



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA DİYABETLE İNDÜKLENEN ALZHEİMER
MODELİNDE SODYUM-GLUKOZ KO-TRANSPORTER
İNHİBİTÖRLERİNİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

AYŞE NUR YAVUZ

DOKTORA TEZİ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. LEVENT KABASAKAL

2022-İSTANBUL

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ayşe Nur Yavuz

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim sırasında tecrübe, bilgi ve becerilerinden faydalandığım, akademik gelişimimde bana yol gösterici olan, desteklerini hiçbir koşulda esirgemeyen ve üzerimde sayısız emeği olan değerli doktora tez danışmanım Prof. Dr. Levent Kabasakal'a,

Bilgi birikimlerini paylaşarak doktora eğitimime büyük katkıları olan Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Hatice Kübra Elçioğlu, Prof. Dr. Göksel Şener ve Prof. Dr. Feyza Arıcıoğlu'na,

Doktora dönemimin her aşamasında yanımda olan, manevi desteklerini her zaman hissettiğim değerli çalışma arkadaşlarım Doç. Dr. Muhammet Emin Çam ve Dr. Öğr. Üyesi Büşra Ertaş'a,

Doktora eğitimime beraber başladığım, önceki dönemlerde beraber çalışma fırsatı yakaladığım değerli arkadaşlarım, Dr. Öğr. Üyesi Rümeysa Keleş Kaya, Doç. Dr. Gökhan Ünal ve Dr. Ceren Şahin Özkartal'a,

Doktora tez çalışmalarımın her aşamasında desteklerini esirgemeyen Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanları değerli arkadaşlarım Cihat Yıldız ve Kadir Demirci'ye,

Doktora tez çalışmamın histoloji analizlerindeki desteklerinden dolayı Prof. Dr. Yusufhan Yazır ve Gül Sinemcan Kabataş'a,

Her zaman yanımda olan, manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli annem Zeynep Hazar, babam Sadullah Hazar ve ablam Nagehan Hazar ile ikinci ailem Yavuz ailesine,

Doktora sürecimin en zor aşamalarında bile desteğini esirgemeyen her zaman fedakarlığı ve sabrı ile yanımda olan, akademik yaşantımın hediyesi değerli eşim Akif Yavuz'a ve doktora tez dönemimde hayatımıza katılan en büyük motivasyon kaynağım, oğlum Ali Taha Yavuz'a,

Sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunarım.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-DRP-110718-0445 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Ayşe Nur Yavuz



İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLO LİSTESİ	xii
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
RESİM LİSTESİ	xiv
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Alzheimer Hastalığı (AH)	6
4.1.1. Alzheimer hastalığı hakkında genel bilgi	6
4.1.2. Alzheimer hastalığının etiyolojisi ve epidemiyolojisi	6
4.1.3. Alzheimer hastalığının prevalansı	7
4.1.4. Alzheimer hastalığının insidansı	8
4.1.5. Alzheimer hastalığının nöropatofizyolojisi	8
4.1.5.1. Alzheimer hastalığında amiloid beta	8
4.1.5.2. Alzheimer hastalığında apolipoprotein e	9
4.1.5.3. Alzheimer hastalığında tau ve nörofibriler yumaklar	10
4.1.6. Alzheimer hastalığı'nda tanı kriterleri	11
4.1.7. Alzheimer hastalığında risk faktörleri	12
4.1.7.1. Vücut ağırlığı	12
4.1.7.2. Plazma lipid seviyeleri	13
4.1.7.3 Metabolik sendrom	13
4.1.7.4. Depresif belirtiler	13
4.1.7.5. Psikolojik stres	13
4.1.7.6. Tip 2 diabetes mellitus	14
4.2. Diabetes Mellitus Hastalığı	14
4.2.1. Diabetes mellitus hastalığı hakkında genel bilgi	14
4.2.2. Diabetes mellitus'un sınıflandırılması	14
4.2.3. Diabetes mellitus'un tanısı	16

4.3. Alzheimer Hastalığı ve Tip 2 Diabetes Mellitus İlişkisi	16
4.3.1. Amiloidogenezis	17
4.3.2. Genetik çalışmalar-apolipoprotein e-ε4	19
4.3.3. Hiperfosforile tau ve nörofibriler yumaklar	20
4.3.4. Oksidatif stres ve nöroinflamasyon	21
4.3.5. ACHE	23
4.3.6. Periferik ve serebral insülin rezistansı	23
4.3.7. Serebral insülin eksikliği – glukojen sentaz kinaz-3β	25
4.3.8. Oksidatif hasar – insülin ilişkisi	26
4.3.9. cAMP ve cAMP aracılı sinyal yollarının hasarlanması	26
4.3.10. İnsülin degrade edici enzim	28
4.4. Alzheimer Hastalığının Tedavisi	29
4.4.1. Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan mevcut farmakolojik ve farmakolojik olmayan yaklaşımlar	29
4.4.2. Alzheimer hastalığı tedavisinde diğer terapötik hedefler	31
4.4.2.1. Aβ'yı hedef alan tedavi yaklaşımları	31
4.4.2.2. Hiperfosforile tau'yu hedef alan tedavi yaklaşımları	32
4.4.2.3. APOE-ε4'ü hedef alan tedavi yaklaşımları	34
4.4.2.3.1. Aβ-bağımlı olarak apoe-ε4'ü hedef alan tedavi yaklaşımları	34
4.4.2.3.2. Aβ-bağımlı olmayarak apoe-ε4'ü hedef alan tedavi yaklaşımları	35
4.4.2.4. Diğer tedavi yaklaşımları	36
4.5. AH Tedavisinde T2DM İlaçları	36
4.5.1. AH tedavisi için T2DM ilaçlarının etkileri	36
4.5.2. T2DM ve AH'de olası ortak tedavi yaklaşımları	37
4.5.2.1. PDE inhibitörleri	37
4.5.2.2. GSK-3β inhibitörleri	39
4.5.2.3. Dual BACE-1 ve GSK-3β inhibitörleri	40
4.5.3. SGLT inhibitörlerinin AH'deki yeri	41
5. GEREÇ VE YÖNTEM	44
5.1. Kimyasal Maddeler	44
5.2. Cihazlar	44
5.3. Deney Hayvanları	45
5.4. Deney Grupları	45
5.5. Deney Hayvanlarının Diyabet Durumlarının Değerlendirilmesi	46

5.5.1. Deney hayvanlarının vücut ağırlıklarının ölçümü	46
5.5.2. Haftalık kan glukozu ve oral glukoz tolerans testi'nin uygulanması	46
5.5. Deney Hayvanlarının Kognitif Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi	46
5.5.1. Açık alan testi	46
5.5.2. Yeni obje tanıma testi	47
5.5.3. Pasif sakınma testi	47
5.5.4. Morris'in su tankı testi	48
5.6. Deneyin Sonlandırılması	49
5.7. Biyokimyasal Analizler	49
5.7.1. ELISA analizleri	49
5.7.1.1. ELISA analizlerinin yapılması	49
5.7.2. Gen ekspresyonu analizleri	50
5.7.2.1. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi	50
5.7.2.2. Gerçek zamanlı PCR	51
5.7.2.3. Sonuçların analizi	52
5.8. Histolojik Analizler	53
5.8.1. Histopatolojik analizler	53
5.8.2. İmmünohistokimyasal analizler	53
5.9. İstatistiksel Analizler	54
6. BULGULAR	55
6.1. Deney Hayvanlarının Diyabet Durumlarının Değerlendirilmesi	55
6.1.1. Ağırlık ölçümlerinin değerlendirilmesi	55
6.1.2. Kan glukoz ölçümlerinin değerlendirilmesi	55
6.1.3. Oral glukoz tolerans testi ölçümlerinin değerlendirilmesi	56
6.2. Deney Hayvanlarının Kognitif Durumlarının Değerlendirilmesi	57
6.2.1. Açık alan testi sonuçlarının değerlendirilmesi	57
6.2.2. Yeni obje tanıma testi sonuçlarının değerlendirilmesi	58
6.2.3. Pasif sakınma testi sonuçlarının değerlendirilmesi	59
6.2.4. Morris'in su tankı testi sonuçlarının değerlendirilmesi	60
6.3. Biyokimyasal Analizlerin Değerlendirilmesi	61
6.3.1. ELISA analizlerinin değerlendirilmesi	61
6.3.1.1. Serum ve serebral korteks dokusunda insülin seviyelerinin değerlendirilmesi	61

6.3.1.2. Serebral korteks ve pankreas dokularında $a\beta_{1-42}$ seviyelerinin değerlendirilmesi	63
6.3.1.3. Serebral korteks dokusunda fosforile tau seviyelerinin değerlendirilmesi	63
6.3.1.4. Serebral korteks dokusunda ache seviyelerinin değerlendirilmesi	64
6.3.1.5. Serebral korteks dokusunda SGLT2 seviyelerinin değerlendirilmesi	65
6.3.1.6. Serebral korteks dokusunda GSK-3 β seviyelerinin değerlendirilmesi	66
6.3.2. Gen ekspresyonu analizlerinin değerlendirilmesi	67
6.4. Histolojik Analizlerin Değerlendirilmesi	69
6.4.1. Histopatolojik analizlerin değerlendirilmesi	69
6.4.1.1. Serebral korteks	70
6.4.1.2. Hipokampus	71
6.4.1.3. Pankreas	71
6.4.2. İmmünohistokimya analizlerinin değerlendirilmesi	72
6.4.2.1. Serebral kortekste amiloid beta ölçümlerinin değerlendirilmesi	72
6.4.2.2. Hipokampüste amiloid beta ölçümlerinin değerlendirilmesi	72
6.4.2.3. Serebral kortekste fosforile tau ölçümlerinin değerlendirilmesi	73
6.4.2.4. Hipokampüste fosforile tau ölçümlerinin değerlendirilmesi	74
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	75
8. KAYNAKLAR	91
Ek 1: Etik Kurul Onayı	134
10. ÖZGEÇMİŞ	135

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

β -sekretaz	: Beta-sekretaz
γ -sekretaz	: Gama-sekretaz
A β	: Amiloid beta
Akt	: Protein kinaz B
A β ₁₋₄₀	: Amiloid beta 1-40
A β ₁₋₄₂	: Amiloid beta 1-42
A β _{42/43}	: Amiloid beta 42/43
ADRDA	: Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Bozukluklar Birliği (Alzheimer's Disease and Related Disorders Association)
AGEler	: Gelişmiş glikasyon son ürünleri (advanced-glycation end-products)
AH	: Alzheimer hastalığı
AKG	: Açlık kan glukozu
APOE	: Apolipoprotein E
APOE- ϵ 2	: Apolipoprotein E epsilon-2
APOE- ϵ 3	: Apolipoprotein E epsilon-3
APOE- ϵ 4	: Apolipoprotein E epsilon-4
APP	: Amiloid öncü protein (amyloid precursor protein)
ATP	: Adenozin trifosfat
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
CDK5	: Siklin bağımlı kinaz 5 (cyclin-dependent kinase 5)
cAMP	: Adenozin monofosfata
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
cDNA	: Komplementer DNA

CREB	: cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (cyclic amp-response element binding protein)
CHIP	: Hsc70 ile etkileşime giren proteinin karboksi ucu (carboxy-terminus of Hsc70-interacting protein)
DAB	: Diaminobenzidin
DM	: Diabetes Mellitus
DPP-4	: Dipeptidil peptidaz-4
DSM	: Mental bozuklukların tanısall ve istatistiksel el kitabı (diagnostic and statistical manual of mental disorders)
ELISA	: Enzime bağılı immünosorbent testi (Enzyme-linked immunosorbent assay)
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
G6Paz	: Glukoz-6-fosfataz
GLUT-1	: Glukoz transporter-1
GLP-1	: Glukagon benzeri peptit-1
GSK-3 β	: Glikojen sentaz kinaz-3 β
HbA1c	: Hemoglobin A1c
IAPP	: İşlet amiloid polipeptit
IDE	: İnsülin degrade edici enzim
IRS-1	: İnsülin reseptör substratı-1
KBB	: Kan-beyin bariyeri
LOX	: Lipooksijenaz
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinazı
MAPK/ERK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz/hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK) belongs to the mitogen-activated protein kinase)

MSS	: Merkezi sinir sistemi
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NFY	: Nörofibriler yumaklar (neurofibrillary tangles)
NINCDS	: Amerikan Ulusal Nörolojik ve İletişimsel Bozukluklar Enstitüsü ve İnme (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke)
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NSAİİ	: Steroidal olmayan anti-inflamatuar ilaçlar
OGTT	: Oral Glukoz Tolerans Testi
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PEPCK	: Fosfoenolpirüvat karboksikinaz
PDE	: Fosfodiesteraz
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
PKA	: cAMP'ye bağımlı protein kinaz
PLA2	: Fosfolipaz A2
proIAPP	: Proislet amiloid polipeptid
PPAR γ	: Pereksizom proliferatör aktive reseptör gama
PSEN1	: presenilin 1
PSEN2	: presenilin 2
p-tau	: hiperfosforile tau
RAGE	:Gelişmiş glikasyon son ürünleri reseptörleri (receptors for advanced-glycation end-products)
ROS	: Reaktif oksijen ürünleri (reactive oxygen species)
SGLT	: Sodyum glukoz ko-transporter
SD	: Stok dilüent

SS	: Stok standart
STZ	: Streptozotosin
T1DM	: Tip 1 Diabetes Mellitus
T2DM	: Tip 2 Diabetes Mellitus
t-tau	: Toplam tau



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. RT-PCR koşulları	51
Tablo 2. Kullanılan ekspresyon primerleri	52
Tablo 3. Gerçek zamanlı PCR basamakları	52



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Haftalara göre hayvan ağırlıkları.	55
Şekil 2. Haftalara göre kan glukozu.	56
Şekil 3. Oral glukoz tolerans testine göre zamana bağlı kan glukozu.	57
Şekil 4. Açık alan testine göre (a) katedilen mesafe (geçilen çizgi sayısı) ve (b) şahlanma sayısı.	58
Şekil 5. Yeni obje tanıma testine göre keşif süresi (s) (geçilen çizgi sayısı).	59
Şekil 6. Pasif sakınma testine göre karanlık bölgeye ilk geçiş zamanı.	60
Şekil 7. Morris'in su tankı testine göre (a) hedef kadrana ulaşma süresi ve (b) hedef kadranda geçirilen toplam zaman.	61
Şekil 8. İnsülin seviyesi (a) Serum, (b) Pankreas ve (c) Serebral korteks.	62
Şekil 9. Amiloid beta ₁₋₄₂ seviyesi (a) Serebral korteks ve (b) Pankreas.	63
Şekil 10. Serebral korteks fosforile tau seviyesi.	64
Şekil 11. Serebral korteks asetilkolinesteraz (AChE) seviyesi.	65
Şekil 12. Serebral korteks sodyum-glukoz ko-transporter-2 (SGLT2) seviyesi.	66
Şekil 13. Serebral korteks asetilkolinesteraz (GSK-3 β) seviyesi.	67
Şekil 14. Korteks doku örneklerinde p38 mRNA ekspresyon değişimi.	68
Şekil 15. Pankreas doku örneklerinde p38 mRNA ekspresyon değişimi. 1	69

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Serebral korteks Hematoksilen-Eozin boyaması.	70
Resim 2. Hipokampus Hematoksilen-Eozin boyaması.	71
Resim 3. Pankreas Hematoksilen-Eozin boyaması.	71
Resim 4. Serebral kortekste A β immunohistokimyası.	72
Resim 5. Hipokampüste A β immunohistokimyası.	73
Resim 6. Serebral kortekste fosforile tau immunohistokimyası.	73
Resim 7. Hipokampüste fosforile tau immunohistokimyası	74



1. ÖZET

Tezin Başlığı : Sıçanlarda Diyabetle İndüklenen Alzheimer Modelinde Sodyum-Glukoz Ko-Transporter İnhibitörlerinin Etkilerinin İncelenmesi

Öğrencinin Adı, Soyadı : Ayşe Nur Yavuz

Danışmanın Adı, Soyadı : Prof. Dr. Levent Kabasakal

Programın Adı : Farmakoloji

Amaç: Bu tez çalışmasında T2DM ile indüklenen AH modelinde non-selektif sodyum-glukoz ko-transporter (SGLT) inhibitörü florizin ile SGLT2 inhibitörü dapagliflozinin etkileri ve etki mekanizmalarının aydınlatılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 8 hafta yüksek yağlı diyet ile beslenme ve 4. haftanın sonunda düşük doz streptozotosin uygulaması ile diyabet indüklü AH modeli oluşturulmuştur. Streptozotosin uygulamasının ardından 4 haftalık tedavi başlanmıştır. Deney süresince sıçanların hiperglisemi durumları, kan glukoz ölçümü, oral glukoz tolerans testi ve insülin tolerans testi ile; kognitif bozuklukları ise yeni obje tanıma testi, pasif sakınma testi ve Morris'in su tankı testi ile değerlendirilmiştir. Sıçanlardan elde edilen serum ve çeşitli dokularda ilgili parametrelerin biyokimyasal ve histolojik analizleri yapılmıştır.

Bulgular: Florizin ve dapagliflozin, diyabetik ve kognitif bozuklukları düzeltmiş ve biyokimyasal analizler bu sonuçları desteklemiştir. Histolojik analize göre pankreas, hipokampus ve serebral korteks dokularında AH grubuna göre düzelme saptanmış, immünohistokimyasal analizlerde hipokampus ve serebral kortekste AH grubunda artan amiloid- β_{1-42} ve tau protein ekspresyonu azalmıştır.

Sonuçlar: Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre non-selektif SGLT inhibitörü florizin ve SGLT2 inhibitörü dapagliflozin T2DM indüklü AH hastalığında iyileştirici etki göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Tip 2 diabetes mellitus, alzheimer hastalığı, dapagliflozin, florizin, sodyum-glukoz ko-transporter inhibitörleri

2. SUMMARY

Title of Thesis : Investigation of the Effects of Sodium-Glucose Co-Transporter Inhibitors in Diabetes-Induced Alzheimer Model in Rats

Student Name, Surname : Ayşe Nur Yavuz

Supervisor Name : Prof. Dr. Levent Kabasakal

Program Name : Farmakoloji

Objective: In this thesis, it was aimed to elucidate the action and mechanism of action of the non-selective sodium-glucose co-transporter (SGLT) inhibitor phlorizin and the SGLT2 inhibitor dapagliflozin in the T2DM-induced AD model.

Material and Methods: In our study, the T2DM-induced AH model was created with high-fat diet for 8 weeks and low-dose streptozotocin administration at the end of the 4th week. After streptozotocin administration, 4-week treatment was started. During the experiment, the hyperglycemia status of rats were evaluated with blood glucose measurement, oral glucose tolerance test, and insulin tolerance test; cognitive impairments were evaluated with the novel object recognition test, passive avoidance test and Morris' water maze test. Biochemical and histological analyzes of the relevant parameters were performed in serum and tissues obtained from rats.

Results: Phlorizin and dapagliflozin improved diabetic and cognitive impairments, and biochemical analyzes supported these results. According to the histological analysis, pancreatic, hippocampus and cerebral cortex tissues showed improvement compared to the AD group, and immunohistochemical analyzes showed increased amyloid- β_{1-42} and and tau protein expression in the hippocampus and cerebral cortex in the AD group.

