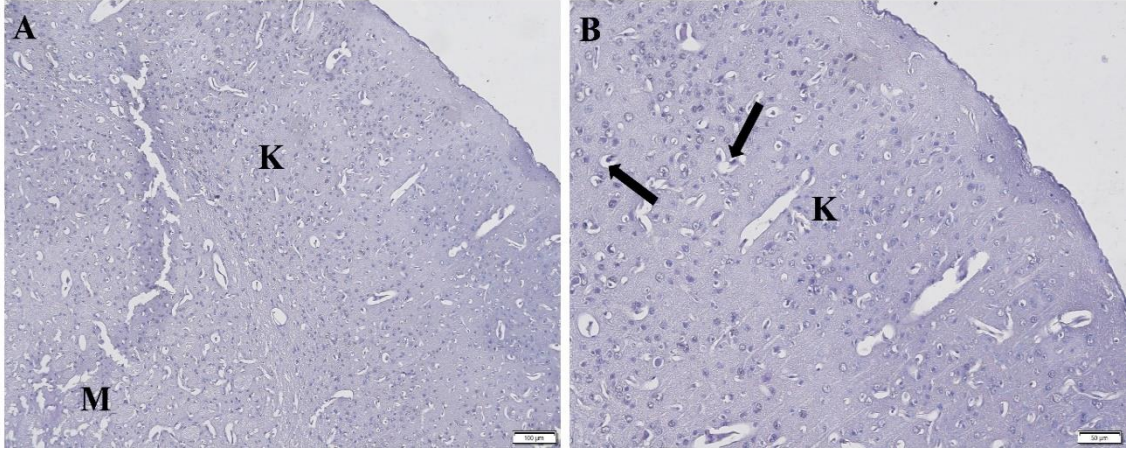


Resim 4.2. Kafein grubu farelerin beyin dokusuna ait histolojik görüntüleri, Hematoksilen ve Eozin boyama. K: Korteks, M: Medulla. Büyütmeler: 100 μ m (A), 50 μ m (B).

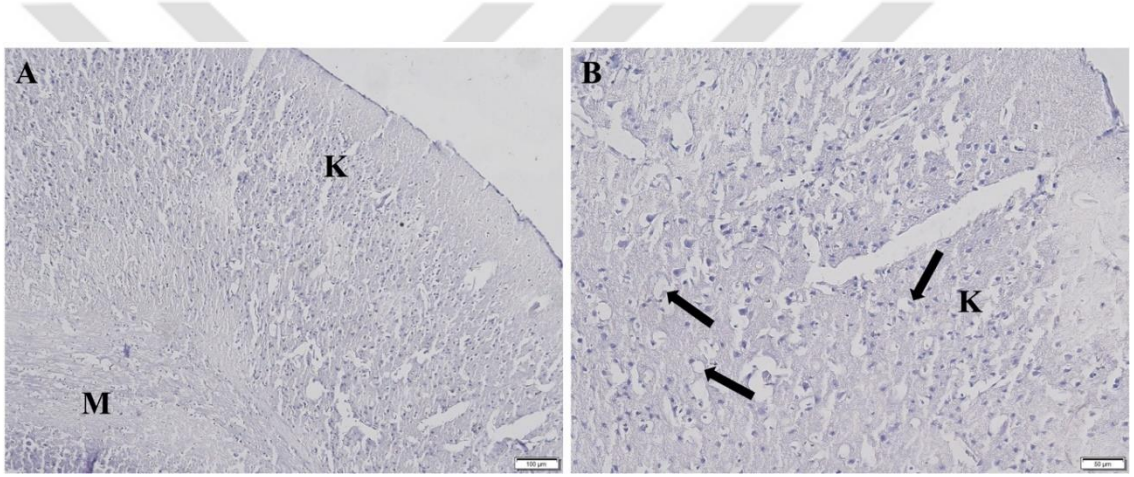


Resim 4.3. Kafein+Biperiden grubu farelerin beyin dokusuna ait histolojik görüntüleri, Hematoksilen ve Eozin boyama. K: Korteks, M: Medulla. Büyütmeler: 100 μ m (A), 50 μ m (B).

Biperiden ve $AlCl_3$ grupları kontrol grupları ile karşılaştırıldığında serebral korteksin altı tabakadan oluştuğu, ancak hücresel hasarların varlığı saptandı. Piknotik çekirdeğe sahip hücre sayısında artış ve serebral vakuollerin oluştuğu görüldü (Resim 4.4 ve 4.5).

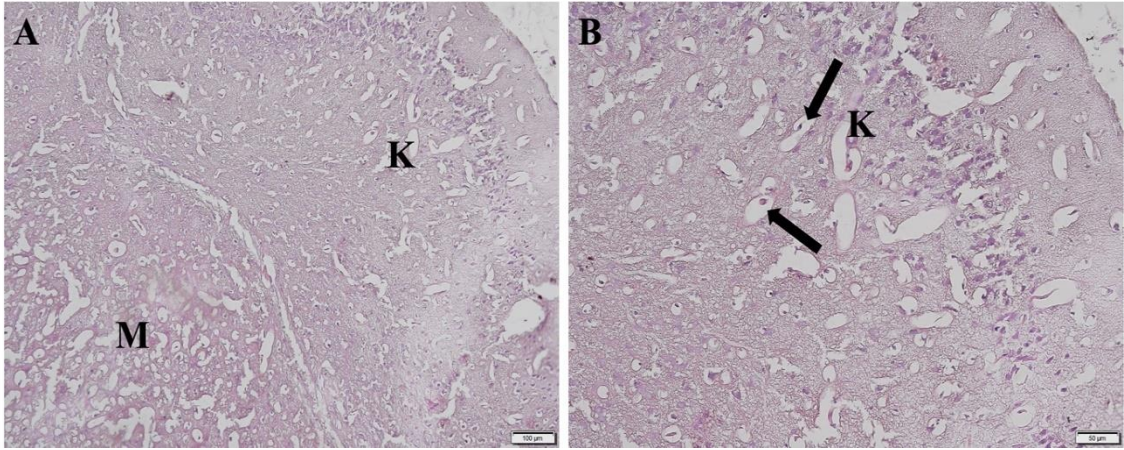


Resim 4.4. Biperiden grubu farelerin beyin dokusuna ait histolojik görüntüleri, Hematoksilen ve Eozin boyama. K: Korteks, M: Medulla, Oklar: Serebral vakuoller. Büyütmeler: 100 µm (A), 50 µm (B).



Resim 4.5. AlCl₃ grubu farelerin beyin dokusuna ait histolojik görüntüleri, Hematoksilen ve Eozin boyama. K: korteks, M: Medulla, Oklar: Serebral vakuoller. Büyütmeler: 100 µm (A), 50 µm (B).

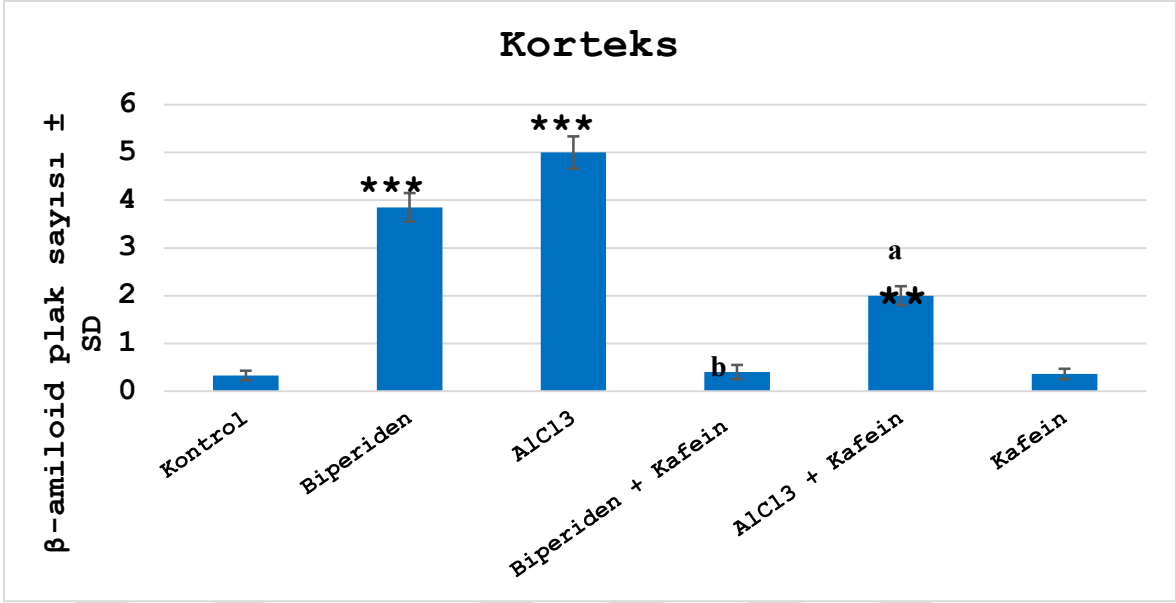
AlCl₃ modeli oluşturulan farelere eş zamanlı kafein verilmesiyle serebral hasarın belirgin şekilde azaldığı görüldü. Bu farelerde serebral hasarın onarıldığı, nöron sayısının artarken serebral vakuollerin azaldığı ve korteksi oluşturan altı adet katmanın kontrol grubuna benzer düzenlenim gösterdiği saptandı (Resim 4.6).