Conclusion: According to the results obtained from this thesis study, non-selective SGLT inhibitor florizin and SGLT2 inhibitor dapagliflozin showed curative effects in T2DM-induced AD disease.

Keywords: Tip 2 diabetes mellitus, alzheimer's disease, dapagliflozin, phlorizin, sodium-glucose co-transporter inhibitors

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus (DM) insülin üretiminde, etkinliğinde ya da her ikisinde birden eksiklik olması sebebiyle kan glukoz düzeyinin yükselmesi ile karakterize kronik, metabolik bir hastalıktır. Uluslararası Diyabet Federasyonu (International Diabetes Federation)'na göre Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM), tüm diyabet vakalarının %90'ını oluşturmakla birlikte dünya çapında yaklaşık 415 milyon insanı etkilemektedir. Tedavi edilmeyen veya kontrol altına alınamamış T2DM makrovasküler, mikrovasküler ve nöropatik komplikasyonlar ile ilişkilidir ve kardiyovasküler hastalıkların, böbrek yetmezliğinin ve görme kaybının önde gelen nedenidir (International Diabetes Federation, 2021).

T2DM'de görülen insülin direncinin nedenleri henüz tam olarak belirlenmemiş olsa da sonuçları oldukça geniş kapsamlıdır. İnsülin direncinin ilişkili bulunduğu birçok patoloji yanında hipokampüst ve serebral kortekste insülin direnci, kognitif disfonksiyon ve demans ile ilişkili bulunmaktadır (Biessels ve Reagan, 2015). Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında hem vasküler demans hem AH'yi kapsayan demansın oluşma riski T2DM'li hastalarda %73 daha fazladır (Koekkoek ve ark., 2015). Ayrıca bilişsel gerileme süreci insülin direncinin prediyabetik dönemlerinde başlıyor gözükmemektedir (Biessels ve Reagan, 2015) ve bu durum insülin duyarlılığı ve demans arasındaki bağlantıyı kanıtlar niteliktedir (Williamson ve ark., 2012).

Dünya Alzheimer Raporu (World Alzheimer Report)'na göre bugün, dünya çapında yaklaşık 47 milyon insan demans hastası ve bu sayının 2050 yılına kadar 131 milyonu aşması bekleniyor. Demansın en sık görülen formu olan AH tüm demans olgularının %60-80'ini oluşturur ve dünya çapında 35 milyondan fazla kişiyi etkilemektedir (Querfurth ve LaFerla, 2010). AH, genellikle 65 yaştan büyük kişilerde ilerleyici bellek kaybı ve kademeli olarak kognitif fonksiyonlarda azalma ile kendini gösteren bir hastalıktır ve bu semptomlarla ilişkili patofizyolojik mekanizmalar tam olarak anlaşılmış değildir (Dias ve ark., 2015).

AH ve T2DM'nin sıklığı yaş ilerledikçe artmakla beraber birtakım klinik ve epidemiyolojik çalışmalara göre birinin gelişimi diğerinin riskini de artırmaktadır (Sridhar ve ark., 2015). T2DM ve AH arasındaki bağlantıyı destekleyen

epidemiyolojik veriler ışığında, ikincisinin görülme sıklığının artması, muhtemelen yalnızca nüfusun yaşlanmasının değil, aynı zamanda diyabetin yaygınlaşmasının bir sonucudur (Prince ve ark., 2013). Yaklaşık 193 milyon diyabetli hastanın teşhis edilmediği ve hastalığın uzun vadeli hasarının farkında olunmadığı tahmin edilmektedir (International DiabetesFederation, 2021).

Araştırmaların her iki hastalıkla da aynı anda baş edebilecek yeni çok hedefli tedavilere yönelmesi ile muhtemelen, gelecekte T2DM'nin erken evrelerinde tedaviye başlanması ile kümülatif nöropatolojik olayların sonuçlarını zayıflatmak veya hatta önlemek mümkün olabilecektir (de Matos ve ark., 2017).

T2DM tedavisinde, klasik ilaçlarından olan biguanid türevi metforminden son yıllarda onay alan SGLT2 inhibitörü empagliflozine kadar çeşitli ilaçlar dünya çapında kullanılmaktadır (<http://www.fda.gov/ForPatients/Illness/Diabetes/ucm408682.htm>, Erişim tarihi: 01.08.2022). T2DM'nin kompleks etiyolojisi ve hastalar arasındaki klinik farklılıklar sebebiyle bu ilaçların bazılarının kombinasyon halinde kullanımı ile diyet ve egzersizi kapsayan hayat tarzı değişiklikleri ile T2DM'nin kontrolü sağlanabilmektedir (de Matos ve ark., 2017).

Günümüzde AH'nin tedavisi için reçete edilen ilaçlar çoğunlukla donepezil ve rivastigmin gibi AChE inhibitörleri ya da hem AChE hem de butilkolinesteraz (BChE) inhibitörü olan ilaçlardır (Tan ve ark., 2014). Bu ilaçlar beyindeki ACh seviyelerinde artışa neden olmak ile birlikte yalnızca geçici semptomatik iyileşme sağlarlar (Dias ve ark., 2015). AH'nin ileriki evrelerinde genellikle NMDA reseptör antagonisti olan memantin reçete edilir fakat bu ilaç da kolinesteraz inhibitörlerine benzer şekilde hastalığı düzenleyici etkilerden yoksundur (Tabaton ve ark., 2010).

T2DM'nin ve AH'nin ortak patolojik geçmişine dayanarak, iyi bilinen ve yaygın olarak kullanılan antidiyabetik ilaçların, AH'nin tedavisinde ve önlenmesinde potansiyel faydalarını ortaya çıkarmak için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

SGLT2 inhibitörlerinden dapagliflozin (Sa-Nguanmoo ve ark., 2017), empagliflozin (Lin ve ark., 2014) ve kanagliflozin (Arafa ve ark., 2017) ile yapılan çalışmalarda bu ilaçların kognitif fonksiyonda iyileşme yaptığı gösterilmiş ancak bu çalışmalar etki mekanizması aydınlatma yönünden eksik kalmaktadır. Ayrıca, moleküler modelleme çalışmaları SGLT inhibitörlerinin AH ile yolunu kesiştiren bir özelliğini açığa

çıkarmıştır. Bu çalışmalara göre çeşitli SGLT inhibitörlerinin SGLT inhibisyonu yanında asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyonu yaptığı bulunmuştur (Rizvi ve ark., 2014; Shaikh ve ark., 2016). Dapagliflozinle yapılan bir moleküler modelleme çalışmasında hidrofobik ve katyon-pi etkileşimleri, dapagliflozinin SGLT2 ve AChE enziminin katalitik bölgesi içinde doğru konumlandırılmasında önemli rol oynar. Böylece dapagliflozinin SGLT2 ve AChE'nin güçlü ikili inhibitörü gibi davranabileceği belirtilmiştir. Burada tanımlanan sonuçların, diyabetle ilişkili nörolojik bozukluklara karşı ileride yapılacak ikili tedavinin temelini oluşturabileceği belirtilmiştir (Shaikh ve ark., 2016). Aynı ikili etki moleküler modelleme çalışmaları ile sotagliflozin (Shakil, 2017) ve kanagliflozin (Rizvi ve ark., 2014) için de bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında, sıçanlarda yüksek yağlı diyet ve düşük doz streptozotosin uygulaması ile oluşturulan T2DM indüklü AH modelinde non-selektif SGLT inhibitörü florizin ve SGLT2 inhibitörü dapagliflozinin hem diyabet hem Alzheimer hastalığı üzerine olan etkilerinin incelenmesi, birbirleri ile kıyaslanması ve bu hastalıklar üzerine olası etki mekanizmalarının aydınlatılması amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda sıçanların diyabetik durumlarının kan glukoz ölçümleri ile, kognitif değerlendirmelerinin ise davranış testleri ile belirlenmesi, ayrıca sıçanlardan alınan çeşitli dokularda biyokimyasal, histolojik ve immünohistokimyasal analizlerin yapılması hedeflenmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Alzheimer Hastalığı (AH)

4.1.1. Alzheimer hastalığı hakkında genel bilgi

Dünya Alzheimer Raporu (World Alzheimer Report) 2021'e göre demans şu anda küresel olarak 7. önde gelen ölüm nedenidir. Hastalığın ekonomik maliyeti de oldukça fazladır ve gittikçe artmaktadır. Bugün dünya çapında yaklaşık 55 milyon insan demans hastası ve bu sayının 2050 yılına kadar 139 milyonu aşması bekleniyor (<https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2021>, Erişim tarihi: 01.08.2022) Demans hastalarının büyük çoğunluğuna ise tanı konulamamıştır ve sonuçta bu kişiler demans hakkında bakım ve tedaviden uzaktır. Demanslı hasta sayısının bu kadar artması, nüfusun yaşlanması ile oldukça ilişkili görülmektedir. Demansın en sık görülen formu olan Alzheimer hastalığı (AH) tüm demans olgularının %60-80'ini oluşturur (Alzheimer's Association, 2014) ve dünya çapında 35 milyondan fazla kişiyi etkilemektedir (Querfurth ve LaFerla, 2010). AH, genellikle 65 yaştan büyük kişilerde ilerleyici bellek kaybı ve kademeli olarak kognitif fonksiyonlarda azalma ile kendini gösteren bir hastalıktır ve bu semptomlarla ilişkili patofizyolojik mekanizmalar tam olarak anlaşılmış değildir (Dias ve Rauter, 2015). Bununla birlikte, AH'de beyinde amiloid beta (A β) agregatları da denilen yanlış katlanmış protein birikimi ve hiperfosforile tau (p-tau) proteini içeren nörofibriler yumakların (NFY) oksidatif ve inflamatuvar hasarının anahtar tetikleyicileri olduğu ve sonuçta sinaptik disfonksiyon ve nöronal ölümle neticelendiği açıktır (Querfurth ve LaFerla, 2010).

4.1.2. Alzheimer hastalığının etiyolojisi ve epidemiyolojisi

AH'nin hücresel patolojisi kapsamlı bir şekilde tanımlanmış olmasına rağmen, halen hastalığın tedavisinde tam etkili ilaç bulunmamaktadır ve mevcut ilaçlar hastalığın semptomlarını kısmen hafifletebilmektedir. Yukarıda belirtilen AH insidansında tahmin edilen artış göz önüne alındığında, bu alandaki temel öncelik, yeni terapötik hedefleri temsil edebilecek AH etiyolojisinin altında yatan moleküler mekanizmaların tanımlanması olmuştur.

AH'nin büyük çoğunluğu sporadik bir temelde meydana gelse de amiloid öncü protein (APP), presenilin 1 (PSEN1) ve presenilin 2 (PSEN2) genlerindeki mutasyonlar nadir (<%0,5) görülen bir ailesel AH formuna neden olur. Semptomlar sporadik AH'den daha erken, tipik olarak genellikle 30-50 yaş arasında gelişir. Geç başlangıçlı AH muhtemelen genetik ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık bir etkileşim tarafından yönlendirilmektedir. Son yapılan çalışmalarla AH riskinin %70'inin genetik faktörlere atfedilebileceği düşünülmektedir. ε2, ε3 ve ε4 olmak üzere üç varyantı olan apolipoprotein E (APOE) geni, sporadik AH için en büyük genetik risktir. Binlerce örnek kullanılan genom çapında ilişkilendirme çalışmaları AH için; inflamatuvar, kolesterol metabolizması ve endozomal-vezikül geri dönüşüm yollarını içeren 20'den fazla genetik risk faktörünü tanımlamıştır. Bu nispeten yaygın risk genlerinin her biri, yalnızca çok küçük bir risk artışı sağlar, ancak poligenik bir risk skorunda birleştirildiklerinde, şansa dayalı vaka tahminini neredeyse ikiye katlayabilir. Ayrıca epidemiyolojik kanıtlar, eğitim ve fiziksel egzersizin AH'ye karşı koruma sağlayabileceğini, orta yaş hipertansiyonu ve diyabetes mellitus'un ise AH'ye yakalanma riskini artırdığını göstermektedir. (Lane ve ark., 2018)

4.1.3. Alzheimer hastalığının prevalansı

Dünya çapında yaşlı bireylerde demans prevalansı oldukça yüksektir. Demansın yaşa göre standardize edilmiş prevalansı çoğu ülkede %5-7 arasında değişmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, Afrika kökenli Amerikalılarda ve Latinlerde demans prevalansı Latin olmayan Beyazlara göre daha yüksek bulunmuştur. Birleşik Krallık'ta, Afrikalı-Karayıpli katılımcılarda, Beyazlara kıyasla daha yüksek bir yaygınlık bulunmuştur. 60 yaş ve üzeri kişilerde demansın tahmini prevalansı, Orta Avrupa'da %4,7 gibi düşük bir oran ile Latin Amerika'da %8,5 ve Kuzey Afrika ve Orta Doğu'da %8,7 arasında değişmektedir. Sanayileşmemiş ülkelerde yürütülen araştırmalarda ise Nijerya'da %1,4 ve Hindistan'da %1,1 ile daha düşük prevalans belgelenmiştir. Bu ülkelerdeki tespit metodolojileri ve yüksek ölüm oranları düşük prevalans ve insidansı açıklayabilir. Demans, özellikle AH dünyadaki tüm popülasyonlarda mevcuttur. (Lopez ve Kuller, 2019)

4.1.4. Alzheimer hastalığının insidansı

60 yaşından sonra demans insidansı tahminleri her 10 yılda iki katına çıkmaktadır. Demans veya AH insidansında cinsiyetler arasında çok az fark vardır, ancak yaşam sürelerindeki farklılıklar nedeniyle, özellikle 85 yaş üzerinde kadınlarda, erkeklere kıyasla daha fazla gözükmemektedir. Amerikan Birleşik Devletleri'nde yapılan araştırmalar, Afrika kökenli Amerikalılarda ve Latinlerde insidans oranlarının Beyazlardan daha yüksek olduğunu göstermektedir. Ancak eğitim düzeyi ve sosyoekonomik duruma göre ayarlama yapıldığında bu farklılığın ortadan kalktığı görülmektedir. (Lopez ve Kuller, 2019)

4.1.5. Alzheimer hastalığının nöropatofizyolojisi

AH'nin nöropatolojik ve nörokimyasal özellikleri arasında sinaptik kayıp ve seçici nöron ölümü, spesifik nörotransmitterlerde azalma ve nöronlarda ve hücre dışı boşluklarda anormal protein birikintilerinin varlığı bulunur. Son kanıtlara göre AH'ye katkıda bulunan en önemli üç unsur A β , APOE ve p-tau'dur. (Masters ve ark., 2015)

4.1.5.1. Alzheimer hastalığında amiloid beta

Amiloid plakların ana bileşeni olan A β , amiloid prekürsör protein (APP)'den farklı uzunlukta ve farklı özelliklerde heterojen bir peptid grubuna ayrılır. Çalışmalar göstermektedir ki, A β , APP metabolizmasının normal bir ürünüdür ve bireyin yaşamı boyunca nöronlarda ve aynı zamanda diğer hücre tipleri tarafından yüksek seviyelerde üretilmektedir (Golde ve ark., 2000; Selkoe, 2001). APP'nin nöronal işlevi bilinmemekle birlikte nöronal plastisite ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Çok sayıda kanıt, A β birikiminin ve yüksek bir β -iplik yapısına sahip formlara konformasyon değişikliğinin AH patogenezinin merkezi olduğunu göstermektedir (Holtzman ve ark., 2002). Buna en güçlü kanıt erken başlangıçlı, kalıtsal AH'lilerde yapılan çalışmalardan gelmektedir. Bu hastaların yarısından fazlasında APP, PSEN1 ve PSEN2 genlerinden birinde mutasyonlar belirgindir (Potter ve ark., 2013). Mutasyonların çoğu, özellikle amiloidojenik olan A β (agregasyona daha yatkın olan 42 aminoasitli A β , A β ₁₋₄₂)'nin aşırı üretimiyle sonuçlanır. APP'deki mutasyonların çoğu, APP'nin işlenmesini

değiştirir ve böylece etkilenen hastaların plazmasında $A\beta_{1-42}$ 'nin $A\beta_{1-40}$ 'a oranı artar (Scheuner ve ark., 1996). Ek olarak PSEN1 ve PSEN2'deki mutasyonlar, $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ oranlarının artmasına neden olur (Kumar-Singh ve ark., 2006). Mutasyon tipi ve ilişkili $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ oranı demansın ortalama başlangıç yaşı hakkında fikir vermektedir. $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ oranındaki artış, mutant APP veya PSEN1 yapıları ile transenfekte edilmiş hücrelerin kültür süpernatantlarında ve *in vivo* hayvan modellerinde tespit edilebilmektedir (Jankowsky ve ark., 2003; Scheuner ve ark., 1996). Ek olarak bu hastaların $A\beta$ plaklarında $A\beta_{1-42}$ miktarı $A\beta_{1-40}$ 'a göre daha yüksek bulunmuştur. Üç farkı gen içindeki mutasyonların $A\beta$ ürünlerinin oranında benzer değişikliklere yol açması, AH patogenezinde $A\beta$ 'nin son ortak yol olduğunu düşündürmektedir. Ek olarak APP'de $A\beta$ üretimini azaltan bir mutasyonun geç başlangıçlı AH için dikkate değer koruyucu etkileri olduğunu göstermektedir.

İnsanlarda $A\beta$ 'nin kinetiği; $A\beta$ üretimi, taşınması ve klerensini içermektedir. Yapılan çalışmalarda, yaklaşık 9 saatlik yarı ömrü olan $A\beta$ 'nin sağlıklı bireylerde çok hızlı beyin omurilik sıvısı $A\beta$ kinetiği olduğunu göstermiştir (Bateman ve ark., 2009). Daha yeni bulgular, çok hafif sporadik AH olan hastaların bile, ortalama $A\beta$ üretiminde önemli bir fark olmaksızın, merkezi sinir sistemi (MSS)'nde $A\beta$ klerensini azaldığını göstermektedir. $A\beta$ klerensindeki bu azalmanın altında yatan mekanizmalar belirsizliğini korumakta ancak APOE ve mikroglial hücrelerin ve makrofajların hücre dışı $A\beta$ birikintilerinin yeterince parçalanmamasındaki belirsizlikte rolü olabilir (Mawuenyega ve ark., 2010).

4.1.5.2. Alzheimer hastalığında apolipoprotein e

19. kromozomda bulunan APOE, AH'nin gelişimi için en güçlü genetik risk faktörüdür. APOE, trigliseritten zengin lipoproteinlerin normal katabolizmasında yer alır. APOE'yi, AH patolojisine bağlayan ilk raporlardan biri, AH patolojisinin ayırt edici özellikleri olan amiloid plaklar ve NFY'lerde APOE immünoreaktivitesidir (Namba ve ark., 1991). Ek olarak APOE'nin transkripsiyonel düzenleyici bölgesindeki polimorfizmler AH ile ilişkilendirilmiştir (Artiga ve ark., 1998).