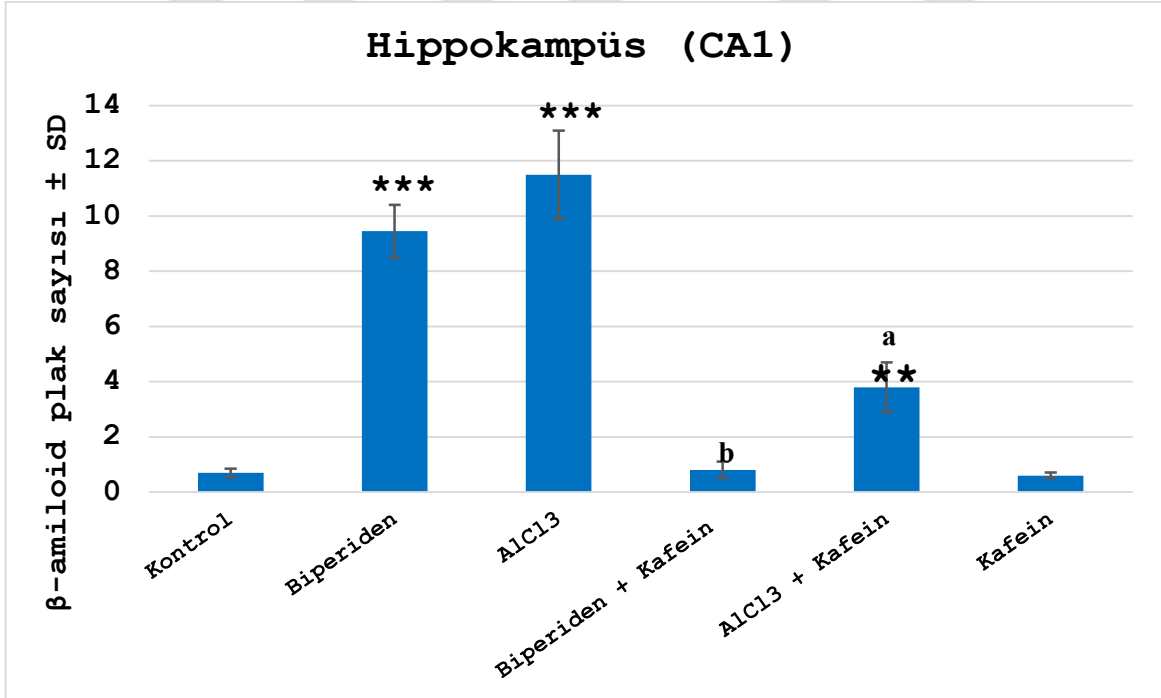
Resim 4.6. $AlCl_3$ + Kafein grubu farelerin beyin dokusuna ait histolojik görüntüleri, Hematoksilen ve Eozin boyama. K: korteks, M: Medulla, Oklar: Serebral vakuoller. Büyütmeler: 100 μm (A), 50 μm (B).

4.3.1.2. Congo Red Boyama Bulguları

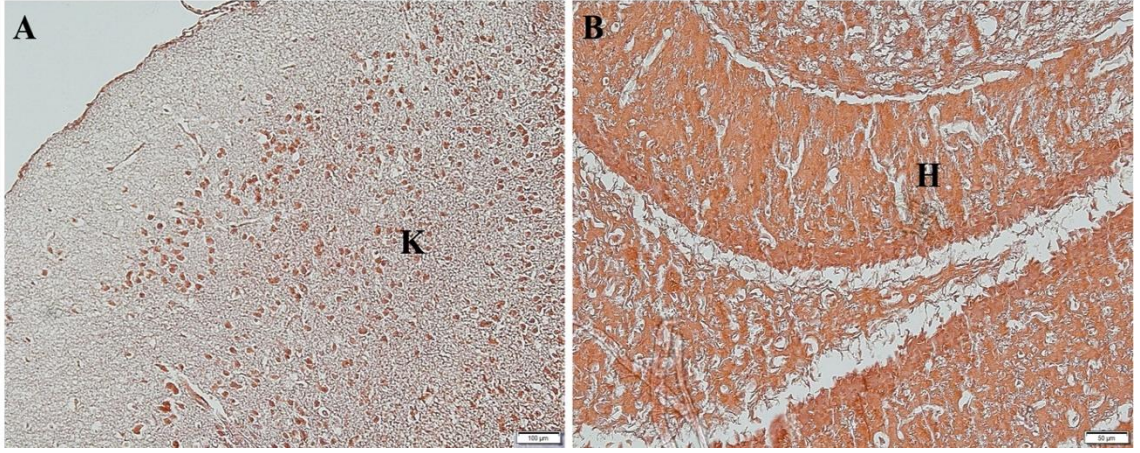
Deney sonrasında alınan beyin dokuları Congo Red ile boyanarak korteks ve hipokampusün CA1 bölgesinde β -amiloid plaklarının varlığı değerlendirilerek gruplar arasında karşılaştırma yapıldı (Grafik 4.1 ve 4.2). Kontrol ve kafein grupları incelendiğinde, korteks ve CA1 bölgesindeki nöronların büyük ökromatik çekirdeğe sahip oldukları ve hücre sınırlarının düzgün olduğu tespit edildi (Resim 4.7 ve 4.8). Kafein + biperiden grubunda da kontrol grubuna benzer bulgular elde edilmiş olup doku hasarının giderildiği saptandı (Resim 4.9). $AlCl_3$ ve biperiden gruplarına ait CA1 bölgesinde ise, normal görünümlü nöron sayısının azalarak yerini piknotik çekirdekli ve bazofilik boyanmış çekirdeğe sahip nöronların aldığı saptandı. Bazofilik çekirdekli nöronlarda belirgin nörofibriler yumakların dolayısıyla β -amiloid plaklarının oluştuğu izlendi (Grafik 4.8). (Resim 4.10 ve 4.11). $AlCl_3$ grubunda korteks bölgesinde de β -amiloid plaklarının varlığı saptandı (Grafik 4.7). $AlCl_3$ ile birlikte kafein verilen farelerde hem kortekste hem de hipokampusün CA1 bölgesinde β -amiloid plak sayısında azalma meydana geldiği saptandı (Resim 4.12).



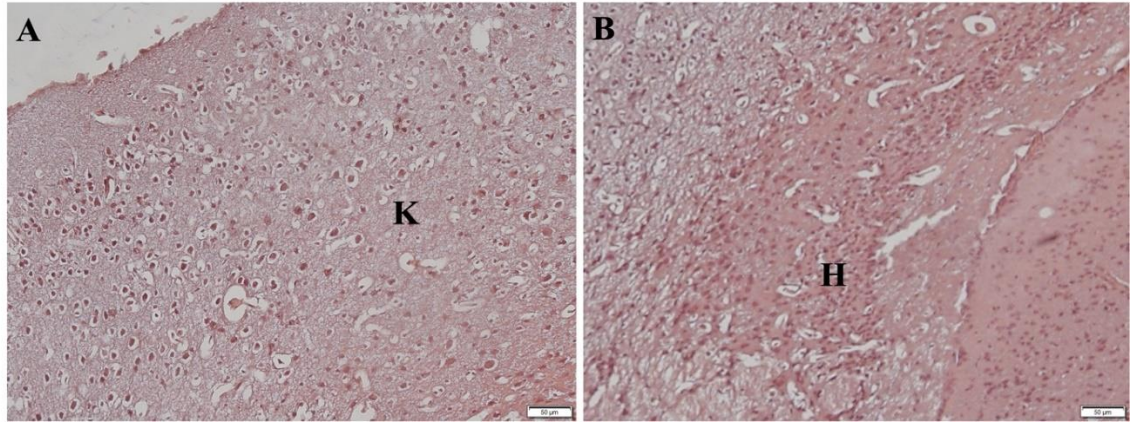
Grafik 4.1. Tüm gruplarda beynin korteks bölgesindeki β-amiloid plak sayılarının karşılaştırılması
 ,*: kontrole göre anlamlı farklılığı göstermektedir. (**p<0.01; ***p<0.001).
 a: AlCl₃ grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir. b: biperiden grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir.



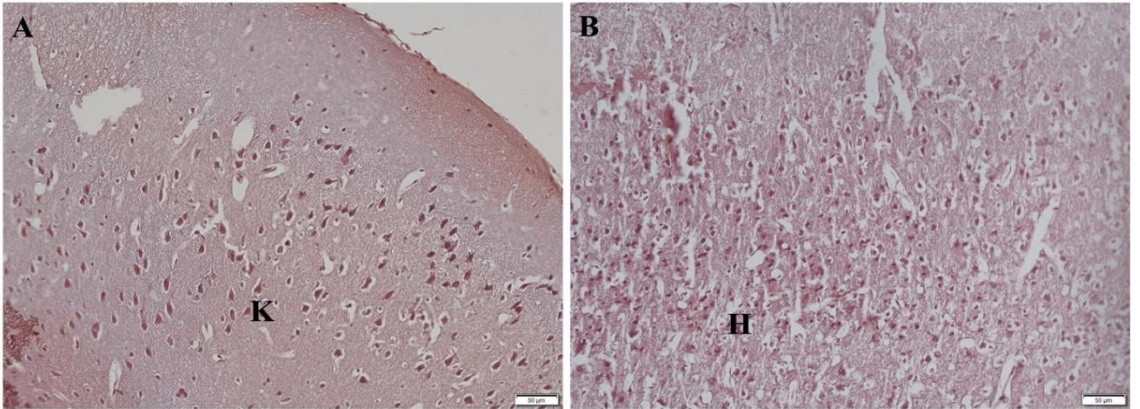
Grafik 4.2. Tüm gruplarda beynin hipokampus CA1 bölgesindeki β-amiloid plak sayılarının karşılaştırılması
 ,*: kontrole göre anlamlı farklılığı göstermektedir. (**p<0.01; ***p<0.001).
 a: AlCl₃ grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir. b: biperiden grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir.



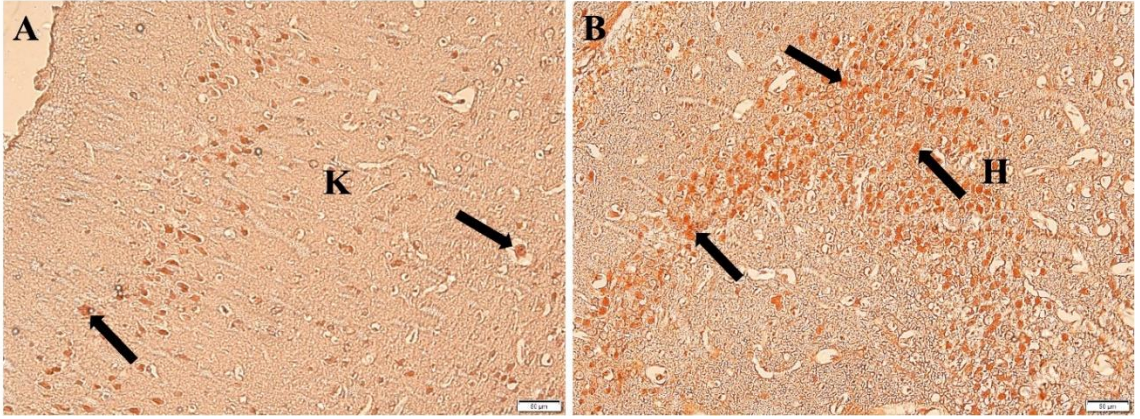
Resim 4.7. Kontrol grubu farelerin beyin dokusunda korteks ve hipokampüsün CA1 bölgesine ait histolojik görüntüleri, Congo Red boyama. K: Korteks, H: Hipokampüs. Büyütmeler: 100 µm (A), 50 µm (B).



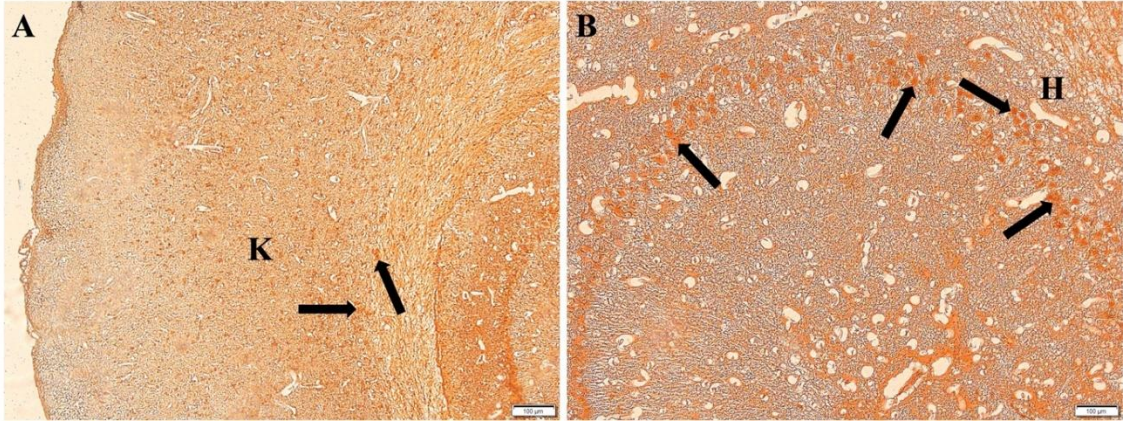
Resim 4.8. Kafein grubu farelerin beyin dokusunda korteks ve hipokampüsün CA1 bölgesine ait histolojik görüntüleri, Congo Red boyama. K: Korteks, H: Hipokampüs. Büyütmeler: 50 µm (A), 50 µm (B).



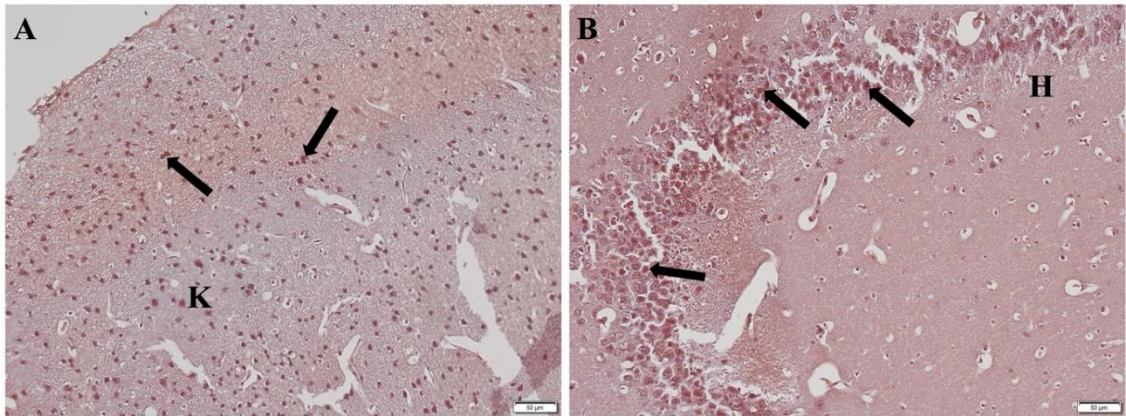
Resim 4.9. Kafein+Biperiden grubu farelerin beyin dokusunda korteks ve hipokampüsün CA1 bölgesine ait histolojik görüntüleri, Congo Red boyama. K: Korteks, H: Hipokampüs. Büyütmeler: 50 µm (A), 50 µm (B).



Resim 4.10. Biperiden grubu farelerin beyin dokusunda korteks ve hipokampüsün CA1 bölgesine ait histolojik görüntüleri, Congo Red boyama. K: Korteks, H: Hipokampüs, Oklar: Amiloid plaklar. Büyütmeler: 50 µm (A), 50 µm (B).



Resim 4.11. AlCl₃ grubu farelerin beyin dokusunda korteks ve hipokampüsün CA1 bölgesine ait histolojik görüntüleri, Congo Red boyama. K: Korteks, H: Hipokampüs, Oklar: Amiloid plaklar. Büyütmeler: 100 µm (A), 100 µm (B).



Resim 4.12. AlCl₃ + Kafein grubu farelerin beyin dokusunda korteks ve hipokampüsün CA1 bölgesine ait histolojik görüntüleri, Congo Red boyama. K: Korteks, H: Hipokampüs, Oklar: Amiloid plaklar. Büyütmeler: 50 µm (A), 50 µm (B).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, bir selektif kolinerjik M1 reseptör antagonisti biperidenle veya bir trivalen katyon alüminyum ile Alzheimer modeli oluşturulan farelerde, bir adenzinerjik sistem antagonisti olan kafeinin etkisi ilk kez araştırıldı. Çalışmamız ayrıca, biperiden ile muamele edilen farelerin hipokampal kesitlerinde β -amiloid birikimini gösteren bulguları içeren ilk çalışmadır. Bulgularımız biperidenin, alüminyuma benzer şekilde, öğrenme hafıza ve bellek fonksiyonlarını bozarken aynı zamanda β -amiloid birikimine neden olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte, kafeinin ise kullandığımız dozlarda biperiden ile veya alüminyum ile bozulan bilişsel fonksiyonlar üzerinde herhangi bir iyileştirici etkiye neden olmaksızın, alüminyuma bağlı β -amiloid birikimini kısmen azalttığını, biperidene bağlı β -amiloid birikimini ise neredeyse tamamen önlediğini göstermektedir.