APOE öncelikle astrositler ve mikroglia tarafından üretildiği beyinde yüksek ekspresyona sahiptir. Belirli koşullar altında, nöronlarda bir miktar APOE üretimi

meydana gelebilir (Huang ve ark., 2004). Popölasyon çalışmaları, APOE'nin AH geliştirme riskini artırdığını göstermektedir (Farrer ve ark., 1997) ve ayrıca AH'nin daha erken başlama yaşı ile de ilişkilidir (Khachaturian ve ark., 2004). APOE-ε4 allelinin AH'lilerin yaklaşık %50'sine katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir. İnsan APOE izoformlarının, çeşitli hayvan modellerinde nöritik plak yükünde izoforma bağlı azalmalara ve Aβ birikiminin başlama süresinin gecikmesine neden olduğu gösterilmiştir (Holtzman, 2004; Holtzman ve ark., 1999). Hücre kültürü ve transgenik hayvan kullanan birçok çalışma, APOE-ε4'ün AH'ye katkıda bulunabileceği potansiyel mekanizmaları araştırmıştır. Bu mekanizmalar; APOE-ε4'ün Aβ için patolojik bir şaperon olduğu, böylece Aβ'nın klerensini ve birikimini etkilediği ve nihayetinde plak oluşumuna katkıda bulunması olarak açıklanmıştır (Strittmatter ve ark., 1993). APOE-ε4'ün miktarı doza bağımlı olarak AH olan hastaların beyinlerinde artan Aβ birikintileri yoğunluğu ve serabral amiloid anjiyopatisi ile ilişkili bulunmuştur (Wisniewski ve ark., 1997). APOE'nin biyolojik sıvılarda Aβ'ya bağlı olduğu ve AH olan hastaların beyin dokularında bulunan fibriler Aβ ile ilişkilidir. Sonuç olarak, bu çalışmalar APOE'nin Aβ için bir şaperon görevi görerek AH'ye neden olan veya katkıda bulunan önemli bir faktör olduğunu ve bunun da Aβ'nın temizlenmesini ve birikmesini etkilediğini ve sonuçta plak oluşumuna katkıda bulunduğunu göstermektedir. APOE üretimi ve klirensindeki herhangi bir değişikliğin, çeşitli izoformlarda farklı şekilde etkilenen yönlerin, Aβ birikimi ve AH patogenezi üzerinde büyük bir etkisi olması muhtemeldir. Şimdiye kadar, APOE'nin tau fosforilasyonuna veya lipid metabolizmasına dâhil olduğuna dair kesin bir kanıt bulunamamıştır. (Masters ve ark., 2015)

4.1.5.3. Alzheimer hastalığında tau ve nörofibriler yumaklar

Beyinde tau agregasyonu olan nörodejeneratif hastalıklar olarak tanımlanan tauopatiler, nörodejeneratif hastalıklarda en çok görülen olaydır. Çeşitli tauopatilerde normal ve patofizyolojik tau işleminin anlaşılması, tau'nun hastalığa nasıl katkıda bulunduğunu anlamak ve tau hedefli terapötiklerin geliştirilmesi için önemlidir. Birçok çalışma, toplam tau (t-tau; fosforilasyon durumundan bağımsız olarak tüm tau izoformları) ve fosforile tau (p-tau) düzeylerinin AH'lilerin hem beyinlerinde hem de

beyin omurilik sıvısı (BOS)'nda arttığını göstermiştir (Ryman ve ark., 2014). Tau'nun miktarının artması ve agregasyonunun mekanizmasının ise artan üretimden mi yoksa bozulmuş klerensten mi kaynaklandığı bilinmemektedir. İnsan MSS'ndeki tau'nun yarı ömrü ve kinetiğinin AH'de değişip değişmediği ve ilaçlar tarafından tau'nun nasıl modüle edilmesi gerektiği ile ilgili sorular bugüne kadar cevaplandırılmamıştır. (Masters ve ark., 2015)

AH ayrıca NFT'lerin varlığı ile de karakterize edilir. Bu karışıklıklar, mikrotübül ile ilişkili tau proteininin hiperfosforilasyonunun sonucudur. NFT'ler, nöronların hücre sitoplazmasında ve ayrıca süreçlerinde eşleştirilmiş ve sarmal olarak sarılmış protein filamentlerinin parçalarıdır. Tau proteini bir mikrotübül bağlama alanına sahiptir ve olgunlaşmış ve stabil mikrotübüller oluşturmak için tübül ile birlikte birleşir. Mikrotübülleri stabilize etme ve uygun bir stabil mikrotübül ağı oluşturmak ve onları bir arada tutmak için bitişik mikrotübüller arasında birbirine bağlı köprüler oluşturma yeteneğine sahiptir. Tau proteini, salınan kinazlar ile temas ettiğinde, ortamdaki A β bolluğu nedeniyle hiperfosforile olur. Hiperfosforilasyonu, oligomerleşmesine yol açar. Tübül, parçalanan ve daha sonra NFT'lere toplanan büyük tau filament parçalarına dönüşen tübül alt birimlerinin ayrışması nedeniyle kararsız hale gelir. Bu NFT'ler, nöronal sitoplazmada ve süreçlerde düz, fibriller ve yüksek oranda çözünmeyen yamalar olup, nöronlar ve sinyal işleme arasında anormal iletişim kaybına ve son olarak nöronlarda apoptoza yol açar. Çözünür A β 'nın, NFT üretimi için tau'nun bölünmesini ve fosforilasyonunu kontrol ettiği bildirilmiştir. Ayrıca, tau fosforilasyonu, hücre dışı A β tarafından aktive edilen Glikojen Sentaz Kinaz-3 β (GSK-3 β) ve siklin bağımlı kinaz 5 (CDK5) dâhil olmak üzere birçok kinaz tarafından düzenlenir. GSK-3 β ve CDK5, tau hiperfosforilasyonundan birincil olarak sorumlu kinazlar olmakla birlikte, Protein Kinaz C, Protein Kinaz A, ERK2, bir serin/treonin kinaz, kaspaz 3 ve kaspaz 9 gibi diğer kinazlar da A β tarafından aktive edilirler (Tiwari ve ark., 2019).

4.1.6. Alzheimer hastalığı'nda tanı kriterleri

AH'nin teşhisi için anahtar sınıflandırma Amerikan Ulusal Nörolojik ve İletişimsel Bozukluklar Enstitüsü ve İnme ve Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Bozukluklar Birliği

[National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS) – Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association (ADRDA)] tarafından 1984 yılında belirlenmiş olan sınıflandırmadır. Bu kriterler klinik semptomları nöropatolojiye bağlar ve hasta tanısında olası, muhtemel ve kesin AH etiketlerini kullanır. Orijinal NINCDS-ADRDA kriterleri güncellemeler almış, revizyondan geçirilmiş ve Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı [Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM)] ve Uluslararası Hastalık Sınıflandırması (International Classification of Diseases) da dâhil olmak üzere önemli uluslararası kriterlere dâhil edilmiştir. AH spektrumunun daha önce düşünülenden daha geniş olduğu anlaşıldığı için NINCDC-ADRDA ve DSM kriterleri tekrar gözden geçirilmektedir. AH’nin patolojisinde anahtar rolü olan amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklar yanında serebrovasküler sistemde meydana gelen patolojik değişikliklerin de bu hastalıkta gözlemlenen bilişsel ve fiziksel işlev bozukluğuna katkıda bulunduğuna inanılmaktadır (Reitz ve ark., 2011).

4.1.7. Alzheimer hastalığında risk faktörleri

Risk faktörleri genel olarak hastalığın öncüleridir ve hastalığın etiyolojisi veya sonucu ile ilişkilendirilebilir. Bu faktörler hastalık riskini değerlendirmek için kullanılabilir ancak genellikle teşhis belirteçleri olarak kullanılacak yeterli hassasiyet ve/veya özgüllüğü sağlayamazlar. Demans ve/veya AH ile ilişkili çeşitli risk faktörleri bulunmuştur.

4.1.7.1. Vücut ağırlığı

Vücut yağ dağılımını ve bilişsel işlev bozukluğunu inceleyen bazı çalışmalar düşük vücut kitle indeksi ve düşük vücut ağırlığının, demans ve atrofi gibi beyin değişiklikleri için risk faktörü gibi görüldüğünü göstermiştir. İleriye dönük çalışmalar ise, ağırlık ve bilişsel performans arasında U şeklinde bir ilişki olduğunu ileri sürmektedir. Vücut ağırlığının AH ile ilişkisi, vücut ağırlığının ölçülme yaşına bağlı gibi görünmektedir. Ek olarak demanstan önceki yıllarda ters nedensellik olduğuna dair kanıtlar vardır; yani kilo kaybı, demansın prodromal evresindeki bilişsel bozulmadan kaynaklanır. Ek olarak, vücut ağırlığı ile bilişsel bozulma ve demans

arasındaki ilişki, obezite tarafından yönlendiriliyor gibi görünmektedir. Yapılan bir çalışma, obezitenin AH riskini %59 oranında artırdığını göstermiştir.

4.1.7.2. Plazma lipid seviyeleri

Dislipimedi ile kognitif bozukluk veya AH arasındaki ilişkiyle ilgili çelişkili veriler mevcuttur. Membran kolesterolünün tükenmesinin A β proteinin öncü maddesi olan APP'nin yıkımını engellediğine ve böylece A β ₁₋₄₀ ve A β ₁₋₄₂ birikimini azalttığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Bununla birlikte dislipidemi, artmış AH riski ile ilişkili olan vasküler hastalık riskini artırır.

4.1.7.3 Metabolik sendrom

Birçok çalışma, metabolik sendromun bir bütün olarak ilişkisi ile AH veya kognitif düşüş riski arasındaki ilişkiyi değerlendirmiştir. Bu araştırmaların çoğu, bu sendromun varlığı ile bilişsel işlev bozukluğu arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir.

4.1.7.4. Depresif belirtiler

Depresif belirtiler AH'li hastaların %40-50'sinde görülmektedir. Bazı vaka çalışmaları, depresyon öyküsü olan kişilerde AH riskinde bir artış bulmuş ancak diğer çalışmalar AH'yi bu duygudurum bozukluğu ile bağlayamamıştır. Bu durumlar arasındaki olası ilişkinin altında yatan potansiyel mekanizmalar vasküler yolları ve depresyonun hipokampal oluşum veya hipotalamik-hipofiz-adrenal eksen üzerindeki etkilerini içerebilir.

4.1.7.5. Psikolojik stres

Kemirgen çalışmalarından elde edilen kanıtlar, kronik psikolojik stresin hipokampal yapı gibi beyin morfolojisini değiştirebileceğini ve bunun sonucunda bellek de dâhil olmak üzere beyin fonksiyonu üzerinde zararlı bir etki yapabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla, kronik psikolojik stres AH riskini artırabilir.

4.1.7.6. Tip 2 diabetes mellitus

AH ve Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM) hastalığı arasında bağlantı olduğuna dair çok fazla kanıt literatürde sunulmuştur. AH ve T2DM arasındaki ilişki 1.3. başlığı altında ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

4.2. Diabetes Mellitus Hastalığı

4.2.1. Diabetes mellitus hastalığı hakkında genel bilgi

Diabetes Mellitus (DM) insülin üretiminde, etkinliğinde ya da her ikisinde birden eksiklik olması sebebiyle kan glukoz düzeyinin yükselmesi ile karakterize kronik, metabolik bir hastalıktır. Uluslararası Diyabet Federasyonu (International Diabetes Federation)'na göre T2DM, tüm diyabet vakalarının %90'ını oluşturmakla birlikte dünya çapında yaklaşık 415 milyon insanı etkilemektedir. Gelişmiş ülkelerde; obezite, sağlıksız beslenme, fiziksel hareketsizlik ve ortalama yaşam süresinin artması beklendiğinden 2040'ta bu sayının 642 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir. Tedavi edilmeyen veya kontrol altına alınamamış T2DM makrovasküler, mikrovasküler ve nöropatik komplikasyonlar ile ilişkilidir ve kardiyovasküler hastalıkların, böbrek yetmezliğinin ve görme kaybının önde gelen nedenidir (International Diabetes Federation, 2021).

4.2.2. Diabetes mellitus'un sınıflandırılması

Diabetes mellitus aşağıdaki genel kategorilere ayrılabilir (American Diabetes Association, 2018):

1. Tip 1 DM (T1DM)
2. Tip 2 DM (T2DM)
3. Gestasyonel DM
4. Diğer nedenlerden dolayı gelişen spesifik DM tipleri

T1DM ve T2DM yukarıdaki kategorilerden en sık rastlanan diyabet tipleridir. Beta hücrelerin otoimmün aracılı hasarlanması sebebiyle insülinin az ya da hiç üretilmemesine bağlı olarak gelişen hiperglisemi ile karakterize T1DM'nin aksine;

T2DM’de hiperglisemi, başlangıçta insülinin azlığı ya da yokluğundan ziyade periferik dokularda gelişen insülin rezistansının eşlik ettiği hiperinsülinemi ile birlikte gelişir (Farris ve ark., 2003). İnsülinin hipersekresyonu (Polonsky ve ark., 1996) ve azalmış insülin klerensi (Kottrönen ve ark., 2008), insülinin kullanılamamasını telafi edici olarak devreye girmesine rağmen mevcut insülin rezistansı sebebiyle yine organizmayı yüksek insülin ve glukoz seviyelerinin olduğu kısır döngüye sürükler. Hastalığın başlangıcında olmamasına rağmen T2DM’nin ilerlemiş safhalarında hastalarda, zamanla aşırı ve düzensiz insülin sekresyonu kaynaklı beta hücre kütlelerinde ve fonksiyonunda da azalma meydana gelir (Del Prato ve Marchetti, 2004) ve sonuçta bu hastaların kan glukoz seviyelerini kontrol etmek için ekzojen insülin veya insülin analoglarının terapötik kullanımını gerektirebilecek yetersiz pankreas insülin sekresyonuna yol açar.

İnsülin direncinin nedenleri henüz tam olarak belirlenmemiş olsa da sonuçları oldukça geniş kapsamlıdır. İnsülin direncinin ilişkili bulunduğu birçok patoloji yanında hipokampüsteki insülin direnci, kognitif disfonksiyon ve demans ile ilişkili bulunmaktadır (Biessels ve Reagan, 2015). Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında hem vasküler demans hem AH’yi kapsayan demansın oluşma riski T2DM’li hastalarda %73 daha fazladır (Koekkoek ve ark., 2015). Bilişsel gerileme süreci insülin direncinin prediyabetik dönemlerinde başlıyor gözükmemektedir (Biessels ve Reagan, 2015) ve bu durum insülin duyarlılığı ve demans arasındaki bağlantıyı kanıtlar niteliktedir (Ritchie Williamson ve ark., 2012).

T1DM ve T2DM klinik açıdan hastalığın ilerlemesinin önemli ölçüde değişebileceği heterojen hastalıklardır. Sınıflandırma tedavinin belirlenmesinde önemlidir ancak bazı kişiler tanı anında T1DM veya T2DM olduğu şeklinde açık bir şekilde sınıflandırılmaz. Her ne kadar başlangıçta diyabetin tipinin tayinini ayırt etmede zorluklar ortaya çıksa da doğru tanı zamanla daha belirgin hale gelir. Hem T1DM hem T2DM’de çeşitli genetik ve çevresel faktörler, ilerleyici pankreatik β hücre kitlesi kaybına ve/veya klinik olarak hiperglisemi gibi tezahür eden fonksiyonlara neden olabilir. Hiperglisemi meydana geldiğinde, tüm diyabet formları olan hastalar aynı kronik komplikasyonları geliştirme riski taşır, ancak ilerleme oranları değişebilir. (American Diabetes Association, 2018)

4.2.3. Diabetes mellitus'un tanısı

Diyabet tanısı açlık kan glukozu (AKG), 2-saatlik kan glukozu, hemoglobin A1c (HbA1c) tayini ve oral glukoz tolerans testi (OGTT) ile konulabilir. Aynı testler diyabeti hem taramak hem de teşhis etmek için kullanılır. Diyabet görünüşte düşük riskli bireylerde, glukoz testi yapılmış olan bireylerde, semptomatik hastalarda ve diyabet şüphesi nedeni ile test edilen yüksek riskli hastalar gibi klinik senaryolar yelpazesi boyunca herhangi bir yerde tanımlanabilir. Ayrıca aynı testler prediyabetli bireyleri de tespit edebilmektedir. (American Diabetes Association, 2015)

4.3. Alzheimer Hastalığı ve Tip 2 Diabetes Mellitus İlişkisi

AH ve T2DM'nin sıklığı yaş ilerledikçe artmakla beraber birtakım klinik ve epidemiyolojik çalışmalara göre birinin gelişimi diğerinin riskini de artırmaktadır (Sridhar ve ark., 2015). T2DM ve AH arasındaki bağlantıyı destekleyen epidemiyolojik veriler ışığında, ikincisinin görülme sıklığının artması, muhtemelen yalnızca nüfusun yaşlanmasının değil, aynı zamanda diyabetin yaygınlaşmasının bir sonucudur (Prince ve ark., 2013). Yaklaşık 193 milyon diyabetli hastanın teşhis edilmediği ve hastalığın uzun vadeli hasarının farkında olunmadığı tahmin edilmektedir (International Diabetes Federation, 2021).

Araştırmaların her iki hastalıkla da aynı anda baş edebilecek yeni çok hedefli tedavilere yönelmesi ile muhtemelen, gelecekte T2DM'nin erken evrelerinde tedaviye başlanması ile kümülatif nöropatolojik olayların sonuçlarını zayıflatmak veya hatta önlemek mümkün olabilecektir (de Matos ve ark., 2018).

Yüksek yağlı hiperkalorik diyetler, azalmış fiziksel aktivite ve/veya genetik yatkınlık ile güçlendirilmiş T2DM; kalp hastalığı ve koroner olaylar olasılığını artıran yüksek kan basıncı, hiperglisemi, insülin rezistansı, dislipidemi ve abdominal obezite ile karakterizedir (Ballantyne ve ark., 2008). İlginç bir şekilde, bu özelliklerin aynı zamanda hafif kognitif bozukluktan AH'ye ilerleme riski taşıyan hastalar için de önemli göstergeler olduğu bildirilmektedir (Ng ve ark., 2016). Görünüşe göre bu olaylar yalnızca insülin rezistansına bağlı değildir, aynı zamanda AH'li kişilerde serebral mikrovasküler yapılarındaki değişiklikler ve vasküler endotel disfonksiyon ile de ilişkilidir (Hishikawa ve ark., 2015). Kısacası T2DM'li hastalarda kognitif

bozukluğun göstergesi olarak serebrovasküler hasarın ortaya çıkabileceği düşünülmektedir ve bu durum T2DM ve AH bulunan veya indüklenen hayvan modelleri ile desteklenmektedir (Carvalho ve ark., 2013; Humpel ve Marksteiner, 2005).

4.3.1. Amiloidogenezis

Bir düzineden fazla ilişkisiz insan proteini, sitotoksik amiloid fibrilleri oluşturmak için *in vivo* anormal birleşmeye uğrayabilir (Sacchettini ve Kelly, 2002). Bu proteinlerden ikisi ki bunlar proislet amiloid polipeptid (proIAPP) ve APP sırasıyla T2DM ve AH'de yanlış protein katlanması süreçlerinde ön sıralarda yer almaktadırlar. T2DM'li hastaların çoğunda bulunan pankreatik amiloid depolarının ana bileşenleri olan islet amiloid polipeptit (IAPP) veya amilin, IAPP'nin prekürsör proteini olan proIAPP'nde meydana gelen posttranslasyonel değişiklikler kaynaklı oluşur (Westermarck ve ark., 1987). Fizyolojik olarak, IAPP insülin sekresyonunda modülatör olan ve glikojen sentezi ve glukagon sekresyonuna da karışan beta hücreleri üzerine otokrin ve parakrin bir etki yapar (Westermarck ve ark., 2011).