Çalışmamızda farelerde Morris Water Maze testi kullanılarak hafıza, mekânsal algı ve öğrenme araştırıldı. Morris Water Maze testi, hipokampal öğrenmeyi ve hafıza ve bellek performansını ölçmek için sıkça kullanılmakta olan bir testtir (122,123). Mekânsal hipokampal öğrenme, hafıza ve bellek yetenekleri sağlam olan deney hayvanları, günler içerisinde platformu daha hızlı bulabilmektedir. Ayrıca, platformun yeri su tankının daha merkezi bir noktasında olduğu için, bir platformun varlığını hatırlayan deney hayvanları merkezde daha çok vakit geçirirken, hafızası gerilemiş hayvanlar tanktan çıkabilmek için periferde daha çok vakit geçirmektedirler. Günler içerisinde platformun yerini öğrenmiş olan hayvanlar son gün, platformu olmayan tankta yüzdürülmektedir. Mekânsal/hipokampal öğrenme yetenekleri yerinde olan hayvanlar, platformun bulunduğu yerde daha çok vakit geçirerek platformu araması beklenmektedir. Uyguladığımız protokolda hayvanlar, ilk 5 gündeki deneylerde 4'er kez platforma her seferinde farklı bir noktadan bırakıldılar. Son gün ise, platformun normalde olması gerektiği yerin tam karşısından bırakıldılar.

Alzheimer Hastalığının fizyopatolojisinde β -amiloid plak ve tau proteini birikimi ile birlikte nöronal hasar ve sonucunda nörofibriler üçgenler oluşması vardır (1,15–17,23,27,30,32–36,44). Hastalığın genetik temelleri ortaya konmuş olmakla birlikte genetik faktörlerin %60-%80 arasında hastalığın oluşumunda rol oynadığı görülmektedir (1,17,47). Alüminyum gibi dış etken maruziyetlerinin de genetikten bağımsız olarak Alzheimer Hastalığı'na neden olabileceğine dair kanıtlar mevcuttur (13,54,56,57,60,62,64,65,66,67).

Deney hayvanlarında çeşitli Alzheimer modelleri oluşturulabilmektedir. Deneysel Alzheimer modeli oluşturulurken genelde transgenik fareler kullanılmakla birlikte (66,90) alüminyumun farelerde Alzheimer benzeri sonuç doğurduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Ayrıca non-selektif bir muskarinik reseptör blokörü olan skopolamin ile yapılmış çok sayıda Alzheimer modeli çalışması mevcuttur (117,118,125,126). Beyindeki öğrenme yollarında M1 reseptörlerinin önemi bilinmektedir (8,9). M1 reseptörlerinin öğrenme ve bellekte oynadığı rolden dolayı çalışmamızda, selektif bir M1 reseptör blokörü olan biperiden kullanılmış, bu maddenin davranış üzerindeki etkisinin yanında aynı zamanda histopatolojik olarak Alzheimer benzeri bir sonuç ortaya çıkarıp çıkarmayacağı incelenmiştir.

Çalışmamızda farelere oral yoldan, çeşme suyu içerisinde çözülmüş $AlCl_3+6H_2O$ çözeltisi uygulandı ve hayvanlarda hem öğrenme fonksiyonlarının bozulduğu ve hem de β -amiloid birikiminin olduğu tespit edildi. Bu sonuçla alüminyumun Alzheimer hastalığı fizyopatolojisindeki rolü ve β -amiloid birikimine yol açtığı, bizim çalışmamız tarafından da doğrulanmıştır.

Kolinergik sistemin santral sinir sisteminde yer alan M1 reseptörlerinin, hafıza ve bellekle ilgili fonksiyonlardaki önemi bilinmektedir (8,118,125,129). Çalışmamızda, M1 reseptörlerini selektif olarak bloke eden biperiden, farelerde tek başına mekânsal öğrenme ve hafıza parametrelerini bozdu. Klinkenberg ve arkadaşları tarafından 2010'da yapılan bir çalışmada, (125) skopolamin ve biperiden'in kısa-sürelili hafıza, yemek motivasyonu dikkat üzerindeki etkisi araştırılmış, skopolaminin hem yemek motivasyonu ve dikkati, hem de kısa süreli hafızayı bozduğu, biperidenin ise yemek motivasyonu ve dikkati bozmadan, kısa-süreli hafızayı bozmakta etkili olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde Blokland ve arkadaşları tarafından 2016'da yazılan bir görüş yazısında da (118) biperiden'in hafızayı bozmakta yeterli oluşuna dair görüş belirtilmekle birlikte daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu ifade edilmiştir. Öte yandan Szcody ve arkadaşlarının 2014'te (130) öğrenme fonksiyonu üzerine biperidenin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise biperidenin öğrenme üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı ve dolayısıyla skopolamine bir alternatif teşkil etmeyeceği ifade edilmiştir.

Bizim bulgularımız Klinkenberg ve arkadaşlarının ve Blokland ve arkadaşlarının bulgularını desteklemekte, Szcody ve arkadaşlarının bulguları ile çatışmaktadır. Bunun nedenleri, Szcody ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sıçanlar üzerinde yapılan davranış modeli çalışması olması olabilir. Ayrıca bizim çalışmamızdan bir farkı da kullanılan

biperidenin davranış testinden sadece 90dk önce intraperitoneal yoldan verilmiş olması olabilir, bizim çalışmamızda biperiden, öğrenme ve bellek fonksiyonu ölçen testlerden 1 ay önce başlanarak haftalık doz olarak verilmiştir. Bizim çalışmamızda kullandığımız doz 3mg/kg olup yukarıda refere edilen çalışma da aynı şekilde 3mg/kg biperiden uygulaması yapılmıştır ancak sıçan ve fare arasındaki ağırlık farkı düşünüldüğünde kullanılan dozun eşit olmadığı söylenebilir.

Alzheimer Hastalığının fizyopatolojisinde β -amiloid birikiminin olduğu bilinmektedir. (1,15–17,23,27,30,32–36,44) Daha önce biperiden ile yapılan çalışmalarda β -amiloid oluşumunun araştırılmadığı gözlemlenmekle birlikte bizim çalışmamızda biperiden ve β -amiloid birikimi arasındaki ilişki özellikle değerlendirilmiştir. Bunun nedeni olarak, skopolamin'in daha önceki çalışmalarda beyinde β -amiloid birikimine yol açtığı bilinmesi, skopolaminin non-selektif muskarinik reseptör blokajı yapması ve beyinde öğrenme ve bellek fonksiyonu üzerinde önemli rolü olduğu bilinen M1 reseptörünün β -amiloid birikiminde ana rolü oynayabileceğinin düşünülmesidir. Yapılan çalışmamızda biperiden hem öğrenmeyi bozup, hem de β -amiloid birikimine neden olmuştur. Bu bizim çalışmamızın orijinal bulgularındandır. Önceden yapılan bir çalışmada, non-selektif muskarinik reseptör antagonisti olan skopolamin uygulanması sonucu farelerde kolinerjik reseptör blokajının hem hafıza ve bellek fonksiyonlarını bozduğu ve hem de β -amiloid birikimine neden olduğu gösterilmiştir (117). Bizim çalışmamızda biperiden uygulanmış farelerde histopatolojik incelemelerde β -amiloid birikiminin olduğu gözlemlendi. Bu bulgu, santral kolinerjik muskarinik reseptörlerin inhibisyonunun β -amiloid birikimine neden olarak Alzheimer patogenezinde rolünün olabileceğini ve bunda esas olarak kolinerjik muskarinik reseptörlerinin M1 alt tipinin sorumlu olabileceğini telkin etmektedir.

M1 reseptörlerinin biperiden ile blokajı sonucu beyin kesitlerinde yapılan histopatolojik incelemede β -amiloid birikimi ilk kez çalışmamızda gösterilmiştir. Bu bulgu, M1 reseptörlerinin β -amiloid drenajına neden olabileceğini telkin etmektedir. Nitekim daha önce yapılmış olan bir çalışmada, bir selektif M1 reseptör agonisti olan ksanomelin'in, amiloid prekürsor proteininden beta amiloidlerin oluşumunu azaltıp çözünebilir APP (sAPP) oluşumunu artırdığı gösterilmiştir. (9) Bu sonuç dolaylı olarak, bizim bulgularımızı desteklemektedir.

Kafein adenzinerjik sistemde A1 ve A2a reseptörlerinin nonselektif antagonistidir. (98,104) Purinerjik sinyal yolları; β -amiloid birikimi, tau proteini fosforilasyonu, oksidatif

stres, metal iyonu düzensizliği veya kronik nöroinflamasyon gibi mekanizmalarda rol oynar. Bu nedenle, nükleotid reseptörleri (P2X ve P2Y) ve adenosin reseptörleri (A1, A2a, A2b, A3) santral sinir sistemindeki hastalıklarda önemli bir araştırma alanıdır.(11,96–98,100,104,106,107,124)

Ektopurinler ve ektopirimidinler, santral sinir sisteminin hücrelerarası ortamında bulunur ve sinyal molekülleri olarak görev yaparlar. Bu bileşikler nörotransmisyon, inflamatuvar süreçlerin indüklenmesine ve ağrı sinyallerinin iletimi de dahil olmak üzere sinyallerin modülasyonuna katılır. Ayrıca nükleotidler ve nükleozidler kan basıncının düzenlenmesine, kan trombosit agregasyonu ile hemostazda ve immünolojik süreçlere katılırlar.

Bir iyonotropik glutamat reseptörü olan N-metil D-aspartat reseptörü (NMDAR), nöronlarda ve glial hücrelerde eksprese edilen bir reseptör olup Alzheimer hastalığında hedef yapılardan biridir. Alzheimer Hastalığı tedavisinde kullanılan ajanlardan birisi olan memantin bir negatif NMDAR allosterik modülatörüdür. Yapılan çalışmalarda, A2a reseptörleri ile NMDAR'lerin çapraz antagonizmada olduğu ve A2a blokajının, negatif NMDAR modülasyonu yoluyla Alzheimer hastalığından korumada etkili olabileceğini göstermiştir. Çalışmalar A2a reseptör blokörlerinin Parkinson Hastalığında kullanıldığı gibi Alzheimer'da da kullanılabileceğini ortaya koymuştur. (131)

Bu bilgiler doğrultusunda, bir adenosinerjik sistem antagonisti olan kafein, biperiden ve alüminyuma bağlı gelişen etkileri tersine çevirebilir. Bunu anlamak amacıyla, mevcut çalışmada kafein, biperiden ve/veya alüminyumla birlikte uygulandı. Histopatolojik sonuçlar kafeinin, biperidenle ortaya çıkan β -amiloid birikimini neredeyse tamamen, alüminyum tarafından ortaya çıkan β -amiloid birikimini ise kısmen önlediğini gösterdi. Kafein gibi metil ksantinlerin 2 ve 3 değerli katyonlarla etkileşmeye girerek bu maddelerin gastrointestinal kanaldan absorpsiyonunu önlediği bilinmektedir, alüminyuma bağlı β -amiloid birikiminin engellenmesine bu yolla ayrıca katkı sağlanabilir (132). Bu perspektiften bakıldığında, alüminyuma bağlı β -amiloid birikiminin kafein ile daha yüksek oranda geriye çevrilmesi beklenirdi oysa kafein, biperidenin etkisini tamamen önlerken alüminyumun etkisini önlemekte sınırlı kaldı. Bu sonuç, alüminyuma bağlı β -amiloid birikiminin sadece M1 reseptörlerin blokajını değil, fakat aynı zamanda başka faktörleri de içerebileceğini telkin etmektedir. Ayrıca, selektif bir M1 reseptör antagonisti olan biperidenin etkisinin tamamen önlenmesi, kafeinin Alzheimer hastalığına karşı koruyucu etkisinin çoğunlukla M1

reseptörler üzerinden olduğu sonucunu da doğrular. Ancak bu sonuçların hem skopolamin ve hem de biperiden varlığında selektif M1 agonistleri kullanılarak doğrulanması gerekir.

Mevcut çalışmada biperiden ve/veya alüminyum uygulanan deney hayvanlarında kafeinin hafıza ve öğrenme fonksiyonlarına yönelik anlamlı bir iyileştirici etkisi görülmedi. Bu sonuçlar, Alzheimer hastalığının patogeneğinde β -amiloid birikiminden başka etkenlerin de içerilebileceğini telkin etmektedir. Çalışmamızda, daha önce Arendash ve arkadaşlarının (124) transgenik farelere oral kafein uygulaması ile kafeinin öğrenme ve belleği geliştirip β -amiloid plakları azalttığını bildiren çalışmasında kullanılan doz uygulanmıştır. Çalışmamızdaki bulgular, Arendash ve arkadaşlarının çalışmasının davranışsal sonuçları ile uyumsuzluk göstermekle birlikte histopatolojik β -amiloid bulguları ile örtüşmektedir. Bulgularımız dahilinde farklı bir açıklama da şu şekilde olabilir: farklı olarak transgenik fare yerine oral Alzheimer modeli oluşturan alüminyum/biperiden kullanılmış olması ve kafein kullanılan farelerde anksiyete oluşması bu sonuca sebebiyet vermiş olabilir. Bir başka açıklama: deneylerde kullanılan konsantrasyonda kafein anksiyete yaratmış olabilir. Bunun anlaşılabilmesi için yapılacak olan ileriye dönük çalışmalarda kafeinin doz bağımlı etkilerine bakılabilir. Nitekim hayvanların izlenmesinde kafein alan grupların yemek yeme ve kilo kaybında anlamlı farklılık olduğu gözlenmiştir. Öğrenme ve belleğin engellenmiş olması kafeinin bu etkisi ile paralellik göstermiş olabilir.

Sonuç olarak mevcut çalışmadan elde ettiğimiz tüm bu bulgular biperidenin, alüminyum gibi, öğrenme hafıza ve bellek fonksiyonlarını bozarken aynı zamanda β -amiloid birikimine neden olduğunu göstermektedir. Bunun yanında kafeinin ne biperiden ne de alüminyum ile bozulan bilişsel fonksiyonlar üzerinde herhangi bir iyileştirici etkiye neden olmaksızın, alüminyuma bağlı β -amiloid birikimini kısmen azalttığını, biperidene bağlı β -amiloid birikimini ise neredeyse tamamen önlediğini göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bulgularımız biperidenin, alüminyuma benzer şekilde, öğrenme hafıza ve bellek fonksiyonlarını bozarken aynı zamanda β -amiloid birikimine neden olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte, kafeinin ise kullandığımız dozlarda biperiden ile veya alüminyum ile bozulan bilişsel fonksiyonlar üzerinde herhangi bir iyileştirici etkiye neden olmaksızın, alüminyuma bağlı β -amiloid birikimini kısmen azalttığını, biperidene bağlı β -amiloid birikimini ise neredeyse tamamen önlediğini göstermektedir.

Alüminyumun Alzheimer hastalığı fizyopatolojisindeki rolü ve β -amiloid birikimine yol açtığı, bizim çalışmamız tarafından da doğrulanmıştır. Yapılan çalışmamızda biperiden hem öğrenmeyi bozup, hem de β -amiloid birikimine neden olmuştur. Histopatolojik sonuçlar kafeinin, biperidenle ortaya çıkan β -amiloid birikimini neredeyse tamamen, alüminyum tarafından ortaya çıkan β -amiloid birikimini ise kısmen önlediğini gösterdi. Bu sonuç, alüminyuma bağlı β -amiloid birikiminin sadece M1 reseptörlerin blokajını değil, fakat aynı zamanda başka faktörleri de içerebileceğini telkin etmektedir. Ayrıca, selektif bir M1 reseptör antagonisti olan biperidenin etkisinin tamamen önlenmesi, kafeinin Alzheimer hastalığına karşı koruyucu etkisinin çoğunlukla M1 reseptörler üzerinden olduğu sonucunu da doğrular. Ancak bu sonuçların hem skopolamin ve hem de biperiden varlığında selektif M1 agonistleri ve/veya kolinesteraz inhibitörleri kullanılarak doğrulanması gerekir.

Kullandığımız dozda kafein β -amiloid birikimine engel olmuştur ancak öğrenmeyi bozmuştur. Çalışmamızda 90 gün boyunca yüksek doz kafein verilmiş olması anksiyete yaratıp öğrenmeyi bozmuş olabilir. Tek doz kullanılmış olması bu çalışmanın zayıf tarafıdır. Elde ettiğimiz bulguları değerlendirmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu amaçla kafeinin oral yoldan olan etkisi doza bağımlı olarak incelenebilir veya parenteral yoldan kafein uygulaması yapmak suretiyle alüminyum veya biperidenle oluşturulan öğrenme ve bellek fonksiyon bozukluğu ve β -amiloid birikimi üzerinde kafeinin net etkisi öngörülebilir.