Daha önce de bahsedildiği gibi T2DM'nin erken safhaları hiperglisemi ve periferik insülin direncine ve bozulmuş insülin klirensine kompanse edici olarak hiperinsülinemi ile karakterizedir. IAPP, pankreatik beta hücrelerinden insülin ile ko-sekrete salgılandığı için; insülin hipersekresyonu sitotoksik ekstraselüler amiloid depolarının oluşumuyla pankreastaki IAPP birikimine yol açar ve sonuç olarak beta hücresi disfonksiyonuna ve ölümüne sebep olur (Huang ve ark., 2007). Nitekim, proIAPP'nin, IAPP'ye tamamlanmamış N-terminal enzimatik bölünmesinin, IAPP amiloid oluşumu için tetikleyici bir faktör olduğu düşünülmektedir bu da ilk hücre içi agregatların kısmi olarak proIAPP'den oluştuğunu göstermektedir. Sonuçta oluşan sitotoksik agregatlar ile pankreas beta hücrelerinin apoptozu ve T1DM hastalarında tipik olarak görülen hipoinsülinemik durum meydana gelir. Ayrıca IAPP oligomerleri, kalpte ve böbreklerde de birikir; bu da diyabetik kalp yetmezliğini hızlandırır (Despa ve ark., 2012).

IAPP'nin kan beyin bariyeri (KBB)'ni geçtiği tespit edildiğinden beri, çok sayıda çalışma IAPP'nin beyindeki etkisine ve T2DM'nin erken safhalarında aşırı

üretilmesinin beyindeki olası sonuçlarına odaklandı. *In vitro* çalışmalarda, insan IAPP'sinin çözünür oligomerlerinin Ca^{++} homeostazını etkileyerek (Kawahara ve ark., 2000) ve hücre membranını bozarak (Janson ve ark., 1999), pankreatik ve nöronal hücre hatlarında sitotoksik olduğu gösterilmiştir. T2DM sitotoksik IAPP oligomer oluşumunu tetiklemekte ve artmış IAPP seviyeleri, diyabetli hastalarda AD oluşumuna duyarlılığı açıklamaktadır (Leibson ve ark., 1997). Yakın tarihli bir çalışmada, AH'li T2DM hastalarının beyinde nöronların içinde IAPP depoları olduğu gösterilmiştir. Bu etkiler, insan IAPP'sinin eksprese edildiği veya agrege insan IAPP enjeksiyonu yapılan farelerde gözlenmiştir. Böylece dolaşımdaki IAPP'nin yükselmesi normal olmayan inflamatuvar cevap ve oksidatif hasarla indüklenen nöronal hasar ile direkt olarak koreledir (Verma ve ark., 2016). Fakat bu noktada intraselüler IAPP'nin altında yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Ayrıca, perifer kaynaklı IAPP ve hipokampal A β 'nin aminoasid sekansları arasında %25 benzerlik bulunmaktadır. T2DM'li hastalarda IAPP'nin kan dolaşımı ile serebrovasküler yapılara ve beyin parenkimasına geçtiği ve diyabetik beyin hasarı ve nörodejenerasyona sebep olduğu gösterilmiştir.

T2DM'de de perifer kaynaklı IAPP ve hipokampal A β arasında benzer bir fenomen ortaya çıkabilir. Aslında, bu peptidler kendi kendine montaj için gerekli olan bölgelerde aminoasid dizisi kimliğinin yaklaşık %25'ini paylaşır. Dolaşımdaki IAPP'nin T2DM hastalarında diyabetik beyin hasarına ve nörodejenerasyona neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca AH'li hastaların beyinde ve kan damarı duvarlarında amiloid birikintileri oluşturur ve aynı anda beyinde A β eliminasyonunun başarısızlığını ve A β destekli nöronal disfonksiyonu artırır. Bu veriler de T2DM ve AH arasında moleküler bir bağlantı oluşturduğunu ve her iki duruma karşı da tedavi edici ve önleyici stratejiler olarak yeni çoklu hedefli tedavilerin geliştirilmesini kuvvetle teşvik ettiğini göstermektedir. (de Matos ve ark., 2018)

AH'nin amiloid kaskad hipotezine göre aşamalı ve ilerleyici nöronal kayıp, beyin parenkimasındaki A β agregatlarının birikimi ile doğrudan ilişkilidir; bu agregatlar da dağılabilir nörotoksik A β oligomerlerinin oluşumunda yüzey katalizörleri olarak kabul edilir (Karran ve ark., 2011). Fibrilojenik A β peptitleri, APP'nin beta-sekretaz (β -sekretaz) ve gama-sekretaz (γ -sekretaz) enzimleri ile ardışık proteolitik bölünmesinden sonra oluşur (Dias ve Rauter, 2015). Bu süreç ile oluşan A β_{1-40} ve A β_{1-42}

42, en yaygın A β izoformlarıdır. A β ₁₋₄₀ baskın olanken, A β ₁₋₄₂ daha yüksek agrege olma eğilimine sahiptir ve çoğu AH'li beyinlerdeki A β depolarında bulunmuştur (Welander ve ark., 2009). Ayrıca bozulmuş sinaptik plastisite ve hafıza kaybı ile ilişkili patolojik olaylarda; çözünebilir A β ₁₋₄₂ oligomerleri, A β fibrillerinden daha nörotoksik gözükmemektedir (Shankar ve ark., 2008).

APP bölücü enzimlerinin ekspresyonu ve aktivitesindeki değişikliklerin de ileri dönem AH'de A β patolojisi ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır. Örneğin, β -sekretaz ekspresyonunun sporadik AH'li hastaların beyin korteksinde upregüle olduğu (Fukumoto ve ark., 2002) ve bu artışı T2DM'nin karakteristik özelliklerinden olan oksidatif stres, azalmış endotelial nitrik oksit (NO), hipoksi ve iskemik hasarın tetiklediğine dair veriler vardır (Austin ve ark., 2013; Ko ve ark., 2015; Tong ve ark., 2005).

4.3.2. Genetik çalışmalar-apolipoprotein e- ϵ 4

1990'ların başında APOE- ϵ 4, sporadik AH için en önemli genetik risk faktörü olarak tanımlandı ve amiloid kaskad hipotezi ile kıyaslandığında, beyindeki A β birikiminin APOE- ϵ 4 ilişkili bir sonuç olduğu kabul edildi (Morris ve ark., 2014). APOE- ϵ 4 genotipi, insülin rezistansı ile de ilişkilidir (Ong ve ark., 2014) ve ilginç bir şekilde diyabetik olmayan APOE- ϵ 4 taşıyıcıları ile kıyaslandığında, AH gelişme riskinin çok yüksek olduğu APOE- ϵ 4 taşıyıcıları arasında T2DM ve AH arasındaki ilişki çok önemlidir (Peila ve ark., 2002). Çalışmalarda, APOE- ϵ 4 genotipinin disfonksiyonel A β üretimi, agregasyonu ve klerensi sebebiyle, yaşa bağımlı hipokampal atrofi ve hafıza bozukluklarını hızlandırdığı gösterilmiştir (Peila ve ark., 2002). Merkezi sinir sisteminde APOE diğerlerinin yanı sıra, lipit taşınması, glukoz metabolizması ve nöronal sinyalleşmenin düzenlenmesinde rol oynayan astrositler tarafından eksprese edilir. Ayrıca A β 'ya bağlanabilir, esas olarak APOE reseptörü aracılı alım ve bozulmayı teşvik ederek A β 'nın toksisitesini azaltabilir. Bununla birlikte etkili A β bağlanması ve alımı sadece APOE- ϵ 2 ve APOE- ϵ 3 izoformları tarafından gerçekleştirilir. A β ile güçlü bir şekilde etkileşime girmeyen APOE- ϵ 4 beyin A β birikintilerinin oluşumunu katalize ederek patolojik bir şaperon olarak daha etkilidir. APOE- ϵ 4 taşıyıcıları beyin omurilik sıvısında düşük A β seviyelerine sahiptir. APP

ayırma enzimlerinin modifiye edilmiş ekspresyonunun veya aktivitesinin, geç başlangıçlı AH'de A β potolojisinin bir nedeni olduğuna inanılmaktadır. Örneğin β -sekretaz ekspresyonu, sporadik AH hastalarının beyin korteksinde upregüle olur ve oksidatif stres ve endotelial nitrik oksit sentaz (NOS), hipoksi ve iskemik hasar kaynaklı azalmış endotel nitrik oksid ile tetiklenebilir. Dahası son veriler, β -sekretaz aşırı ekspresyonunun, KBB'ye sunulduğunu ve serebral amiloid anjiyopatinin gelişiminde kritik bir rol oynadığını gösteriyor. İlginç bir şekilde, aşırı üretilen A β , β -sekretaz ekspresyonunu kendisi uyarabilir ve aslında, A β birikiminin hem KBB işlev bozukluğunun hem de bunun sonucu olabileceği varsayılmaktadır, bu AH'nin ve diğer nörodejeneratif hastalıkların ayırt edici özelliğidir. β -sekretaz'dan farklı olarak, γ -sekretaz'ın katalitik çekirdeğini oluşturan PSEN1 ve PSEN2 proteinlerindeki mutasyonlar, çok nadir görülen erken ailesel AH'ye bağlanmıştır. Bu mutasyonlar, daha uzun ve daha fazla agregasyon eğilimli A β ₁₋₄₂ peptidlerinin oluşmasına doğru γ -sekretaz klevaj aktivitesini desteklemektedir. APP'nin kendisindeki mutasyonlar da tüm AH vakalarının sadece %0,5'ini oluşturmalarına rağmen ortaya çıkabilir. Bunlar hem sporadik hem ailesel AH ile ilişkilidir ve β -sekretaz yarılama bölgesi yakınındaki APP mutasyonları genel olarak A β üretimini artırırken, γ -sekretaz bölgesi etrafındaki mutasyonlar da A β ₁₋₄₂ ile A β ₁₋₄₀ arasındaki nispi oranın artmasına katkıda bulunur. (de Matos ve ark., 2018)

4.3.3. Hiperfosforile tau ve nörofibriler yumaklar

Ayrıca tau patolojisi de hiperglisemi tarafından uyarıldığı gösterilmiştir (Kim ve ark., 2013). T2DM'li farelerin beyinlerinde, yüksek glukoz seviyelerinin tau'nun kaspaz-3 bağımlı proteolitik parçalanmasının, A β 'ninkine benzer şekilde tetikleyebileceğini gösteren *in vitro* deneylerle uyum içinde anormal bir biçimde arttığı bulunmuştur (de Matos ve ark., 2018).

Tau, sinir hücrelerinde eksprese edilen mikrotübül ile ilişkili sitozolik bir proteindir. Normal fizyolojik koşullar altında, tau, anterograd aksonal taşıma için önemli olan mikrotübül birleşimini ve stabilizasyonu destekler. AH ve birincil tauopatiler gibi belirli patolojik durumlarda, tau proteinleri, esas olarak fosforilasyon yoluyla, hiperfosforile edilmiş tau proteinlerinin anormal kümeleri ile sonuçlanan

modifikasyonlara uğrar. Fizyolojik ve patolojik koşullar altında, tau fosforilasyonu, GSK-3 β , CDK5 ve mitojenle aktive olan protein kinaz/hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (MAPK/ERK) gibi birkaç kinaz tarafından düzenlenir.

Tau fosforilasyonu ve insülin aktivasyonu ile insülin sinyal yolu bileşenlerinin seviyeleri arasında önemli bir negatif korelasyon gözlenmiştir. Beyinde insülin, insülin reseptörüne bağlandığında, tirozin kinaz insülin reseptörünün hızlı otofosforilasyonu gerçekleşir ve bu reseptörün aktivasyonuna yol açar. Aktive edildiğinde, insülin reseptörü, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) için bir bağlanma bölgesi gösteren insülin reseptör substratı-1 (IRS-1) dâhil olmak üzere birçok farklı IRS'i alır ve fosforile eder. PI3K'nın aktivasyonu, sırasıyla, önde gelen bir tau kinaz olan GSK-3 β 'yi hedefleyen Thr308 fosforilasyonu yoluyla mitojenle aktive olan protein kinazı (MAPK) ve protein kinaz B (Akt)'yi aktive eder. GSK-3 β 'nin Akt sinyali ile fosforilasyonu, insülin sinyali bozulduğunda veya olmadığında GSK-3 β 'nin fosforilasyonu gerçekleşmediği için GSK-3 β aracılı tau hiperfosforilasyonu gerçekleşir. Ayrıca, tau agregasyonunun da beyindeki insülin sinyalini bozduğu bildirilmiştir. Tau hiperfosforilasyonda meydana gelen bu değişikliğin, beyinde insülin sinyallemesini bozduğu, bunun da hastalık durumunda, kümelenmiş taunun, bilişsel gerileme ile sonuçlanan işlev bozukluğuna daha fazla katkıda bulunabileceği anlamına gelebileceği ileri sürülmektedir. Bununla birlikte, insülin sinyalizasyonu üzerine tau patolojisinin etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır ve bu konuda daha fazla çalışma gerekmektedir (Hobday & Parmar, 2021).

4.3.4. Oksidatif stres ve nöroinflamasyon

Oksidatif stres ve nöroinflamasyon da AH'de birarada bulunan faktörlerdendir (Yao ve ark., 2004) ve her ikisi de serebrovasküler hasarın göstergelerindendir (Tripathy ve ark., 2010). T2DM'de de periferik insülin rezistansı hiperglisemiye öncülük eder ve bu da doku hasarı ve oksidatif stresin bir nedenidir (Chung ve ark., 2003). İlk olarak, yüksek kan glukoz seviyesi protein, lipid ve nükleik asitlerin enzimatik olmayan glikasyonunu kolaylaştırır; sonraki basamakta ise gelişmiş glikasyon son ürünleri (advanced-glycation end-products, AGE), retinopati, nefropati, nöropati gibi yaygın diyabetik komplikasyonların gelişimine yol açar (Singh ve ark., 2014). Bu bileşenler

AH bulunan hastaların beyinlerinde yüksek düzeyde eksprese edilen kendilerine ait gelişmiş glikasyon son ürünleri reseptörlerine (receptors for advanced-glycation end-products, RAGE) bağlanarak inflamatuvar cevap mekanizmasını ve reaktif oksijen ürünleri (reactive oxygen species, ROS)'nin üretimini tetiklerler (Stirban ve ark., 2014). Ayrıca, kullanılmamış glukoz fazlalığı, beraberinde onun indirgenmiş formu olan antioksidan enzim sisteminin kofaktörü hücresel nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH)'ı da azaltarak, poliol yolağında aldoz redüktaz tarafından ağırlıklı olarak sorbitole dönüştürülür (Chung ve ark., 2003). Oksidasyon da endotelyumda lipid peroksidasyonunu ve NO inaktivasyonunu indükler, bu da endotelial hücre hasarına ve azalmış endotelium bağımlı vazodilatasyona sebep olur ve tüm bunlar da kronik hipertansiyona öncülük eder (Kesavulu ve ark., 2000). İnflamasyon ve endotel hasara katkıda bulunan fosfolipaz A2 (PLA2) ve lipooksijenaz (LOX) gibi lipid metabolizmasında yer alan oksidatif enzimler de ve her ikisi de DM ve AH hastalarında artmış bulunmuştur (Sun ve ark., 2007). Kısacası; hiperglisemi, dislipidemi ve insülin rezistansı ile ilişkili patofizyolojik değişikliklerden bazıları olan oksidatif stres, hipertansiyon ve kronik enflamasyon T2DM hastalarında tipik olarak bulunmaktadır ve bir şekilde bunlar endotelial disfonksiyona katkıda bulunmaktadırlar. Bu da beyinde kan akımının azalması ya da kesilmesi ile ilişkilietmektedir vasküler kognitif hasara öncülük eder (Raffaitin ve ark., 2009). Uzun süreli hipoperfüzyon nöronal ve nöroglial iskemik hasara sebep olur ve bu da A β 'nin aşırı derecede üretilmesini ve agregasyonunu hızlandırır (de la Torre, 2000). Vasküler demans ve AH'nin bir kombinasyonu olarak karma demans muhtemelen yaşın artmasıyla daha sık görülür, bu nedenle bu iki demans türü arasında neden-sonuç ilişkisini desteklemektedir. Bununla birlikte, AH genellikle oksidatif ve inflamatuvar hasara, serebrovasküler hasara, KBB fonksiyon bozukluğuna ve nöronal ölüme katkıda bulunan hiperfosforile tau içeren nörofibriler yumaklar ve A β içeren ekstraselüler amiloid plakları içeren diğer önemli patolojik özellikler ile karakterizedir (de Matos ve ark., 2018).

4.3.5. AChE

AH hastalarının beyinlerinden elde edilen anatomik bulgular, kolinerjik nöronları içeren çekirdeklerin AD'deki rolünü düşündüren hasarları göstermiştir. Daha önceki çalışmalar, özellikle nükleus bazaliste meydana gelen ciddi hasarı olan AH hastalarında nükleus bazalis ve hipokampusun etkilendiğini göstermiştir. Beynin yüksek zihinsel işlevlerden sorumlu alanlarındaki kolinerjik aktivitenin kaybı, AH'nin patogeneze katkıda bulunur. Daha önce de bahsedildiği üzere hücre dışı senil plaklar, hücre içi nörofibriler yumaklar ve lokalize A β oluşumu ve birikimi AH'nin ayırt edici özellikleridir. AH hastalarının beyinlerinde birikmiş bulunan senil plaklar, hücre dışı A β peptit birikintilerini içerir. MSS'ndeki nörotransmitter asetilkolinin hidrolizinden sorumlu bir enzim olan AChE enziminin; A β peptidin, A β fibrilleri içinde tutulmasını tetikleyen agregasyon eğilimli bir molekül olduğu (Alvarez ve ark., 1995) ve AH'li hastaların hipokampusundaki A β depolarında A β ile birlikte yer aldığı gösterilmiştir (Morán ve ark., 1993). AChE C-terminus ayrılmasından kaynaklanan küçük peptidlerin, A β 'nın karşılaştırılabilir bölgesine önemli bir sekans homolojisine sahip olduğu ve kendiliğinden amiloid fibrilleri ile birleştirildiği gösterilmiştir (de Matos ve ark., 2018). Ayrıca, AChE içeren A β agregatlarının, içermeyenlere göre daha nörotoksik olduğu bulunmuştur (Dinamarca ve ark., 2010).

AH dışında T2DM'de de yüksek AChE ve BuChE seviyeleri gözlenir. Langerhans adacıklarında AChE aktivitesi, sıçan pankreasındaki ekzokrin dokuya göre bir daha yüksek bulunmuştur ve aktivitedeki bu farklılık, sağlıklı, kontrol sıçanlarının yanı sıra streptozotosin indüklü diyabetik sıçanlarda da gözlenmiştir. Ek olarak, diyabetik sıçanlardaki adacıklardaki AChE aktivitesi, kontrol sıçanlarındaki adacıklardan yaklaşık %30-40 daha yüksek bulunmuştur (Mushtaq ve ark., 2014).