KAYNAKÇA

1. **Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, vd.** Alzheimer's disease. C. 397, The Lancet. Elsevier B.V.; **2021**. s. 1577-90.
2. **European Union's Health Programme.** Estimating the prevalence of dementia in Europe. **2019**.
3. **Wu YT, Beiser AS, Breteler MMB, Fratiglioni L, Helmer C, Hendrie HC, vd.** The changing prevalence and incidence of dementia over time-current evidence. C. 13, Nature Reviews Neurology. Nature Publishing Group; **2017**. s. 327-39.
4. **Kametani F, Hasegawa M.** Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease. C. 12, Frontiers in Neuroscience. Frontiers Media S.A.; **2018**.
5. **Ahmed S, Mahmood Z, Javed A, Hashmi SN, Zerr I, Zafar S, vd.** Effect of Metformin on Adult Hippocampal Neurogenesis: Comparison with Donepezil and Links to Cognition. Journal of Molecular Neuroscience. 01 Mayıs **2017**;62(1):88-98.
6. **Rebai O, Djebli NE.** Chronic Exposure to Aluminum Chloride in Mice: Exploratory Behaviors and Spatial Learning. Adv Biol Res (Rennes). **2008**;2(2):26-33.
7. Oshima E, Ishihara T, Yokota O, Nakashima-Yasuda H, Nagao S, Ikeda C, vd. Accelerated tau aggregation, apoptosis and neurological dysfunction caused by chronic oral administration of aluminum in a mouse model of tauopathies. Brain Pathol. Kasım **2013**;23(6):633-44.
8. **Brunton LL, Knollmann BC, Hilal-Dandan R.** Goodman & Gilman's : the Pharmacological Basis of Therapeutics, 13e [Internet]. 13th ed. New York, N.Y.: McGraw-Hill Education LLC.; **2018**. (McGraw-Hill's AccessMedicine). Erişim adresi: <https://login.proxy.bib.uottawa.ca/login?url=https://accessmedicine.mhmedical.com/book.aspx?bookid=2189>
9. **DeLapp N, Wu S, Belagaje R, Johnstone E, Little S, Shannon H, vd.** Effects of the M1 agonist xanomeline on processing of human beta-amyloid precursor protein (FAD, Swedish mutant) transfected into Chinese hamster ovary-m1 cells. Biochem Biophys Res Commun. 06 Mart **1998**;244(1):156-60.
10. **Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K.** Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. Physiol Rev [Internet]. **2018**;98:1591-625. Erişim adresi: www.canfite.com.
11. **Londzin P, Zamora M, Kałkol B, Taborek A, Folwarczna J.** Potential of caffeine in alzheimer's disease—a review of experimental studies. C. 13, Nutrients. MDPI AG; **2021**. s. 1-33.
12. **Crapper DR, Krishnan SS, Dalton AJ.** Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration. Science. 04 Mayıs **1973**;180(4085):511-3.
13. **Altmann P, Cunningham J, Dhanesha U, Ballard M, Thompson J, Marsh F.** Disturbance of cerebral function in people exposed to drinking water contaminated with aluminium sulphate: retrospective study of the Camelford water incident. BMJ. 25 Eylül **1999**;319(7213):807-11.
14. **Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Rey Cummings J, vd.** revising the NINCDS-ADRDA criteria. **2007**; Erişim adresi: <http://neurology.thelancet.comVol>
15. **Gao S, Hendrie HC, Hall KS, Hui S.** The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis. Arch Gen Psychiatry. Eylül **1998**;55(9):809-15.
16. **Edelberg HK, Wei JY.** The biology of Alzheimer's disease. Mech Ageing Dev. 25 Ekim **1996**;91(2):95-114.

17. **Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, vd.** Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry*. Şubat **2006**;63(2):168-74.
18. **Jansen IE, Savage JE, Watanabe K, Bryois J, Williams DM, Steinberg S, vd.** Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. *Nat Genet*. Mart **2019**;51(3):404-13.
19. **Ganguli M, Dodge HH, Chen P, Belle S, DeKosky ST.** Ten-year incidence of dementia in a rural elderly US community population: the MoVIES Project. *Neurology*. **2000**;54(5):1109-16.
20. **Tyas SL.** Alcohol use and the risk of developing Alzheimer's disease. *Alcohol Res Health*. **2001**;25(4):299-306.
21. **Nelson L, Gard P, Tabet N.** Hypertension and inflammation in Alzheimer's disease: close partners in disease development and progression! *J Alzheimers Dis*. **2014**;41(2):331-43.
22. **Mok KY, Jones EL, Hanney M, Harold D, Sims R, Williams J, vd.** Polymorphisms in BACE2 may affect the age of onset Alzheimer's dementia in Down syndrome. *Neurobiol Aging*. Haziran **2014**;35(6):1513.e1-5.
23. **Jamshed N, Ozair FF, Aggarwal P, Ekka M.** Alzheimer disease in post-menopausal women: Intervene in the critical window period. *J Midlife Health*. Ocak **2014**;5(1):38-40.
24. **Kunzler J, Youmans KL, Yu C, Ladu MJ, Tai LM.** APOE modulates the effect of estrogen therapy on A β accumulation EFAD-Tg mice. *Neurosci Lett*. 07 Şubat **2014**;560:131-6.
25. Xing Y, Jia JP, Ji XJ, Tian T. Estrogen associated gene polymorphisms and their interactions in the progress of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. Aralık **2013**;111:53-74.
26. **El Khoury NB, Gratuze M, Papon MA, Bretteville A, Planel E.** Insulin dysfunction and Tau pathology. *Front Cell Neurosci*. **2014**;8:22.
27. **Carrasquillo MM, Khan Q ul A, Murray ME, Krishnan S, Aakre J, Pankratz VS, vd.** Late-onset Alzheimer disease genetic variants in posterior cortical atrophy and posterior AD. *Neurology*. 22 Nisan **2014**;82(16):1455-62.
28. **Richardson JR, Roy A, Shalat SL, von Stein RT, Hossain MM, Buckley B, vd.** Elevated serum pesticide levels and risk for Alzheimer disease. *JAMA Neurol*. Mart **2014**;71(3):284-90.
29. **Grammas P.** Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 25 Mart **2011**;8:26.
30. **Szekely CA, Breitner JCS, Zandi PP.** Prevention of Alzheimer's disease. *Int Rev Psychiatry*. Aralık **2007**;19(6):693-706.
31. **Ngandu T, Lehtisalo J, Solomon A, Levälähti E, Ahtiluoto S, Antikainen R, vd.** A 2 year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): a randomised controlled trial. *Lancet*. 06 Haziran **2015**;385(9984):2255-63.
32. **Calsolaro V, Edison P.** Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimers Dement*. Haziran **2016**;12(6):719-32.
33. **Bulck M Van, Sierra-Magro A, Alarcon-Gil J, Perez-Castillo A, Morales-Garcia JA.** Novel approaches for the treatment of alzheimer's and parkinson's disease. C. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; **2019**.
34. **Murphy M.** The molecular pathogenesis of Alzheimer's disease: clinical prospects. *Lancet*. 340(8834-8835):1512-5.

35. **De Strooper B, Karran E.** The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell*. 11 Şubat 2016;164(4):603-15.
36. **Long JM, Holtzman DM.** Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*. 03 Ekim 2019;179(2):312-39.
37. **Zhang W, Xiao D, Mao Q, Xia H.** Role of neuroinflammation in neurodegeneration development. *C. 8, Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2023.
38. **Hammond TR, Marsh SE, Stevens B.** Immune Signaling in Neurodegeneration. *Immunity*. 16 Nisan 2019;50(4):955-74.
39. **Onyango IG, Jauregui G V, Čarná M, Bennett JP, Stokin GB.** Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Biomedicines*. 07 Mayıs 2021;9(5).
40. **Hansen D V, Hanson JE, Sheng M.** Microglia in Alzheimer's disease. *J Cell Biol*. 05 Şubat 2018;217(2):459-72.
41. **Maphis N, Xu G, Kokiko-Cochran ON, Jiang S, Cardona A, Ransohoff RM, vd.** Reactive microglia drive tau pathology and contribute to the spreading of pathological tau in the brain. *Brain*. Haziran 2015;138(Pt 6):1738-55.
42. **Eroymak S, Yiğit V.** Alzheimer hastalığının maliyet analizi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*. 2017;4(29):167-96.
43. **Castro DM, Dillon C, Machnicki G, Allegri RF.** The economic cost of Alzheimer's disease: Family or public health burden? *Dement Neuropsychol*. 2010;4(4):262-7.
44. **Zvěřová M.** Clinical aspects of Alzheimer's disease. *Clin Biochem*. Ekim 2019;72:3-6.
45. **Ertekin A, Demir R, Özdemir G, Özel L, Özyıldırım E, Ulvi H.** Türkiye'nin doğu bölgesinde alzheimer hastalığının prevalansı ve risk faktörlerinin araştırılması : Toplum dayalı kapı kapı bir Çalışma. *European Journal of General Medicine*. 2015;12(2):144-51.
46. **Escott-Price V, Sims R, Bannister C, Harold D, Vronskaya M, Majounie E, vd.** Common polygenic variation enhances risk prediction for Alzheimer's disease. *Brain*. Aralık 2015;138(Pt 12):3673-84.
47. **Escott-Price V, Myers AJ, Huentelman M, Hardy J.** Polygenic risk score analysis of pathologically confirmed Alzheimer disease. *Ann Neurol*. Ağustos 2017;82(2):311-4.
48. **Genin E, Hannequin D, Wallon D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, vd.** APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance. *Mol Psychiatry*. Eylül 2011;16(9):903-7.
49. **van der Lee SJ, Conway OJ, Jansen I, Carrasquillo MM, Kleindam L, van den Akker E, vd.** A nonsynonymous mutation in PLCG2 reduces the risk of Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and frontotemporal dementia, and increases the likelihood of longevity. *Acta Neuropathol*. Ağustos 2019;138(2):237-50.
50. **Beker N, Sikkes SAM, Hulsman M, Tesi N, van der Lee SJ, Scheltens P, vd.** Longitudinal Maintenance of Cognitive Health in Centenarians in the 100-plus Study. *JAMA Netw Open*. 05 Şubat 2020;3(2):e200094.
51. **Alfrey AC, LeGendre GR, Kaehny WD.** The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication. *N Engl J Med*. 22 Ocak 1976;294(4):184-8.
52. **Touam M, Martinez F, Lacour B, Bourdon R, Zingraff J, Di Giulio S, vd.** Aluminium-induced, reversible microcytic anemia in chronic renal failure: clinical and experimental studies. *Clin Nephrol*. Haziran 1983;19(6):295-8.

53. **Huat TJ, Camats-Perna J, Newcombe EA, Valmas N, Kitazawa M, Medeiros R.** Metal Toxicity Links to Alzheimer's Disease and Neuroinflammation. C. 431, Journal of Molecular Biology. Academic Press; **2019**. s. 1843-68.
54. **Priest ND.** The biological behaviour and bioavailability of aluminium in man, with special reference to studies employing aluminium-26 as a tracer: review and study update. J Environ Monit. Mayıs **2004**;6(5):375-403.
55. **Yumoto S, Nagai H, Kobayashi K, Tamate A, Kakimi S, Matsuzaki H.** 26Al incorporation into the brain of suckling rats through maternal milk. J Inorg Biochem. 15 Eylül **2003**;97(1):155-60.
56. **Kawahara M, Kato-Negishi M.** Link between aluminum and the pathogenesis of Alzheimer's disease: The integration of the aluminum and amyloid cascade hypotheses. International Journal of Alzheimer's Disease. **2011**.
57. **Muma NA, Singer SM.** Aluminum-induced neuropathology: transient changes in microtubule-associated proteins. Neurotoxicol Teratol [Internet]. Kasım **1996** [a.yer 03 Mart 2024];18(6):679-90. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8947945/>
58. **Kaji R, Izumi Y, Adachi Y, Kuzuhara S.** ALS-parkinsonism-dementia complex of Kii and other related diseases in Japan. Parkinsonism Relat Disord [Internet]. **2012** [a.yer 03 Mart 2024];18 Suppl 1(SUPPL. 1). Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22166431/>
59. **Savory J, Huang Y, Herman MM, Reyes MR, Wills MR.** Tau immunoreactivity associated with aluminum maltolate-induced neurofibrillary degeneration in rabbits. Brain Res [Internet]. 16 Ocak **1995** [a.yer 03 Mart 2024];669(2):325-9. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7712190/>
60. **Boni UD, Otvos A, Scott JW, Crapper DR.** Neurofibrillary degeneration induced by systemic aluminum. Acta Neuropathol. 16 Ağustos **1976**;35(4):285-94.
61. **Bouras C, Giannakopoulos P, Good PF, Hsu A, Hof PR, Perl DP.** A laser microprobe mass analysis of brain aluminum and iron in dementia pugilistica: comparison with Alzheimer's disease. Eur Neurol [Internet]. 01 Ocak **1997** [a.yer 03 Mart 2024];38(1):53-8. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9252800/>
62. **McDermott JR, Smith AI, Iqbal K, Wisniewski HM.** Brain aluminum in aging and Alzheimer disease. Neurology. Haziran **1979**;29(6):809-14.
63. **Nübling G, Bader B, Levin J, Hildebrandt J, Kretzschmar H, Giese A.** Synergistic influence of phosphorylation and metal ions on tau oligomer formation and coaggregation with α -synuclein at the single molecule level. Mol Neurodegener. 23 Temmuz **2012**;7:35.
64. **Exley C, Price NC, Kelly SM, Birchall JD.** An interaction of beta-amyloid with aluminium in vitro. FEBS Lett. 21 Haziran **1993**;324(3):293-5.
65. **Mantyh PW, Ghilardi JR, Rogers S, DeMaster E, Allen CJ, Stimson ER, vd.** Aluminum, iron, and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of beta-amyloid peptide. J Neurochem. Eylül **1993**;61(3):1171-4.
66. **Praticò D, Uryu K, Sung S, Tang S, Trojanowski JQ, Lee VMY.** Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice. FASEB J. Temmuz **2002**;16(9):1138-40.
67. **Ricchelli F, Drago D, Filippi B, Tognon G, Zatta P.** Aluminum-triggered structural modifications and aggregation of beta-amyloids. Cell Mol Life Sci. Ağustos **2005**;62(15):1724-33.
68. **Kaneko N, Sugioka T, Sakurai H.** Aluminum compounds enhance lipid peroxidation in liposomes: insight into cellular damage caused by oxidative stress. J Inorg Biochem. Haziran **2007**;101(6):967-75.

69. **Wu Z, Du Y, Xue H, Wu Y, Zhou B.** Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production. *Neurobiol Aging*. Ocak **2012**;33(1):199.e1-12.
70. **Yokel RA.** Aluminum chelation: chemistry, clinical, and experimental studies and the search for alternatives to desferrioxamine. *J Toxicol Environ Health*. Şubat **1994**;41(2):131-74.
71. **Shimkets LJ, Dworkin M.** Excreted adenosine is a cell density signal for the initiation of fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*. *Dev Biol*. Mayıs **1981**;84(1):51-60.
72. **Cieślak M, Wojtczak A.** Role of purinergic receptors in the Alzheimer's disease. C. 14, Purinergic Signalling. Springer Netherlands; **2018**. s. 331-44.
73. **Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Müller CE.** International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol Rev*. Mart **2011**;63(1):1-34.
74. **Deussen A.** Metabolic flux rates of adenosine in the heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. Kasım **2000**;362(4-5):351-63.
75. **Peleli M, Fredholm BB, Sobrevia L, Carlström M.** Pharmacological targeting of adenosine receptor signaling. *Mol Aspects Med*. Haziran **2017**;55:4-8.
76. **Cristóvão-Ferreira S, Navarro G, Brugarolas M, Pérez-Capote K, Vaz SH, Fattorini G, vd.** A1R-A2AR heteromers coupled to Gs and G i/0 proteins modulate GABA transport into astrocytes. *Purinergic Signal*. Eylül **2013**;9(3):433-49.
77. **Dhalla AK, Chisholm JW, Reaven GM, Belardinelli L.** A1 adenosine receptor: role in diabetes and obesity. *Handb Exp Pharmacol*. **2009**;193:271-95.
78. **Prystowsky EN, Niazi I, Curtis AB, Wilber DJ, Bahnson T, Ellenbogen K, vd.** Termination of paroxysmal supraventricular tachycardia by tecadenoson (CVT-510), a novel A1-adenosine receptor agonist. *J Am Coll Cardiol*. 17 Eylül **2003**;42(6):1098-102.
79. **Rabadi MM, Lee HT.** Adenosine receptors and renal ischaemia reperfusion injury. *Acta Physiol (Oxf)*. Ocak **2015**;213(1):222-31.
80. **Vincenzi F, Targa M, Corciulo C, Gessi S, Merighi S, Setti S, vd.** The anti-tumor effect of A3 adenosine receptors is potentiated by pulsed electromagnetic fields in cultured neural cancer cells. *PLoS One*. **2012**;7(6):e39317.
81. **Chen JF, Eltzhig HK, Fredholm BB.** Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov*. Nisan **2013**;12(4):265-86.
82. **Gessi S, Merighi S, Fazzi D, Stefanelli A, Varani K, Borea PA.** Adenosine receptor targeting in health and disease. *Expert Opin Investig Drugs*. Aralık **2011**;20(12):1591-609.
83. **Sawynok J.** Adenosine receptor targets for pain. *Neuroscience*. 03 Aralık **2016**;338:1-18.
84. **de Lera Ruiz M, Lim YH, Zheng J.** Adenosine A2A receptor as a drug discovery target. *J Med Chem*. 08 Mayıs **2014**;57(9):3623-50.
85. **Canals M, Marcellino D, Fanelli F, Ciruela F, de Benedetti P, Goldberg SR, vd.** Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem*. 21 Kasım **2003**;278(47):46741-9.
86. **Ferre S, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB, Fuxe K.** Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 Ağustos **1991**;88(16):7238-41.