4.3.6. Periferik ve serebral insülin rezistansı

Hipokampüsteki disfonksiyonel insülin aktivitesinin kognitif zayıflama ile olan ilişkisi de T2DM ve AH arasındaki epidemiyolojik ilişki açısından önemlidir (Biessels ve Reagan, 2015). AH'li hastalarda yapılan postmortem çalışmalar insülin reseptörlerinde downregülasyon ve insülin duyarlılığında azalma da dâhil olmak üzere insülin direnci olarak tanımlanabilen insülin sinyalizasyonunda disfonksiyon

olduğunu sağlam kanıtlarla göstermiştir (Convit ve ark., 2003). Ayrıca yaşa bağlı insülin direnci, KBB permeabilitesinin artmasına yol açan nörodejeneratif sürecin erken patolojik bir özelliği olan kronik nöroenflamasyonla ilişkilidir (Adzovic ve ark., 2015). İnsülin direnci ve anormal insülin seviyeleri genellikle beraber ilerler ve hiperinsülinemili kişilerde AH'nin oluşma ihtimali yüksek bulunmuştur ve diyabet olmayanlarla kıyaslandığında bu kişilerde kognisyonu daha şiddetli bir şekilde bozmaktadır (Luchsinger ve ark., 2004). Bu nedenle, periferik insülin direncinin ve anormal insülin seviyelerinin beyinde nasıl sürdüğünü ve sonunda AH'nin başlamasına katkıda bulunup bulunmadığını ve hangi mekanizmaların dâhil olduğunu anlamak çok önemlidir (de Matos ve ark., 2018).

Periferde insülinin etkisi ve glukoz homeostazisi sıkı sıkıya bağlı olmakla birlikte, MSS'de bu iki olgunun birbirinden bağımsız olduğu düşünülmektedir (Hasselbalch ve ark., 1999). İnsülinin MSS'de çok sayıda etkisi olduğu bildirilmektedir. Bunlardan bazıları oksijen ve glukoz yokluğunda nöronal sağkalımın sağlanması, sinaptik sürdürüm, dendritik oluşum, öğrenme ve hafızanın stimülasyonudur; sonuçta kognitif fonksiyonların korunması için beyin insülin sinyalizasyonu önemlidir (Banks ve ark., 2012). İnsülin reseptörleri hipokampus de dâhil olmak üzere beynin her yerinde dağılmıştır ve etkileri yukarıda bahsedilen nöronal süreçlerin de ötesine geçer (Doré ve ark., 1997). Gıda alımının kontrolü, doyumluk, vücut ağırlığı gibi çevresel ve periferik uyarılara karşı MSS cevaplarında etkili olur (Ahima ve Antwi, 2008; Brünig ve ark., 2000).

SSS'de insülin üretimi çok düşük düzeyde gerçekleşmektedir (Devaskar ve ark., 1994), insülin üretimi temel olarak periferde pankreastan sağlanmaktadır. Bunun yanında sempatik ve parasempatik sinir sistemlerinin, hipotalamik monoaminlerinin salınması yoluyla periferik insülin sekresyonunu düzenlediğine ve indüklenen hipotalamik lezyonların, periferik insülin direncine yol açtığını ve bu nedenle beyinde kökenlenebileceğini gösteren önemli kanıtlar vardır (de Matos ve ark., 2018). Periferde üretilen insülin de KBB'den reseptör aracılığıyla beyne geçmektedir. Bu transport sistemin fizyolojik durumlara bağlı olarak pozitif ya da negatif olarak düzenlendiği bilinmektedir. Streptozotosin ile T1DM indüklenmesi ile KBB'den beyne ve serebrospinal sıvıya (SPS) insülin geçişinde artış olduğu; tek doz glukoz enjeksiyonu ile oluşturulan hiperglisemik durumda ise geçişin negatif yönde

etkilendiği bildirilmektedir (Banks ve ark., 1997). İlk durumda pankreastan insülin salınımında azalma olmasına rağmen, ikinci durumda plazma insülin seviyeleri yükselmiştir. Ayrıca T2DM için risk faktörü olduğu bilinen obeziteyi indükleyen yüksek yağlı diyetle beslenmede de KBB'den insülin geçişi azalmıştır (Kaiyala ve ark., 2000). Yüksek glukoz ve insulin plazma seviyelerinin bir araya gelmesiyle beyinde azalmış insülin alımına neden olan mekanizma henüz açıklığa kavuşturulmamıştır, ancak bu fizyolojik koşullar altında beyin endotel hücreleri için insülin afinitesinin bir şekilde önemli ölçüde azaldığı görülmektedir. Bununla birlikte, yukarıdaki veriler T2DM'de beyne taşınan insülin miktarının azalmasının nörodejenerasyon ve bilişsel düşüşün tetikleyici bir faktörü olabileceğini göstermektedir (de Matos ve ark., 2018). AH'li hastalarda sağlıklı yetişkinlere kıyasla plazma insülin seviyesinin daha yüksek, serebrospinal sıvıdaki insülin seviyesinin ise daha düşük olması bunu destekler niteliktedir (Craft ve ark., 1998).

4.3.7. Serebral insülin eksikliği – glukojen sentaz kinaz-3 β

Beyin insülin seviyelerinin azalması T2DM'yi doğrudan AH'ye bağlayan amiloidojenik olayların gerçekleşmesi için ortam oluşturmaktadır. Aslında insülin eksikliği, GSK-3 β 'yı kalıcı olarak aktive ederek yapıcı A β üretimine izin verir (Phiel ve ark., 2003). T2DM oluşturulmuş sıçan modellerinde GSK-3 β 'nın yüksek seviyede eksprese edilmesi ve aktive olması insülinin glukoz kullanımını ve glukojen sentezini aktive edebilme yeteneğinin bozulması ile ilişkili bulunmuştur (Kaidanovich ve Eldar-Finkelman, 2002). GSK-3 β 'nın yüksek oranda eksprese edilmesi yalnızca A β üretimi ve nöronal hasarla değil, ayrıca uzun süreli sinaptik depresyon süreci (Peineau ve ark., 2007) ve tau hiperfosforilasyonu ile (Li ve ark., 2006) de ilişkilidir. Dahası, β -sekretaz ekspresyonunun insülin yokluğunda upregüle olduğuna dair kanıtlar vardır ve bu da beyinde A β 'nın ekstraselüler birikimini artırır (Devi ve ark., 2012). Buna karşılık A β oligomerleri daha sonra bozulmuş beyin insülin sinyalleşmesi ve insülin direnci ile insülin reseptörlerinin nöronal down-regülasyonunu uyarır, böylece bilişsel gerileme sürecini yoğunlaştırır. Bu etki esasen nöroprotektif etkilerini güçlendiren insülin kendisi tarafından ters çevrilmektedir (de Matos ve ark., 2018).

4.3.8. Oksidatif hasar – insülin ilişkisi

Zucker diyabetik şişman (Zucker diabetic fatty) sıçanlarda insülin eksikliğinin yanında, azalmış adenozin trifosfat (ATP) sentezi, yükselmiş ROS seviyesi, lipid ve protein peroksidasyonu gözlenmiştir (Raza ve ark., 2015). Dahası obezite ve periferik insülin rezistansı ile benzer şekilde yüksek yağlı diyet de hipokampal oksidatif stresi ve mitokondriyal homeostasisdeki bozulmayı devamında da kognitif hasar ve hafıza kaybını teşvik etmektedir (Treviño ve ark., 2015). Bununla birlikte, bu hipotez periferik dokularda oksidatif stresin neden olduğu insülin sinyalizasyon yollarının azalmış insülin kaynaklı stimülasyonunun azaltılması ile güçlendirilmiş olmasına rağmen, insülin direncinin oksidatif stres için bir neden olabileceği düşünülmektedir (de la Monte, 2012). Dolayısı ile iki olay arasında çift yönlü bir ilişki olabilmektedir.

Glukoz metabolizmasındaki değişim, sırasıyla oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyonu tetikleyerek AH fizyopatolojisinde kritik bir rol oynamaktadır (Chen ve Zhong, 2013). Yapılan bir araştırmada, periferik insülin rezistansı ile bölgesel serebral glukoz metabolizmasının azalması ve hem kısa süreli hem uzun süreli hafızayı kötüleştirilmesi ile ilişkili bulunmuştur (Willette ve ark., 2015). Ayrıca glukoz, beyindeki birinci enerji kaynağıdır ve hafıza geliştirici etkisi açıkça bulunmaktadır (Messier ve Gagnon, 1996). Hipergliseminin sonucu olarak spontan olarak meydana gelen KBB’de glukoz transporter-1 (GLUT-1)’in downregüle olması, AH’ye sahip hastalarda gösterilmiştir (Mooradian ve ark., 1997) ve bu sadece KBB’nin bozulmasına ve erken serebral mikrovasküler dejenerasyona neden olmakla kalmaz, aynı zamanda beyinde ATP oluşumunu bozan ve ROS üretimini uyaran glukoz taşınmasının da bozulmasına sebep olur. Ayrıca yukarıda da bahsedildiği gibi, insülin eksikliği ile de artan β -sekretaz aktivitesi, nöronal glukoz oksidasyonunu bozar ve bazal oksijen tüketim oranını azaltır, bu nedenle metabolik beyin iskemisi ve buna bağlı bilişsel işlev bozukluğu tehlikesini artırır (de Matos ve ark., 2018).

4.3.9. cAMP ve cAMP aracılı sinyal yollarının hasarlanması

Çoklu siklik nükleotit fosfodiesteraz (PDE) ailesinin aktivitesi, T2DM hastalarının deri altı adipoz dokusunda artmış bulunmuştur ve bunun diyabetle ilişkili kardiyovasküler hastalıklarda etkileri olabileceğini gösteren çalışmalar vardır.

PDE'ler çok sayıda fizyolojik işlemlerde hayati olan hücresel sinyal iletim yollarında yer alan siklik guanozin monofosfat (cGMP) ve adenozin monofosfatta (cAMP) fosfodiester bağ hidrolizini katalize eder. Özellikle cGMP'nin NO destekli düz kas gevşemesinde ve dolayısıyla kan basıncı kontrolünde önemli bir rolü olduğu ve vasküler inflamasyonu ve insülin direncini iyileştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca hipokampusteki NO/cGMP sinyal yolu, sinaptik iletim, nöronal plastisite, öğrenme ve bellekte önemli bir şekilde yer almaktadır. Bu sinyalleme kaskadı A β 'nin etkisiyle bozulmuştur ve aslında serebrospinal sıvıdaki düşük cGMP seviyeleri yakın zamanda AH hastalarında bilişsel düşüş ve amiloidojenez ile ilişkilendirilmiştir. (de Matos ve ark., 2018)

Öte yandan cAMP'nin pankreatik α -hücreleri tarafından glukagon salınımını inhibe ederken β -hücreleri tarafından glukoz ile uyarılan insülin sekresyonunu güçlendiren bir intestinal hormon olan glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1)'in postprandial salgılanmasını uyardığı bulunmuştur. Bu β -hücrelerinin işlevsiz hale geldiği ve insülin üretme kabiliyetini kaybettiği T2DM'nin ileri aşamalarında özellikle geçerlidir. Sonuç olarak, diyabetik hastalarda plazma glukoz seviyeleri oldukça yüksek olsa bile, anormal adacık içi sinyali α -hücrelerinin glukagon salgısını inhibe edememektedir, bu da diyabetik hastalarda alevlenmiş hiperglisemiye katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, hipokampusteki cGMP aracılı bellek konsolidasyonunun postsinaptik cAMP sinyalini gerektirdiğini ve cAMP'nin PLA2'yi inhibe edip nöronları sinaptik hasara karşı koruyabildiğini gösteren güçlü kanıtlar vardır. Yine de cAMP seviyelerinin, AH hastalarında mikrodamarlarından alınan serebrospinal sıvıda yükseldiği bulunmuştur. cAMP seviyelerinin telafi edici bir mekanizma vasıtasıyla yükselip yükselmediği açık değildir, ancak hippocampal cAMP downstream efektörleri, yani son uzun süreli bellek promotörleri olan cAMP'ye bağımlı protein kinaz (PKA) ve cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB) bulunur. Downregüle olan cAMP/PKA/CREB yolu, PDE inhibitörleri tarafından yeniden kurulur, bu nedenle Alzheimer hastalarındaki hücre içi hippocampal cAMP seviyelerinin, BOS'takilerle doğrudan ilişkili olamayacağını öne sürer. Aslında AH hastalarının postmortem beyin örneklerini kullanan çalışmalar, hipokampüste cAMP oluşumunu katalizleyen adenilat siklaz aktivitesinin hippocampüste azalmış olmasına rağmen, birkaç cAMP'ye özgü

PDE izoformunun ekspresyonunun anlamlı şekilde upregüle olduğunu göstermiştir. (de Matos ve ark., 2018)

4.3.10. İnsülin degrade edici enzim

İnsülini yıkan enzim olan insülin degrade edici enzim (IDE), insülini yıkması yanında A β , IAPP ve glukagon gibi başka substratları da yıkar (Farris ve ark., 2003). Bu da T2DM ve AH arasındaki ilişkiye işaret etmektedir (Qiu ve Folstein, 2006). Öncelikle, prediyabet durumunda insülinin IDE için rekabet edebileceği ve dolayısıyla beyinde birikme dolayısıyla azalmış A β bozulmasına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. AH'nin serebral insülin eksikliğiyle ilişkili olmasına rağmen, periferik olarak üretilen ve dolaşımdaki A β KBB'ye geçebilir ve bu hipotezi destekleyen beyin lezyonlarına katkıda bulunabilir. Ayrıca bazı araştırmacılar, IDE gen mutasyonlarının etkisiz hale getirilmesinin, IDE ekspresyonunun veya aktivitesinin değişmesine neden olabileceğini ve sonuç olarak insülin ve A β klerensinin azalmasına neden olabileceğini iddia eder; aslında bazı genetik IDE polimorfizmleri, IDE fonksiyonuna işaret ederek T2DM ve AH'nin ilişkili olduğuna işaret eder. Ayrıca IDE ekspresyonunun ve aktivitesinin, NO ve uzun zincirli yağ asitleri de dâhil olmak üzere birçok fizyolojik faktör ve endojen molekül tarafından negatif olarak düzenlendiği gösterilmiştir. T2DM hastalarında, IDE inaktivasyonuna katkıda bulunan NO düzeylerinin arttığı bulunmuştur (de Matos ve ark., 2018).

IDE knockout kaynaklı IDE aktivite kaybına sahip farelerde, pankreatik β - hücrelerinde artan insülin ve IAPP seviyeleri ile glukoz intoleransına ve primer nöronal kültürlerde ve beyin zarı fraksiyonlarında eşzamanlı A β birikimine yol açmıştır. Bununla birlikte diğer raporlar, bozulmuş insülin sekresyonuna yol açan inaktif IDE gen mutasyonlarının olduğunu göstermektedir. Yüksek kalorili bir diyetle maruz kalan IDE knockout fareleri, aynı diyetle maruz kalan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında glukoz toleransı için kötü bir prognoz göstermektedir. IDE knockout fareler kullanılarak yapılan bir başka çalışma, azalmış otofaji ve pankreatik α -sinükleinde bir artış ile ilişkili düşük glukoz ile uyarılmış insülin sekresyonuna yol açmıştır. T2DM hastalarında da pankreatik IDE ve α -sinüklein düzeyleri arasında aynı ters korelasyon gözlenmiştir. SSS'ndeki presinaptik vezikül salınımının

düzenlenmesinin yanı sıra, α -sinüklein panreastaki insülin salgılayıcı granüllerle etkileşime girebilir ve glukoz ile uyarılan insülin sekresyonunu inhibe edebilir. α -sinükleini indirgeyememesine bakılmaksızın, IDE aslında bunun gibi agregasyon eğilimli proteinlerin monomerleri ile stabil ve geri dönüşümsüz kompleksler oluşturabilir ve böylece fibrilleşmeleri proteolitik olmayan bir şekilde inhibe edebilir. Bu nedenle, düşük IDE seviyeleri, sadece insülin sekresyonunun α -sinüklein kaynaklı inhibisyonunu teşvik etmeyebilir, aynı zamanda pankreastaki amiloid yükünü de artırabilir (de Matos ve ark., 2018).

Beyin insülin eksikliği veya patolojik koşullar altında diğer IDE substratlarının değiştirilmiş seviyeleri, nihayetinde, insülin eksikliği olan farelerde IDE seviyelerinin belirgin şekilde azalmasıyla beyin IDE ekspresyonunun düşürülmesine neden olabilir. Aslında, APOE- ϵ 4 alleli ile ilişkili bozulmuş insülin metabolizmasına sahip geç başlangıçlı AH hastalarında düşük hippokampal IDE seviyeleri bulunmuştur. Pankreasta olanlara benzer şekilde, IDE, A β 'ya karşı ikili proteaz şaperon olarak işlev görür ve bunun degrade edici aktivitesinin üstünde nörotoksik olmayan agregatlar oluşturur. Bu nedenle, düşük IDE seviyeleri, beyinde, AH'nin 2 belirleyici özellikleri olan sinaptik fonksiyon bozukluğunu ve serebrovasküler amiloidozu yoğunlaştıran A β agregatlarının oluşumunu hızlandırır (de Matos ve ark., 2018).

T2DM ve AH'yi birbirine bağlayan puzzle parçalarına bakıldığında, ya genetik (IDE polimorfizmleri gibi) ya da çevresel faktörlerin (yüksek yağlı hiperkalorik diyetler gibi) neden olduğu IDE inhibisyonu ya da yukarı regülasyonu hem doğrudan hem de dolaylı olarak beyin A β düzeyini arttırıcı bir faktör olarak gösterilmektedir. APOE- ϵ 4 veya upregüle PDE ve GSK-3 β enzimleri ile iş birliği içinde nörodejeneratif süreçte rol almaktadır (de Matos ve ark., 2018).

4.4. Alzheimer Hastalığının Tedavisi

4.4.1. Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan mevcut farmakolojik ve farmakolojik olmayan yaklaşımlar

Şu anda, AD'li hastalar için sadece iki sınıf farmakolojik tedavi mevcuttur. Kolinesteraz inhibitörleri donepezil, rivastigmin ve galantamin; hafif, orta veya şiddetli AH demansı ve ayrıca Parkinson hastalığı demansı olan hastalar için önerilen

tedavidir. Hem rekabetçi olmayan bir N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonisti hem de bir dopamin agonisti aktivitesine sahip olan memantin, orta ila şiddetli AH'li hastalarda kullanım için onaylanmıştır (Cummings, 2004). Alternatif tedaviyi seçen hastalar için, nutrasötik huperzin A, hem hafıza fonksiyonunda hem de günlük yaşam aktivitelerinde fayda göstermektedir. Bununla birlikte, huperzin A, ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmamıştır ve etki ve saflıktaki dalgalanmalara tabi olabilmektedir. D vitamini eksikliği de herhangi bir nedenle demans gelişimi için bağımsız bir risk faktörü olarak tanımlanmış ve D vitamini eksikliği teşhisi konan hastalarda takviye önerilmektedir. Birçok retrospektif, gözlemsel çalışma, steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlar (NSAİİ)'in kullanımıyla AH riskinin azaldığını göstererek AH gelişiminde inflamasyonun rolüne değinse de bu ilaçları alan hastalarda yapılan daha kapsamlı bir araştırma bilişsel performansta herhangi bir anlamlı farklılık göstermemiştir. Son on yılda, balık yağı da dahil olmak üzere omega-3 yağ asidi takviyeleri, kardiyovasküler faydaları nedeniyle çok dikkat çekmiştir. Yakın zamanda yapılan iki randomize, kontrollü, çift kör çalışma, balık yağı takviyesi alan kalp hastalarında düşünme ve hafızada iyileşme olduğunu göstermiştir. Son olarak, kardiyovasküler risk faktörlerinin yönetimi hem serebrovasküler hastalıkta hem de nörodejeneratif hastalıkta genel beyin sağlığına katkıda bulunmaktadır. Son sistematik incelemeler, Akdeniz diyetine (taze ürünler, kepekli tahıllar, zeytinyağı, baklagiller ve deniz ürünlerinden oluşan, süt ve kümes hayvanları ürünlerini sınırlandıran ve kırmızı et, tatlılar ve işlenmiş gıdalardan kaçınan yemekler) bağlı olan kişilerde bilişsel gerileme ve AH gelişme riskinin azaldığı bulunmuştur. Uzun süredir DM ve koroner arter hastalığı gibi metabolik durumları önlediği bilinen düzenli aerobik egzersizin, AH'li hastalarda bilişsel fonksiyonun korunmasına katkı sağladığı ve bakıcı yükünü azalttığı belirtilmektedir. Fiziksel egzersiz, hastalar yaşlandıkça güç ve çeviklik kaybını önlemekle kalmaz, aynı zamanda nöropsikiyatrik semptomları ve bu sorunlarla ilişkili artan bakım gereksinimlerini de azaltır. Fiziksel aktivite, egzersizin başlangıcındaki yaştan bağımsız olarak kaydedilen fayda ile yaşamın ilerleyen dönemlerinde bilişsel işlevi artırır. Düzenli egzersiz yapan AH için genetik risk faktörlerine sahip hastaların beyinlerinde daha az atrofi gözlenmiş ve bu da aerobik aktivitenin nörodejenerasyonu önlediğini düşündürmüştür. (Weller ve Budson, 2018)

4.4.2. Alzheimer hastalığı tedavisinde diğer terapötik hedefler

4.4.2.1. A β 'yı hedef alan tedavi yaklaşımları

Son 20 yılda yapılan çığır açıcı keşiflere dayanarak, A β 'nın üretimini azaltmak ya da temizlenmesini artırmak için çeşitli terapötikler geliştirilmiştir.

İlk kategorideki ilaçlar A β 'yı öncü ürünü olan APP'den sentezleyen enzimler olan β -sekretaz ve γ -sekretazı inhibe etmek için tasarlanmıştır. Bu enzimlerin uzun süredir bilinmesine rağmen, KBB'ye nüfuz eden ilaçların geliştirilmesi ve özellikle Notch ve voltaj-kapılı sodyum kanalı alt birimleri gibi alternatif substratların bölünmesini etkilemeden APP'nin ayrılmasını önlemesi zor olmuştur (Citron, 2010; De Strooper ve ark., 2010; Golde ve ark., 2011). Faz 3 klinik aşamada olan bir γ -sekretaz inhibitörünün denemesi, bilişsel bozuklukların kötüleşmesini içeren yan etkiler sebebiyle durdurulmuştur (Schor, 2011). Diğer bir ilaç kategorisi olarak APP'nin γ -sekretaz ile bölünmesini modüle ederek A $\beta_{42/43}$ üretimini, uzun türlere göre daha az toksik olabilen daha kısa A β türleri lehine azaltır (Golde ve ark., 2011; Karran ve ark., 2011). Bununla birlikte daha kısa A β türlerinin, in vivo nöronal disfonksiyona katkıda bulunduğu, γ -sekretaz modülatörlerinin etkinliğini ve güvenliğini sınırlandırabilecek bir ihtimal olduğu henüz kesin olarak dışlanmamıştır. γ -sekretaz modülatörü tarenflurbil yapılan Faz 3 denemelerinde başarısız bulunmuştur. Devam eden denemeler daha seçici olan γ -sekretaz ve β -sekretaz inhibitörlerinin daha etkili ve daha güvenli olup olmadığını değerlendirmektedir.

Geliştirilmiş klerens yoluyla A β seviyelerini düşürme çabaları transjenik farelerde A β 'ya karşı immünizasyonun, amiloid plakları temizlediğinin gösterilmesi ile ortaya çıkmıştır (Sheng ve Cai, 2012). İnsanlarda aktif bir immünizasyon denemesi immünopatolojik yan etkiler nedeniyle durdurulmak zorunda kalmıştır (Gilman ve ark., 2005). Faz 2 çalışmasında insanlaştırılmış monoklonal anti-A β antikorlarının tekrarlayan infüzyonları ile pasif immünizasyon, vazojenik ödem ve mikrohemorajiler de dâhil olmak üzere amiloid ilişkili anormal görüntülemeler olmasına rağmen daha iyi tolere edilmiştir (Salloway ve ark., 2009; Sperling ve ark., 2011). Bu deneme daha sonra, yukarıdaki komplikasyonlara özellikle duyarlı olan APOE- ϵ 4 taşıyıcılarında antikor dozu azaltılmış bir Faz 3 çalışmasında genişletilmiş ve sonuçların elde edilmesi beklenmektedir.

4.4.2.2. Hiperfosforile tau'yu hedef alan tedavi yaklaşımları

Çok az sayıda ilaç denemesi tau'ya odaklanmış olsa da tau ile ilişkili terapötiklere ilgi, son yıllarda, kısmen, anti-A β stratejileri ile karşılaşılan güçlükler nedeniyle giderek artmaktadır (Brunden ve ark., 2009; Golde ve ark., 2011; Morris ve ark., 2011). AH hastalarında, fenotiyazin metilen mavisi, bir yıl boyunca yapılan Faz 2 çalışmalarında hastalığın ilerlemesini yavaşlatmıştır (Gura, 2008). Metilen mavisinin başlangıçta tau etkileşimlerini inhibe ettiği düşünülmüştü, fakat aynı zamanda birçok hedefi olduğu bilinen diğer mekanizmalar yoluyla çözünür tau'yu da azaltabilmektedir (Schirmer ve ark., 2011). Daha yeni bir metilen mavisi formülasyonu (LMTX) ile Faz 3 denemeleri planlanmaktadır.

Tau'ya bağlı nöronal disfonksiyon ve dejenerasyondan hangi tau düzeneğinin veya konformasyonunun sorumlu olduğu belirsiz olduğundan, bu yapının fazlalığının mevcut tau biriktirme bloke edicilerinin herhangi biri tarafından azaltılıp azatılmadığı aynı derecede belirsizdir. Aslında bazı tau agregasyon inhibitörleri, potansiyel olarak toksik tau oligomerlerinin oluşumunu artırır (Taniguchi ve ark., 2005).

Birkaç kanıt anormal tau fosforilasyonunun, tau patojenezine katkıda bulunduğunu gösterdiğinden (Hoover ve ark., 2010; Morris ve ark., 2011; Zempel ve ark., 2010), tau kinazları, AH için GSK-3, CDK5, MAPK dâhil olmak üzere potansiyel ilaç hedefleri olarak takip edilmeye devam etmektedir. Bununla birlikte tüm bu kinazların tau dışında sayısız başka substratı vardır, ilgili inhibitörlerin güvenliği ile ilgili endişeleri artırmaktadırlar ve şimdiye kadar hiçbir tau kinaz inhibitörünün AH için geç fazlı bir klinik çalışmaya ilerlemiş olduğu görülmemiştir.

Tau fosforilasyonunu modüle etmenin potansiyel bir alternatifi de genellikle tau seviyelerini düşürmektir. Farelerde endojen tau'nun %50 azaltılması iyi tolere edilmiş, kimyasal olarak indüklenen nöbetlere karşı direnci artırmış ve in vivo olarak A β ve APOE- ϵ 4 fragmanının indüklediği nöronal ve bilişsel bozuklukları belirgin bir şekilde azaltmıştır (Morris ve ark., 2011). Devam eden deneylerin, toplam tau seviyelerinin azaltılmasından, AH ile ilişkili patolojileri olan yetişkin ve yaşlı hayvanlarda başlatıldığında da etkili ve güvenli olduğunu kabul ettiği varsayılırsa, tau'nun kendisini veya ekspresyonunu veya temizliğini düzenleyen molekülleri hedefleyerek

tau seviyelerini azaltmak faydalı olabilir. Bazı ilgili moleküller zaten tanımlanmıştır. Örneğin, dihidropiridinler'in, hücre kültürlerinde tau seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir (Evans ve ark., 2011).

Tau'nun ubikuitin-proteasom ve lizozomal yolaklar yoluyla bozulmuş olduğu düşünülmektedir. Tau için ubikuitin ligaz, Hsc70 ile etkileşime giren proteinin karboksi ucu (carboxy-terminus of Hsc70-interacting protein, CHIP) olarak tanımlanmıştır. CHIP seviyelerinin azaltılması, insan tau transjenik farelerinde tau agregatlarının birikimini artırmış ve AH beyinlerinde CHIP seviyeleri azalmıştır (Sahara ve ark., 2005). Ayrıca adından da anlaşılacağı gibi CHIP tau bozulmasını düzenlemek için ısı çok proteinleri ile birlikte çalışır (Dickey ve ark., 2007); ısı şoku proteini 90 (Hsp 90) seviyeleri,    nebilir tau ve tau oligomerlerinin seviyeleri ile ters orantılıdır (Sahara ve ark., 2005).

AH bireylerinde tau, yarı ömrünü artıran, mikrotübül bağlanmasını değiştiren ve agregasyonu geliştiren hiperasetile edilmektedir (Cohen ve ark., 2011; Min ve ark., 2010). Bu nedenle tau asetilasyonunu inhibe etme ve proteazom fonksiyonunu artırma kombinasyonu, patojenik tau türlerinin seviyesini düşürmek için sinerjize olabilir.

Tau bozulması immün aracılı mekanizmalar ile de artırılabilir. Fosforile edilmiş tau hedefleyen aktif immünizasyon, tau transjenik farelerde, flamentli tau inklüzyonları ve nöronal disfonksiyonu azaltmıştır (Asuni ve ark., 2007). Tau ve  -sinüklein içeren hücre içi proteinlerin immünizasyon ile temizlendiği mekanizma bilinmemektedir ancak lizozomal bozunmayı içerebilir (Masliah ve ark., 2001; Sigurdsson, 2009). Antikorlar beyne girdiğinde, reseptör aracılı endositoz ile alınabilir ve otofajiyi aktive edebilir veya hücre dışı ortamda tau veya  -sinüklein ile etkileşime girebilir (Sigurdsson, 2009).

Tau transjenik fareleri ve A  oligomerlerine maruz bırakılan nöron kültürleri de dâhil olmak üzere çeşitli AH modellerinde mikrotübül bozulması gözlenmiştir (Brunden ve ark., 2009; Morris ve ark., 2011). Mikrotübül stabilizatörlerinin AH için prelinik ve klinik çalışmalarda umut vaaddettiği gösterilmiştir. Örneğin, paklitaksel, hücre kültüründe A  kaynaklı toksisiteyi, ayrıca tau transjenik farelerinde aksonal taşınma kusurlarını ve motor bozuklukları önlemiştir (Zempel ve ark., 2010; Zhang ve ark., 2005). Daha iyi KBB geçirgenliğine sahip olan Etoposide D, tau transjenik farelerde

mikrotübül yoğunluğunu ve bilişini geliştirir (Brunden ve ark., 2009). Peptid NAP, mikrotübülleri stabilize eder ve tau hiperfosforilasyonunu azaltır (Vulih-Shultzman ve ark., 2007); bu mikrotübül stabilize edici bileşiklerin birden fazla etki mekanizmasına sahip olduğunu gösterir. NAP intranazal yoldan verilebilir ve bir FAZ 2 klinik çalışmasında umut vadetmiştir (Gozes ve ark., 2009).

4.4.2.3. APOE-ε4'ü hedef alan tedavi yaklaşımları

4.4.2.3.1. Aβ-bağımlı olarak apoe-ε4'ü hedef alan tedavi yaklaşımları

APOE-ε4'ün Aβ'ya bağımlı etkilerini hedef alan yaklaşımlar, Aβ temizliğini artırmak veya Aβ birikimini azaltmak için APOE seviyelerini veya APOE'nin Aβ bağlama özelliğini değiştirmeye odaklanmıştır (Kim ve ark., 2009). İnsanlarda ve farelerde yapılan çalışmalar, beyin Aβ seviyelerinin ve amiloid plak oluşumunun APOE izoformuna bağımlı olduğunu göstermektedir (APOE-ε4 > APOE-ε3 > APOE-ε2) (Castellano ve ark., 2011; Kim ve ark., 2011). Beyin APOE seviyeleri de izoforma bağımlıdır, fakat ters yöndedir (APOE-ε4 < APOE-ε3 < APOE-ε2) (Bales ve ark., 2009; Riddell ve ark., 2008). Beyindeki APOE-ε4 seviyeleri, APOE-ε4'ün Aβ'yı temizleme kapasitesini azaltabilecek olan APOE-ε3 seviyelerinden daha düşük olma eğilimindedir. Bu hipoteze dayanarak beyindeki APOE ekspresyonunun Aβ klirensini uyarması ve Aβ seviyelerini düşürmesi umuduyla artırması önerilmiştir (Bales ve ark., 2009; Riddell ve ark., 2008). Bununla birlikte yakın zamanda yapılan çalışmalar doğrudan transjenik farelerde bu hipotezi test etmiştir ve APOE-ε3 veya APOE-ε4 ekspresyonun seviyelerinin artmasının aslında beyinlerindeki amiloid birikimini artırdığını bildirmiştir (Bales ve ark., 2009; Kim ve ark., 2011). Dolayısıyla orijinal hipotezin aksine, bu bulgu, APOE ekspresyonunun artırılmasından ziyade, beyin Aβ seviyelerinin düşürülmesinde ve plak yüklerinin azaltılmasında ümit verici bir yaklaşım olabileceğini düşündürmektedir.

APOE-ε4'ün Aβ birikimini destekleme yeteneğini hafifletmek için diğer çabalar APOE ve Aβ arasındaki etkileşimi engellemeye odaklanmıştır (Sadowski ve ark., 2006; Yang ve ark., 2011). Örneğin, APOE'nin Aβ'nın bağlanma yerine homolog olan fakat stratejik bir tek aminoasid ikamesini taşıyan KBB-geçirgen sentetik peptid Aβ12-28P hücre kültüründe Aβ toksisitesini ve transjenik farelerde amiloid birikimini

azaltır (Sadowski ve ark., 2006; Yang ve ark., 2011). Bu çalışmalara dayanarak özellikle genç yaşlarda A β ve insan APOE arasındaki etkileşimin engellenmesinin amiloid birikimini teşvik edebileceği düşünülebilir.

4.4.2.3.2. A β -bağımlı olmayarak apoe- ϵ 4'ü hedef alan tedavi yaklaşımları

APOE- ϵ 4'ün A β 'dan bağımsız etkilerini hedef almak için çeşitli yaklaşımlar önerilmiştir. Bir yaklaşım, APOE- ϵ 4 alan etkileşimini bozabilecek küçük molekül yapı düzelticileri tanımlamaktır (Huang, 2006; Mahley ve ark., 2006). APOE- ϵ 4'ün çoklu etkilerinden sorumlu olduğu için etki alanı etkileşimini engelleme bu zararlı etkileri ortadan kaldırmalı veya hafifletmelidir. Bu amaca yönelik olarak, insiliko modellemeler rasyonel ilaç tasarımı ve yüksek verimli tarama ile yüksek potansiyele sahip küçük moleküller tanımlamıştır. Bu moleküller, nöronal hücre kültürlerinde APOE- ϵ 4 alan etkileşimini ortadan kaldırır, APOE- ϵ 4 hücre içi kaçakçılığını iyileştirir, bu hücrelerde nörit büyümesi, miyokondriyal motilite ve fonksiyonu ve A β üretimi üzerindeki zararlı etkilerini önler (Brodbeck ve ark., 2011; Chen ve ark., 2010; Ye ve ark., 2005). Bir başka yaklaşım, APOE'ü bölen ve nörotoksik fragmanlar üreten proteazın tanımlanması ve spesifik proteaz inhibitörlerinin geliştirilmesidir (Huang, 2006; Mahley ve ark., 2006). Alternatif olarak, nörotoksik APOE fragmanlarına özgü insanlaştırılmış monoklonal antikorlar, fragmanları temizlemek ve zararlı etkilerini bloke etmek için kullanılabilir. Ek bir yaklaşım, mitokondri ve hücre iskeletinin toksik APOE parçalarının saldırılarına karşı korunmasıdır (Huang, 2006; Mahley ve ark., 2006). Nöronlarda APOE- ϵ 4 ekspresyonunun azaltılması ayrıca toksik APOE fragmanlarının seviyesini ve onların olumsuz etkilerini de azaltmalıdır (Huang, 2006). Sentetik APOE-benzeri peptidlerin, akut beyin hasarının fare modellerinde nöroprotektif olduğu gösterilmiştir. Her ne kadar APOE- ϵ 4'ün, A β 'dan bağımsız etkilerini hedef alan bu yaklaşımlar ümit verici olsa da hepsi gelişimlerinin erken bir aşamasındadırlar ve hayvan modellerinde ve nihayetinde terapötik potansiyellerini daha fazla değerlendirmek için klinik denemelerde değerlendirilmesi gerekir.

4.4.2.4. Diğer tedavi yaklaşımları

AH'de oksidatif hasar, enflamasyon ve mitokondriyal bozulmalara dair bol miktarda kanıt bulunduğundan (Bezprozvanny, 2010; Galimberti ve Scarpini, 2011; Perry ve ark., 2010), antioksidanlarla (Lee ve ark., 2010), antienflamatuvarlarla (Cole ve Frautschy, 2010) ve vassayılan mitokondriyal koruyucularla (Bezprozvanny, 2010) hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak için birçok girişimde bulunulmuştur. Bununla birlikte şimdiye kadar, bu çabalardan etkili biri tedavi ortaya çıkmamıştır. Hormon tedavisi benzer şekilde hayal kırıklığı yaratmıştır (Shumaker ve ark., 2003). Şu anda sinaptik veya ağ işlev bozukluğunu (Koh ve ark., 2010; Palop ve ark., 2006), yaşlanma (Cohen ve ark., 2009) ve otofaji (Harris ve Rubinsztein, 2011) modölatörleri hedefleyen bir dizi deneysel strateji araştırılmaktadır. Zaman, bu veya diğer yeni stratejilerin AH için daha etkili terapötikler geliştirilip geliştirilemeyeceğini söyleyecektir.

4.5. AH Tedavisinde T2DM İlaçları

4.5.1. AH tedavisi için T2DM ilaçlarının etkileri

T2DM tedavisinde, klasik ilaçlarından olan biguanid türevi metforminden son yıllarda onay alan sodyum glukoz ko-transporter (SGLT2) inhibitörü empagliflozine kadar oral olarak çeşitli ilaçlar dünya çapında kullanılmaktadır (Tan ve ark., 2019). T2DM'nin karmaşık etiyolojisi ve hastalar arasındaki klinik farklılıklar sebebiyle bu ilaçların bazılarının kombinasyon halinde kullanımı ile diyet ve egzersizi kapsayan hayat tarzı değişiklikleri ile T2DM'nin kontrolü sağlanabilmektedir (de Matos ve ark., 2017, 2018).