87. **Laurent C, Burnouf S, Ferry B, Batalha VL, Coelho JE, Baqi Y, vd.** A2A adenosine receptor deletion is protective in a mouse model of Tauopathy. *Mol Psychiatry*. Ocak **2016**;21(1):97-107.
88. **Tyebji S, Saavedra A, Canas PM, Pliassova A, Delgado-García JM, Alberch J, vd.** Hyperactivation of D1 and A2A receptors contributes to cognitive dysfunction in Huntington's disease. *Neurobiol Dis*. Şubat **2015**;74:41-57.
89. **Orr AG, Hsiao EC, Wang MM, Ho K, Kim DH, Wang X, vd.** Astrocytic adenosine receptor A2A and Gs-coupled signaling regulate memory. *Nat Neurosci*. Mart **2015**;18(3):423-34.
90. **Laurent C, Eddarkaoui S, Derisbourg M, Leboucher A, Demeyer D, Carrier S, vd.** Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's disease-like tau pathology. *Neurobiol Aging*. Eylül **2014**;35(9):2079-90.
91. **Pedata F, Dettori I, Coppi E, Melani A, Fusco I, Corradetti R, vd.** Purinergic signalling in brain ischemia. *Neuropharmacology*. Mayıs **2016**;104:105-30.
92. **Sun Y, Huang P.** Adenosine A2B Receptor: From Cell Biology to Human Diseases. *Front Chem*. **2016**; 4:37.
93. **Janes K, Esposito E, Doyle T, Cuzzocrea S, Tosh DK, Jacobson KA, vd.** A3 adenosine receptor agonist prevents the development of paclitaxel-induced neuropathic pain by modulating spinal glial-restricted redox-dependent signaling pathways. *Pain*. Aralık **2014**;155(12):2560-7.
94. **Borea PA, Varani K, Vincenzi F, Baraldi PG, Tabrizi MA, Merighi S, vd.** The A3 adenosine receptor: history and perspectives. *Pharmacol Rev*. **2015**;67(1):74-102.
95. **Ashihara H, Kato M, Crozier A.** Distribution, biosynthesis and catabolism of methylxanthines in plants. *Handb Exp Pharmacol*. **2011**;(200):11-31.
96. **Yelanchezian YMM, Waldvogel HJ, Faull RLM, Kwakowsky A.** Neuroprotective Effect of Caffeine in Alzheimer's Disease. C. 27, *Molecules*. MDPI; **2022**.
97. **Cappelletti S, Piacentino D, Sani G, Aromatario M.** Caffeine: cognitive and physical performance enhancer or psychoactive drug? *Curr Neuropharmacol*. Ocak **2015**;13(1):71-88.
98. **McLellan TM, Caldwell JA, Lieberman HR.** A review of caffeine's effects on cognitive, physical and occupational performance. *Neurosci Biobehav Rev*. Aralık **2016**;71:294-312.
99. **Yoshimura H.** The potential of caffeine for functional modification from cortical synapses to neuron networks in the brain. *Curr Neuropharmacol*. Ekim **2005**;3(4):309-16.
100. **Berthou F, Ratanasavanh D, Alix D, Carlhant D, Riche C, Guillouzo A.** Caffeine and theophylline metabolism in newborn and adult human hepatocytes; comparison with adult rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*. 01 Ekim **1988**;37(19):3691-700.
101. **Begas E, Kouvaras E, Tsakalof A, Papakosta S, Asproдини EK.** In vivo evaluation of CYP1A2, CYP2A6, NAT-2 and xanthine oxidase activities in a Greek population sample by the RP-HPLC monitoring of caffeine metabolic ratios. *Biomed Chromatogr*. Şubat **2007**;21(2):190-200.
102. **Scientific Opinion on the safety of caffeine.** *EFSA Journal*. 01 Mayıs **2015**;13(5).
103. **Poole R, Kennedy OJ, Roderick P, Fallowfield JA, Hayes PC, Parkes J.** Coffee consumption and health: umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes. *BMJ*. 22 Kasım **2017**;359:j5024.
104. **Grosso G, Godos J, Galvano F, Giovannucci EL.** Coffee, Caffeine, and Health Outcomes: An Umbrella Review. *Annu Rev Nutr*. 21 Ağustos **2017**;37:131-56.

105. **Eskelinen MH, Ngandu T, Tuomilehto J, Soininen H, Kivipelto M.** Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population-based CAIDE study. *J Alzheimers Dis.* **2009**;16(1):85-91.
106. **Maia L, de Mendonça A.** Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur J Neurol.* Temmuz **2002**;9(4):377-82.
107. **Hussain A, Tabrez ES, Mavrych V, Bolgova O, Peela JR.** Caffeine: A Potential Protective Agent Against Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* **2018**;28(1):67-72.
108. **Kim J, Lee KW.** Coffee and its Active Compounds are Neuroprotective. *İçinde: Coffee in Health and Disease Prevention.* Elsevier; **2015.** s. 423-7.
109. **Haller S, Montandon ML, Rodriguez C, Moser D, Toma S, Hofmeister J, vd.** Caffeine impact on working memory-related network activation patterns in early stages of cognitive decline. *Neuroradiology.* Nisan **2017**;59(4):387-95.
110. **West RK, Ravona-Springer R, Livny A, Heymann A, Shahar D, Leroith D, vd.** Age Modulates the Association of Caffeine Intake With Cognition and With Gray Matter in Elderly Diabetics. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 23 Nisan **2019**;74(5):683-8.
111. **Holden HM, Rayment I, Thoden JB.** Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *J Biol Chem.* 07 Kasım **2003**;278(45):43885-8.
112. **Hua X, Lei M, Zhang Y, Ding J, Han Q, Hu G, vd.** Long-term D-galactose injection combined with ovariectomy serves as a new rodent model for Alzheimer's disease. *Life Sci.* 24 Nisan **2007**;80(20):1897-905.
113. **Lester-Coll N, Rivera EJ, Soscia SJ, Doiron K, Wands JR, de la Monte SM.** Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* Mart **2006**;9(1):13-33.
114. **Ahmad Rather M, Justin Thenmozhi A,** Manivasagam T, Dhivya Bharathi M, Essa M, Guillemain GJ. Neuroprotective role of Asiatic acid in aluminium chloride induced rat model of Alzheimer's disease. *Front Biosci (Schol Ed).* 01 Ocak **2018**;10(2):262-75.
115. **Deutsch JA.** The cholinergic synapse and the site of memory. *Science.* 19 Kasım **1971**;174(4011):788-94.
116. **Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS.** The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science.* 30 Temmuz **1982**;217(4558):408-14.
117. **Ebert U, Kirch W.** Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance. *Eur J Clin Invest.* Kasım **1998**;28(11):944-9.
118. **Blokland A, Sambeth A, Prickaerts J, Riedel WJ.** Why an M1 antagonist could be a more selective model for memory impairment than scopolamine. C. 7, *Frontiers in Neurology.* Frontiers Research Foundation; **2016.**
119. **Felder CC, Bymaster FP, Ward J, DeLapp N.** Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. *J Med Chem.* 16 Kasım **2000**;43(23):4333-53.
120. **Douchamps V, Mathis C.** A second wind for the cholinergic system in Alzheimer's therapy. *Behavioural pharmacology.* Nisan **2017**;28(2 and 3-Spec Issue):112-23.
121. **Felder CC, Goldsmith PJ, Jackson K, Sanger HE, Evans DA, Mogg AJ, vd.** Current status of muscarinic M1 and M4 receptors as drug targets for neurodegenerative diseases. *Neuropharmacology.* 01 Temmuz **2018**;136(Pt C):449-58.

122. **Morris R.** Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. Mayıs **1984**;11(1):47-60.
123. **Vorhees C V., Williams MT.** Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*. Temmuz **2006**;1(2):848-58.
124. **Arendash GW, Schleif W, Rezai-Zadeh K, Jackson EK, Zacharia LC, Cracchiolo JR, vd.** Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain β -amyloid production. *Neuroscience*. 03 Kasım **2006**;142(4):941-52.
125. **Klinkenberg I, Blokland A.** A comparison of scopolamine and biperiden as a rodent model for cholinergic cognitive impairment. *Psychopharmacology (Berl)*. Haziran **2011**;215(3):549-66.
126. **Baban D.** The effect of selenium on the morphological changes in the hippocampus and cerebral cortex of scopolamine induced alzheimer's type dementia rat model by histological analysis. [Master Thesis]. [Istanbul]: Yeditepe University, Institute of Health Sciences; **2021**.
127. **Ferak N.** STZ ile uyarılmış diyabetik sıçanlardaki nöropatolojik değişiklikler üzerine atorvastatinin etkisi [Yüksek Lisans Tezi]. [Istanbul]: İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü; **2014**.
128. **Jahanshahi M, Khalili M, Margedari A.** Naringin Chelates Excessive Iron and Prevents the Formation of Amyloid-Beta Plaques in the Hippocampus of Iron-Overloaded Mice. *Front Pharmacol*. **2021**;12:651156.
129. **Kimura Y, Ohue M, Kitauro T, Kihira K.** Amnesic effects of the anticholinergic drugs, trihexyphenidyl and biperiden: differences in binding properties to the brain muscarinic receptor. *Brain Res*. 10 Temmuz **1999**;834(1-2):6-12.
130. **Szczodry O, van der Staay FJ, Arndt SS.** Modelling Alzheimer-like cognitive deficits in rats using biperiden as putative cognition impairer. *Behavioural Brain Research*. 01 Kasım **2014**;274:307-11.
131. **Franco R, Rivas-Santisteban R, Casanovas M, Lillo A, Saura CA, Navarro G.** Adenosine a2a receptor antagonists affects nmda glutamate receptor function. Potential to address neurodegeneration in alzheimer's disease. *Cells*. 01 Mayıs **2020**;9(5).
132. **Morck TA, Lynch SR, Cook JD.** Inhibition of food iron absorption by coffee. *Am J Clin Nutr*. Mart **1983**;37(3):416-20.

ÖZGEÇMİŞ

Mürşit Enis AKYÜZ, orta öğrenimini Mersin Fen Lisesi'nde 2003 yılında tamamladı. 2012 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nden mezun oldu. 2017 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı.