T2DM'nin ve AH'nin ortak patolojik geçmişine dayanarak, iyi bilinen ve yaygın olarak kullanılan antidiyabetik ilaçların, AH'nin tedavisinde ve önlenmesinde potansiyel faydalarını ortaya çıkarmak için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bir yandan metformin APP ekspresyonu ve işlenmesinde oksidatif stresin neden olduğu artışla bilişsel fonksiyonlarda azalma ile ilişkili bulunmuşken, bir yandan da bu etki insülin ve kurkumin gibi antioksidan bileşiklerin etkisiyle tersine çevrilmiştir; bu nedenle bu gibi moleküllerin öngörülen metformin tedavisi ile birlikte kullanılmasını teşvik etmiştir. Öte yandan, son zamanlarda metforminin nöroprotektif etkilere sahip

olduğu, farelerde skopolamin ve sisplatinin neden olduğu bilişsel bozulmayı ve beyin hasarını önleyebildiği, BACE-1 aktivitesini azalttığı gösterilmiştir. Her ne kadar hafif bilişsel bozukluğu olan hastalarda yapılan pilot bir çalışma, prodromal AH'nin ilerlemesini etkin bir şekilde metforminin kullanılıp kullanılamayacağı konusunda kesin sonuçlara ulaşamasa da uzun süreli metformin tedavisinin gerçek etkileri daha büyük bir deneme yapılarak netleştirilebilir (de Matos ve ark., 2018).

Pereksizom proliferatör aktive reseptör gama (PPAR γ) agonistleri olarak da bilinen pioglitazon gibi tiazolidindionların intrinsik nöroprotektif ve antiinflamatuvar etkileri olduğu ve beyin insülin duyarlılığını artırma kabiliyetine de sahip olabildiği gösterilmiştir (Prakash ve ark., 2015; Yin ve ark., 2013). Yapılan randomize ve açık kontrollü çalışmalarda hafif kognitif bozukluğu olan ya da AH'li hastalarda pioglitazonun, kognitif ve fonksiyonel gelişmeler sağladığı gösterilmiştir (Hanyu ve ark., 2009).

Bunun yanında uzun etkili intranazal insülin detemir'in hafif kognitif bozukluk ya da AH'nin erken döneminde APOE- ϵ 4 taşıyıcılarında kognitif gelişme sağlamıştır (Claxton ve ark., 2015).

Benzer şekilde GLP-1 agonistlerinden liraglutid'in de kronik inflamasyonu, patolojiye özgü tau hiperfosforilasyonunu ve beyindeki A β birikimini önlediği ve farelerde hafıza bozukluğunu iyileştirdiği bulunmuştur (Hansen ve ark., 2016; McClean ve ark., 2015).

Bunlara karşılık AH'de kullanılan Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı bir ilaç olan galantamin ise potansiyel antidiyabetik ajan olarak belirtilmiştir. Galantaminin iyi bilinen kolinesteraz inhibitörü aktivitesinin yanında ayrıca, plazma glukozu ve insülin seviyelerini düşürdüğü; insülin sinyal yollarını, lipid metabolizmasını ve β -hücre fonksiyonunu iyileştirdiği bulunmuştur (Ali ve ark., 2015).

4.5.2. T2DM ve AH'de olası ortak tedavi yaklaşımları

4.5.2.1. PDE inhibitörleri

Yıllar boyunca, seçici PDE inhibitörleri, farmakolojik ajanlar olarak araştırılmıştır. PDE3, trombosit agregasyonu ve insülinin antilipolitik etkisinin düzenlerken (Gresele

ve ark., 2011), PDE5 inhibisyonu kas mikrovasküler kan akışını ve insülinle uyarılmış glukoz alımını iyileştirir (Genders ve ark., 2011). Ek olarak PDE9 inhibitörlerinin, insülin direnci, hiperglisemi, dislipidemi, kardiyovasküler hastalık ve obeziteye karşı aktiviteleri olduğu bildirilmiş ve metabolik sendromun tedavisi için potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (Bonora, 2006; Deninno ve ark., 2009).

Bir kinolinon türevi olan silostazol, 1999 yılında FDA tarafından aralıklı topallama semptomlarının azaltılması için onaylanan bilinen bir PDE3 inhibitörüdür (Kumar ve Bhattacharya, 2007). Silostazol son zamanlarda vasküler demansa ve hatta AH'ye karşı ümit verici bir ajan olarak yeniden keşfedilmiştir, APOE aracılı Aβ birikimi, tau fosforilasyonu ve oksidatif stres seviyeleri ile farelerde hafıza bozukluğu ve bilişsel eksiklikleri önlediği bulunmuştur (Hiramatsu ve ark., 2010). Bileşik aynı zamanda serebral iskemik hasara karşı KBB koruyucu bir ilaç olarak kabul edilmekte (Horai ve ark., 2013) ve kronik serebral hipoperfüzyonun sıçan modellerinde, beyaz maddenin parçalanmasını önleyebildiği ve diyabetle ilişkili bilişsel bozulmayı iyileştirdiği gösterilmiştir (Kwon ve ark., 2015). 2013 yılında yayınlanan bir pilot çalışmada, bu PDE inhibitörünün AH'li hastalarda bilişsel düşüşü önleme yeteneği doğrulanmış ve daha yakın zamanda yapılan retrospektif bir analize göre, halihazırda donepezil tedavisi alan hafif demans hastalarında PDE inhibitörünün faydalı etkilerini doğrulamıştır (Ihara ve ark., 2014; Sakurai ve ark., 2013). Bu pozitif sonuçlarla silostazol şu anda hafif kognitif bozukluğu olan hastalarda Faz 2 klinik çalışmada ve T2DM hastalarında Faz 3 çalışmasında antihiperglisemik, insülin duyarlaştırıcı, antienflamatuvar ve endotelial korucu etkisini gösteren raporlar ile teşvik edilmektedir (Tseng ve ark., 2016; Wada ve ark., 2013). T2DM'li hastalarda alt ekstremitte diyabetik ülserasyonu ve periferik arter tıkanıklığı üzerinde hafifletici etkileri gösteren en son yayınlar ek olarak teşvik edicidir ve bu veriler diyabet kaynaklı bilişsel bozukluklara karşı da yeni önleyici ve tedavi edici yaklaşımların temeli olarak silostazol kullanımını desteklemektedir (Liu ve ark., 2015; Neel ve ark., 2015).

Yakın zamanda geliştirilen PF-04447943, bozulmuş cGMP sinyalleme ile bağlantılı bilişsel bozuklukların tedavisi için PDE9A'yı seçici olarak inhibe etmek için tasarlanmıştır (Verhoest ve ark., 2012). Bileşik insanlarda iyi bir tolere edilebilirlik ve metabolik profil sergilemiştir (Charnigo ve ark., 2019). Ayrıca bileşik KBB'yi geçebilmektedir. Bileşik, hippocampal sinaptik plastisite ve gelişmiş bilişsel

işlevsellik üzerine iyi bir etki ortaya koyarken, çoklu beyin bölgelerinde ve BOS'ta cGMP seviyelerini yükseltmiştir (Hutson ve ark., 2011). Dolayısıyla bileşik klinik deneylere geçmiştir. Fakat ne yazıkki teşvik edici prelinik verilere rağmen, AH'li hastalarda yapılan bir Faz 2 çalışmasının yakın zamanda yayınlanan sonuçlarına göre, günde 2 kez 25 mg PF-04447943 ile 12 haftalık bir tedavi ile herhangi önemli bir farklılık elde edilememiştir (Schwam ve ark., 2014). Görünüşe göre, indüklenmiş cGMP geliştirme etkisi, bu hastaların bilişsel performansı üzerinde en azından AH ile ilişkili diğer patolojik özelliklerin neden olduğu hasarı telafi etmek için güçlü bir etki yaratmak için yeterli değildir (de Matos ve ark., 2018).

Bununla birlikte, PF-04447943'ün sadece nörodejeneratif hastalıklara karşı terapötik faydası ile ilgili araştırılmasına rağmen, metabolik sendromun tedavisi için yukarıda belirtilen PDE9 inhibisyon potansiyeli, bu tip bileşiklerin T2DM'de muhtemel bir uygulamasını önermektedir. Aynı pirazolopirimidinon çekirdeğini taşıyan başka bir bileşik, PDE9A'yı seçici olarak inhibe etmek için 2014 yılında geliştirilmiş ve potansiyel antihiperglisemik aktivitesine odaklanılmıştır (Shao ve ark., 2014). Bileşik artmış fosfoenolpirüvat karboksikinas (PEPCK) ve Glukoz-6-fosfataz (G6Paz) ekspresyonlarını önemli ölçüde düşürmüş ve potansiyel bir antihiperglisemik etki ortaya koymuştur (de Matos ve ark., 2018).

4.5.2.2. GSK-3 β inhibitörleri

2007 yılında tiadiazolidinone NP031112'nin antienflamatuvar ve nöroprotektid etkilere sahip olduğu bulunmuştur ve o zamandan beri beyin hastalıklarına karşı potansiyel terapötik rolü için ilgi görmüştür (Luna-Medina ve ark., 2007). Daha sonra tideglusib olarak adlandırılan bu bileşik geri dönüşümsüz, ATP-rekabetçi olmayan bir GSK-3 β inhibitörüdür ve ayrıca nöral kök hücreleri, nöronal eksitotoksisteye yol açan NMDA reseptörlerinin aşırı aktifleştirilmesine karşı koruduğu bulunmuştur (Armagan ve ark., 2015; Domínguez ve ark., 2012). İnsan mutantı APP ve tau proteinini aşırı eksprese eden transjenik farelerde, tideglusib, hipokampal nöronal hücre ölümünü ve ilişkili hafıza kaybını önlerken, fosforile edilmiş tau seviyelerinde bir düşüş ve beyin A β yükünde azalmayı teşvik etmiştir. Tideglusib genellikle iyi tolere edilir, bu nedenle GSK-3 β 'nın güvenli bir şekilde hedeflenebileceğini gösterir (DaRocha-Souto ve ark.,

2012; Serenó ve ark., 2009). Tamamlanmış bir Faz 2 çalışmasından elde edilen sonuçlar, bileşiğin hafif ile orta şiddette AH'li hastalarda önemli klinik etkinlik göstermediği bulunmasına rağmen, hafif şiddetteki hastalıkta daha iyi etkiler alındığından dozaj ve hastalık ayarlamalarına duyulan ihtiyaç olduğu vurgulanmaktadır (Lovestone ve ark., 2015).

Tideglusib ayrıca, yağ asidi depolanması ve glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptör gama (PPAR γ)'nın da bir agonistidir (Luna-Medina ve ark., 2007). FDA onaylı pioglitazon gibi tiazolidindionlar, antidiyabetik aktiviteye sahip PPAR γ agonistleridir. Bu nörodejeneratif işlemlere karşı bilinen potansiyele ek olarak, tideglusib benzeri bileşiklerin bir dereceye kadar antidiyabetik özellikler sergileyebileceği, eğer öyleyse hem T2DM hem AH'ye uygun bileşikler olabileceği öngörülmektedir (de Matos ve ark., 2018).

İmidazopiridin türevlerinin optimizasyonu, potansiyel bir antidiyabetik aday olarak algılanan, gelecek vaat eden bir GSK-3 β inhibitörüne yol açmıştır (Lee ve ark., 2012). Sentezlenen çeşitli analog yapıların biyolojik olarak değerlendirilmesi, sadece enzimatik aktivite ve hücresel etki üzerine değil aynı zamanda metabolik stabiliteleri ve fizikokimyasal özelliklerine odaklanan sağlam bir yapı-aktivite ilişkisi çalışmasının gerçekleştirilmesine olanak sağlamıştır. Tideglusibin aksine, bu bileşiklerin bu çalışmada sentezlenen temsili bir analogunun GSK-3 β 'nın katalitik cebi için ATP ile rekabet ettiği görülüyor. Bu bileşik daha sonra farelerde oral glukoz tolerans testi'nde değerlendirilmiş ve plazma glukoz seviyelerinde önemli bir düşüşe neden olmuşlardır; böylece, T2DM'ye karşı terapötik potansiyeli desteklenmiştir. Her ne kadar keşfedilmemiş başka mekanizmalar olsa da bu çalışma, GSK-3 β inhibisyonu ve sistemik glukoz düşürücü etkiler arasında olası bir ilişki olduğunu ortaya koymakta, böylece diyabetik hastalarda bilişsel azalmanın önlenmesi için benzer antidiyabetik yaklaşımların geliştirilmesini teşvik etmektedir. (de Matos ve ark., 2018)

4.5.2.3. Dual BACE-1 ve GSK-3 β inhibitörleri

AH'nin karmaşık ve çok faktörlü doğası ele alındığında dual BACE1/GSK-3 β inhibitörlerinin geliştirilmesini amaçlayan bir dizi triazinon türevi tasarlandı ve

sentezlendi (Prati ve ark., 2015). Fragman-dayalı bir strateji kullanarak, bir guanidin grubunu ve bir siklik amid grubunu aynı molekül içinde birleştirmek amaçlanmıştır: ilk fragman BACE1'in katalitik bölgesine bağlanmasından sorumlu iken eş zamanlı olarak GSK-3 β 'nın ATP bağlanma bölgesine bağlanmaktan sorumludur (Ghosh ve ark., 2015; Yuan ve ark., 2013).

Bu amaca dayanarak BACE1 ve GSK-3 β 'ya farklı selektivitelere bağlanan dört bileşik sentezlenmiştir. Bu maddelerden birinin yaşlılıkta beyin amiloid birikimini düşürebileceği düşünülmüştür. Bileşiklerden ikisi (en iyi GSK-3 β inhibitörleri) lipopolisakkarit kaynaklı enflamasyon ve nitrit oluşumunu önleyerek, birincil astrosit ve mikrogliya kültürlerinde önemli nöroprotektif etkiler sergilemiştir. Bu iki analog, aynı zamanda, birincil sıçan kök hücrelerinin nörosfer kültürlerinde de nörojenik etkiler göstermiş, böylece olgunlaşmamış nöronların farklılaşmasını indüklemeye ve endojen beyin rejenerasyonunu güçlendirme kabiliyetini ortaya koymuştur. Ek olarak, farelerde BBB'yi başarıyla geçmiştir. A β ve tau patolojik ağın iki ana oyuncusunu hedefleyerek, bu yapısal olarak basit ve düşük moleküler ağırlıklı, daha büyük hastalık değiştirici yaratma potansiyeli ile AD'ye karşı çok umut verici terapötik stratejilerin geliştirilmesi için kesinlikle temel olarak hizmet edebileceği düşünülmektedir. Bu bileşiğin bir GSK-3 β inhibitörü olarak, yaygın olarak ilişkili nörodejeneratif olayların gelişimini engellerken, T2DM'yi kontrol etmenin yenilikçi bir yolunu sağlayabileceği düşünülmektedir (de Matos ve ark., 2018).

4.5.3. SGLT inhibitörlerinin AH'deki yeri

Yukarıda bahsedildiği gibi T2DM ve AH oldukça benzeyen iki patolojidir ve her iki gruptan çeşitli ilaçların bir diğerinde de etkili olabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. T2DM için FDA onayını diğerlerine göre daha yeni almış olan SGLT2 inhibitörlerinin ve klinik çalışmaları sürmekte olan SGLT1 ve SGLT1/2 dual inhibitörlerinin ise AH'deki etkileri bilinmemektedir.

SGLT2 inhibitörleri, T2DM'nin tedavisi için onaylanmış oral anti-hiperglisemik ajanlardır (Nauck, 2014). SGLT2, esas olarak böbrekteki proksimal tübülün 1. ve 2. segmentlerinde eksprese edilir. Sodyum konsantrasyon gradyanına bağlı olan idrar glukozunun yeniden emiliminde önemli bir rol oynar. SGLT ortak taşıyıcı ailesi, 14

transmembran alanı ve tek bir N-glikozilasyon bölgesi ile membranı kapsayan monomer proteinleri içerir. SGLT'ler, glukoz ve galaktozu bir konsantrasyon gradyanına karşı Na^+ iyonlarının eş zamanlı taşınması ile aktarır. SGLT2 inhibitörlerinin etkilerinin ana mekanizması, böbrek geri emiliminde bir azalma yoluyla glukoz atılımının artmasına dayanır. Bu bileşiklerin, diüretik, glukozürik ve natriüretik özellikleri idrarın hacmini ve sodyum yükünü artırır (Shah ve ark., 2012). Memeli merkezi sinir sisteminde ise SGLT'lerin varlığını belirten artan sayıda rapor vardır. SGLT1 reseptörünün hipokampal cornu ammonisii'nin 1. ve 3. bölgesi ve dentat gyrus hipokampal alt alanları gibi alanlarda eksprese edildiği kanıtlanmıştır. SGLT2'nin belirgin ekspresyonu ise hipokampus, beyincik ve kan-beyin bariyeri endotel hücrelerinde tanımlanmıştır. SGLT'lerin bu özel dağılımı nöroprotektif özelliklerini öne süren ilgi çekici kanıtlardan sorumlu olabilir (Sa-Nguanmoo ve ark., 2017).

SGLT2 inhibitörlerinden dapagliflozin (Sa-Nguanmoo ve ark., 2017), empagliflozin (Lin ve ark., 2014) ve kanagliflozin (Arafa ve ark., 2017) ile yapılan çalışmalarda bu ilaçların kognitif fonksiyonda iyileşme yaptığı gösterilmiştir. Dapagliflozin'in kognitif etkinliğinin değerlendirildiği çalışmada, ayrıca dipeptidil peptidaz-4 (DPP-4) inhibitörü vildagliptinin ve her iki ilacın kombine kullanımının kognisyona etkileri de incelenmiştir. Bu çalışmada ilaçların beyin fonksiyonlarına etkisi; beyin insülin duyarlılığı, sinaptik plastisite, beyin mitokondriyal fonksiyonu, beyindeki inflamasyon ve apoptozis ile kognitif fonksiyon kapsamında değerlendirilmiştir. Çalışmada sıçanlar 16 hafta boyunca yüksek yağlı diyet ile beslenmiş ve sıçanlara 4 hafta boyunca da ilaç uygulaması yapılmıştır. 4. haftanın sonunda Morris'in su tankı testi yapılmış ve sıçanların beyin dokusu alınmıştır. Tedavilerden yalnızca dapagliflozin hipokampal sinaptik plastisitedeki bozulmayı iyileştirmiştir. Tedaviler, beyin insülin duyarlılığını artırmış; mitokondriyal ROS üretimini, mitokondriyal membran potansiyel değişimini, ayrıca yine beyinde enflamasyon ve apoptozisi de azaltmıştır. Morris'in su tankı testinde gösterilen öğrenme-bellekteki iyileşme, bu bulgularla ilişkilendirilmiştir (Sa-Nguanmoo ve ark., 2017).

SGLT2'ye yüksek selektivite ile bağlanan ve güçlü inhibisyon yapan SGLT2 inhibitörü empagliflozin ise, obezite ve T2DM özellikleri taşıyan db/db farelere 10 hafta boyunca hayvanların standart yemine karıştırılarak verilmiştir ve 9. hafta

Morris'in su tankı testi ile farelerin kognitif fonksiyonları değerlendirilmiştir. Kontrol fareleriyle kıyaslandığında db/db farelerde öğrenme-bellek fonksiyonlarının bozulduğu ve empagliflozin'in ise bu bozulmayı düzelttiği gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada empagliflozin ile serebral oksidatif strese iyileşme ve serebral BDNF seviyelerinde artış gözlenmiştir. Morris'in su testindeki öğrenme-bellek fonksiyonlarının iyileşmesinin, oksidatif stresi azaltması ve nörotrofik faktörlerden BDNF'i artırması ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Lin ve ark., 2014).

Kanagliflozinin kognitif etkilerinin değerlendirildiği çalışmada ise skopolamin ile indüklenmiş Alzheimer modelinde 2 haftalık kanagliflozin tedavisi uygulanmış ve 13. gün Y maze testi ile kognisyon değerlendirilmiştir. Bu testin sonuçlarına göre kanagliflozin öğrenme-bellekte iyileşme sağlamıştır. Bunun yanında kanagliflozinin asetilkolinesteraz aktivitesini ve monoamin sisteminde yaptığı değişikliklerle hafıza bozukluğunu düzenlediği belirtilmiştir (Arafa ve ark., 2017).

Tüm bu mekanizmalara ek olarak SGLT inhibitörlerinin Alzheimer ile yolunu kesiştiren bir özelliği daha bulunmaktadır. Moleküler yerleştirme çalışmaları (molecular docking studies)'na göre çeşitli SGLT inhibitörlerinin SGLT inhibisyonu yanında asetilkolinesteraz inhibisyonu yaptığı bulunmuştur (Rizvi ve ark., 2014; Shaikh ve ark., 2016). Dapagliflozinle yapılan bir moleküler yerleştirme çalışmasında hidrofobik ve katyon-pi etkileşimleri dapagliflozinin SGLT2 ve AChE enziminin katalitik bölgesi içinde doğru konumlandırılmasında önemli rol oynar ve böylece bağlama yapılmasına izin verilir. Böylece dapagliflozinin SGLT2 ve AChE'nin güçlü bir ikili inhibitörü gibi davranabileceği belirtilmiştir. Burada tanımlanan sonuçların, diyabetle ilişkili nörolojik bozukluklara karşı ileride yapılacak ikili tedavinin temelini oluşturabileceği belirtilmiştir (Shaikh ve ark., 2016). Aynı ikili etki yine moleküler yerleştirme çalışmaları ile sotagliflozin (Shakil, 2017) ve kanagliflozin (Rizvi ve ark., 2014) için de bulunmuştur.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Kimyasal Maddeler

Glukoz, Streptozotosin (STZ), Dapagliflozin, Metformin ve Rivastigmin Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, Texas, USA); Florizin Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, ABD)'den temin edilmiştir.

ELISA Kitleri; Bioassay Technology Laborator, Korain Biotech Co. Ltd. (Shanghai, China)'dan temin edilmiştir.

Eli Lilly firmasından, Humulin® müstahzar isimli insülin temin edilmiştir.

5.2. Cihazlar

Bu tez çalışması, Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı ve Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yürütüldü. Kullanılan cihazlar:

- Açık Alan Testi Kafesi
- MAY Pasif Sakınma Cihazı
- Morris'in Su Tankı
- Hettich K2S Soğutmalı Santrifüj
- Heraeus Biofuge Pcio Ependes Santrifüj
- BioTek Epoch Elisa Reader
- ADAM 80 PW124 Hassas Terazî
- IKA Ultra-Turrax T25 Homojenizatör
- Bandelin Sonopuls Ultrasonik Homojenizatör
- ARCTIKO Derin Dondurucu (-80°C)'dur.

5.3. Deney Hayvanları

Bu tez çalışmasında 72 adet 250-350 g ağırlığında Sprague-Dawley sıçan kullanılmıştır. Çalışma yapılmadan önce Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik onayı (86.2017.mar) alınmıştır. Çalışmada kullanılan sıçanlar Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiş ve tez çalışmasının hayvan deneyleri kısmı bu merkezde gerçekleştirilmiştir. Hayvanlar deney süresince 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde, 22 ± 2 °C sıcaklık ve %60 oranında nem içeren ortamda tutulmuş sürekli olarak yem ve su verilmiştir.

5.4. Deney Grupları

Bu tez çalışmasında Sprague-Dawley sıçanlar 2 gruba ayrılmıştır:

- I. Kontrol grubu sıçanlar (n=12): hayvanlar 8 hafta boyunca standart sıçan yemi ile beslenmiş ve 4. haftanın sonunda streptozotosin (STZ)'i taklit etmesi için serum fizyolojik (1 ml/kg, i.p.) enjekte edilmiştir.
- II. Model oluşturulan sıçanlar (n=60): hayvanlar 8 hafta boyunca %57 enerji içeren yüksek yağlı diyet ile beslenmiş ve bu hayvanlara 4. haftanın sonunda düşük doz (35 mg/kg, i.p.) STZ uygulanmıştır (Wongchitrat et al., 2016). STZ uygulamasından 1 gün sonra glukometre ile sıçanların kan glukozu ölçülmüş; kan glukozu 200 mg/dl'nin üstünde olan sıçanlar diyabetli kabul edilmiş, 5 gruba ayrılmış ve ilaç uygulamaları intragastik gavaj ile verilmiştir. Kontrol ve Alzheimer gruplarındaki hayvanlara için intragastrik olarak distile su verilmiştir.

II.1. Alzheimer grubu

II.2. Alzheimer+Dapagliflozin grubu: 1 mg/kg/gün (Sa-Nguanmoo et al., 2017)

II.3. Alzheimer+Florizin grubu: 30 mg/kg/gün (Powell et al., 2014)

II.4. Alzheimer+Metformin grubu: 400 mg/kg/gün (Asadbegi et al., 2016)

II.5. Alzheimer+Rivastigmin tedavi grubu: 2 mg/kg/gün (Gothwal et al., 2019)

5.5. Deney Hayvanlarının Diyabet Durumlarının Değerlendirilmesi

5.5.1. Deney hayvanlarının vücut ağırlıklarının ölçümü

Sıçanların vücut ağırlıkları çalışmaya başlamadan önce (0. hafta) ve 1. 2., 3., 4., 5., 6., 7. ve 8. haftaların başında ölçüldü.

5.5.2. Haftalık kan glukozu ve oral glukoz tolerans testi'nin uygulanması

Haftalık kan glukozu, sıçanlar öncesinde aç bırakılmaksızın herhangi bir zamanda, sıçanlara tedavilerin verilmesinden yarım saat sonra kuyruk veninden alınan kanda glukometre ile 4.-8. haftalar arasında haftada bir kez ölçüldü.

OGTT, sıçanların glukoz metabolizmasını düzenleyebilme yeteneğini ve glisemik değişiklikleri değerlendirebilmek için ölçüldü. Deneyin 7. haftasında 12 saatlik açlık sonrası, tedaviler uygulandı ve 30 dk sonra 2 g/kg glukoz i.g. olarak verildi. Kan glukoz seviyesi; enjeksiyondan sonra 0., 30., 60., 90. ve 120. dakikalarda kuyruk veninden alınan kanda glukometre ile ölçüldü (Shewamene ve ark., 2015).

5.5. Deney Hayvanlarının Kognitif Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi

5.5.1. Açık alan testi

Açık alan testi, deney hayvanlarında lokomotor aktiviteyi değerlendirmek için uygulandı. Test aparatı, hayvanların daha önce görmediği kare tabanlı Pleksiglass materyalden yapılmış üstü açık siyah yüzeyli bir kutudur (50*50*40 cm). Zemin her biri 10*10 cm olan 25 eşit kareye bölünmüştür ve iki bölgeden oluşmaktadır: çevresel bölge (kutu duvarlarından içeriye doğru birer karelik kısım, 16 kare) ve merkez bölge (kutunun ortasındaki 9 karelik kısım). Her hayvan kutunun içine test için ayrı ayrı alındı, test 5 dakika süreyle uygulandı ve bir diğer hayvan teste alınmadan önce kutunun yüzeyi etanol ile temizlendi. Hayvanların kutu içindeki davranışları video kamera ile kaydedildi ve iki araştırmacı tarafından katedilen mesafe ve şahlanma sayısı değerlendirildi. Geçilen karelerin sayısı, katedilen mesafe olarak değerlendirildi ve şahlanma sayısı ile beraber lokomotor aktivitenin bir ölçüsü olarak kabul edildi (Calzavara ve ark., 2009).

5.5.2. Yeni obje tanıma testi

Yeni obje tanıma testi, nispeten hızlı bir davranış testidir. Testte, hayvanlarda doğal olarak harekete geçen keşfetme amaçlı yeni nesnelere olan ilgi ölçüldü. Test 50x50x40 cm boyutlarındaki üstü açık siyah yüzeye sahip pleksiglastan yapılmış bir düzenekte yarı karanlık ortamda gerçekleştirildi. Bir hayvanın testi tamamlandıktan sonra diğer hayvanı teste almadan önce düzenek ve objeler etanol ile silinerek temizlendi. Yeni obje tanıma testi bir gün alıştırma ve bir gün test olmak üzere iki günlük bir süreçten oluşmaktadır:

Birinci gün (Alıştırma günü): Aynı kafesteki tüm hayvanlar (n=4) grup halinde pleksiglas düzeneğe konuldu ve 60 dakika ortamda hiçbir obje olmaksızın test düzeneğine alışmaları sağlandı. Bu süreç tüm hayvanlar için tekrarlandı.

İkinci gün (Test günü): Test, 60 dakika ara ile birbirinden ayrılmış iki adet 3 dakikalık periyottan oluşmaktadır. Birinci 3 dakikalık periyot tanıma evresidir ve bu periyotta birbiri ile aynı iki obje test düzeneğine yerleştirildi ve 3 dakikalık süreçte deney hayvanının düzenekte serbestçe gezinerek bu objeleri tanınması sağlandı. 3 dakikalık süre dolduğunda hayvan düzenekten alındı ve kafesine konuldu (T1). 60 dakikalık aradan sonra hayvanın T1’de görmüş olduğu objelerden bir tanesi değiştirildi ve tekrar aynı düzeneğe alınarak 3 dakika boyunca hayvanın düzenekte her iki obje ile de serbestçe vakit geçirmesi sağlandı (T2).

Her iki periyot da (T1 ve T2) bilgisayar destekli kamera ile kayıt altına alındı ve hayvanların T2 de her iki objeye karşı ilgileri koklama, yalama, dokunma ve tırmanma davranışları değerlendirilerek skorlandırıldı. Hayvanın yeni objeye karşı ilgisinin eski objeye karşı ilgisine oranı bu hayvanın öğrenme ve bellek fonksiyonunun bir ölçüsü olarak kabul edildi (Bevins ve Besheer, 2006).

5.5.3. Pasif sakınma testi

Pasif sakınma testi, uzun ve kısa süreli anıların ilişkisel bir şekilde incelenmesini sağlayan korku uyaranının kullanıldığı bir testtir. Testte hayvanların yeni bir ortama girdiklerinde doğal olarak karanlık ortama yönelmelerinden yararlanılır. Pasif sakınma cihazı, üzerinde aralarında geçiş kapısı bulunan bir duvarla ayrılmış iki farklı bölmeden (her biri 20x25x30) oluşmaktadır. Bölmelerden biri ışık yardımıyla aydınlık

tutulurken diğer bölge karanlık opak duvarlara sahiptir. Her iki bölmedeki zemin metal ızgaralar ile kaplıdır, karanlık bölmedeki metal ızgaralardan elektrik şoku verilmektedir. Test 2 ardışık gün uygulandı. Birinci gün uygulanan kazanma deneyinde, her bir sıçan tek tek ışıklı bölmeye yerleştirildi ve karanlık bölmeye geçtiğinde ızgara zemini üzerinden ayaklarına elektrik şoku uygulandı (40 V, 0.5 A. 5s). Hayvanların doğal olarak karanlık bölmeye geçmeleri beklenmektedir. Ardından sıçan hızlı bir şekilde alınarak kafesine konuldu. Sakınma deneyi 24 saat sonra gerçekleştirildi, sıçanlar yine ışıklı bölmeye konuldu. Işıklı bölmeye konduktan sonra karanlık bölmeye geçiş süresi kaydedildi, bu evrede elektrik şoku verilmedi. Hayvanlar 300 saniye içerisinde karanlık bölmeye geçmezse, test sona erdirildi ve geçiş süresi 300 saniye kabul edildi (Abdel-Aal ve ark., 2011).

5.5.4. Morris'in su tankı testi

Morris'in su tankı testi, hayvanların uzaysal öğrenme-belleklerini değerlendirme amacıyla kullanılan bir testtir. Testte kullanılan su havuzu paslanmaz çelik dairesel bir tanktan (çapı 160 cm, yüksekliği 40 cm) oluşmaktadır. Tank 4 sabit noktadan 4 kadrana oluşturacak şekilde bölündü. Bu havuz içerisinde havuzla aynı renkte (görüntüyle ilgili herhangi bir yanlış pozitif sonucu elimine etmek için) 10x10x10 cm ölçülerinde bir kaçış platformu yerleştirildi. Bu platform çalışma boyunca havuzun sabit bir kadranda ve su yüzeyinin 1.5 cm altında tutuldu. Sıçanlar yüzleri duvara bakar bir halde kaçış alanı bulunmayan bir kadranın kenarında bir başlangıç noktasına yavaşça bırakıldı. Sıçan 75 saniye içerisinde kaçış platformunu bulmayı başaramazsa kibarca platforma yönlendirildi ve 20 saniye boyunca üzerinde kalmasına izin verildi. Hayvanlara 4 ardışık gün boyunca yaklaşık 10'ar dakika ayrılarak 4 deneme yapılmış ve bu süre zarfında platforma ulaşmak için geçen süre değerlendirildi. 5. gün, önceki denemeden 24 saat sonra, kaçış platformu çıkarıldı ve hayvanlar çalışmayı sonlandırmadan önce 60 saniye boyunca serbest bir şekilde yüzmeye bırakılarak prob çalışmaları başlatıldı. Bu prob çalışmasında hayvanın hedef kadrana ulaşma süresi ve hedef kadranda geçirdiği süre hesaplandı. Bu test uzaysal öğrenme ve hafızanın bir ölçüsü olarak kabul edildi. Datalar video kamera ile kaydedildi (Abdel-Aal ve ark., 2011).

5.6. Deneyin Sonlandırılması

8 haftalık süreçten sonra deney, 9. haftanın başında sıçanların dekapite edilmesi ile sonlandırıldı. Aşağıda açıklanan biyokimyasal ve histolojik analizler için ilgili dokular alındı.

5.7. Biyokimyasal Analizler

5.7.1. ELISA analizleri

Sıçanların dekapite edilmesinin ardından, çeşitli dokuları alınarak aşağıdaki proteinler ELISA metoduyla ölçüldü:

Serumda: İnsülin

Pankreasta: İnsülin, A β ₁₋₄₂,

Serebral kortekste: İnsülin, A β ₁₋₄₂, fosforile tau, AChE, SGLT-2, GSK-3 β

5.7.1.1. ELISA analizlerinin yapılması

Enzime bağlı immünosorbent testi (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) analizlerine başlamadan önce dokularda homojenizasyon işlemi yapıldı:

Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) hazırlandı: 1 adet PBS tableti 100 ml deiyonize suda çözüldü, ardından çözelti hızlıca buz içine alınarak süreç boyunca buz içinde muhafaza edildi. Dokular önce tartılıp, ağırlıkları not edildi, ardından küçük parçalara ayrıldı ve buz içindeki PBS çözeltisinden ilave edildi. PBS çözeltisi doku ağırlığının 10 katı kadar hacimde eklendi. Doku homojenatı, buz içerisinde tutularak bıçaklı homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Ardından ultrasonik cihaz ile homojenizasyon işlemine devam edildi. 3000 rpm’de 20 dakika süre ile doku homojenatının bulunduğu tüpler santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra tüpte üstte kalan süpernatant ependorf tüplerine alındı. Ardından ELISA analizi yapılana kadar -20 °C’de saklandı.

Örnekler oda sıcaklığında 10-20 dk bekletildi ve yaklaşık 20 dk 3000 rpm’de santrifüj edildi. Kit ve örnekler çalışmaya başlamadan önce 30 dakika oda sıcaklığında

bekletildi ve ardından standartlar hazırlandı. 96 kuyucuklu ELISA plakası kullanıldı. Tüm standartlar ve körler için ELISA plakasında 3'er tane kuyucuk ayrıldı. ELISA kâğıdına sırayla konulacak örneklerin grup isimlerini yazıldı ve o sırayla kuyucuklara ekme yapıldı. Ardından antikor ve streptavidin eklendi. Plaka hafifçe çalkalanıp, membran ile kapatıldı ve 37 °C'de 60 dk inkübe edildi. Yıkama suyu hazırlandı ve plakanın yıkama işlemi gerçekleştirildi. Bütün kuyucuklara sırasıyla Kromojen A ve Kromojen B eklendi ve karışması için nazikçe çalkalandı, plaka membran ile örtüldü ve 37 °C'de 10 dk inkübe edildi. Bu inkübasyon esnasında mikrolaka okuyucu hazır hale getirildi. Durdurma çözeltisi her kuyucuğa eklendi ve reaksiyon sonlandırıldı. Mikrolaka okuyucu ile 450 nm'de 10 dakika içinde okuma işlemi yapıldı.

5.7.2. Gen ekspresyonu analizleri

5.7.2.1. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Homojenize edilmiş halde -80 °C'de muhafaza edilen pankreas ve korteks doku örnekleri buz üzerine alındı. Çalışma ortamı ve kullanılacak malzemeler RNase'dan arındırıldı. Doku örnekleri Thermo Scientific™ GeneJET RNA Purification Kitinin önerdiği protokole uygun şekilde izole edildi. RNA'ların kör olarak su kullanılarak picodrop cihazında konsantrasyonları ölçüldü. Komplementer DNA (cDNA) izole edebilmek için OneScript Plus cDNA Synthesis Kit (abmGood) kullanıldı (Tablo 1). İzole edilen cDNA'lar -20 °C'de muhafaza edildi.

Tablo 1. RT-PCR koşulları

Reaksiyon İçerikleri	Son Konsantrasyon
Total RNA	1 ng
Oligo(dT) Primer (10 µM)	0.5 µM
dNTP mix (10 mM)	500 µM
RNAz uzaklaştırılmış su	x
65 °C 5 dakika	
5X reaksiyon tamponu	1X
RNaseOFF Ribocuklease inhibitor (40 U/µL)	20 U
OneScript Plus RTase (200 U/µL)	200 U
Son hacim	20 µL
50 °C 15 dakika 85 °C 5 dakika	

5.7.2.2. Gerçek zamanlı PCR

Light Cycler 480-II (Roche Diagnostic) cihazı kullanılarak Real time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) (rtPCR) yapıldı. Reaksiyon Abm BrightGreen 2X qPCR Mastermix kitinin (abmGood) protokolü doğrultusunda son hacmi 20 µL olacak şekilde hazırlandı. Tablo 2’de belirtilen sıçan dokusuna spesifik olarak tasarlanan p38 ekspresyon primerine ek olarak normalizasyon sağlamak için Actin-β primeri kullanıldı (Tablo 3) (Şahin ve ark., 2020).

Tablo 2. Kullanılan ekspresyon primerleri

Actin- β ileri	5' AGA GAA GCT GTG CTA TGT TG 3'
Actin- β geri	5' GTA CTC CTG CTT GCT GAT CC 3'
p38 ileri	5' GGG GCA GAT CTG ACA ACA T 3'
p38 geri	5' GAG CCA GTC CAA AAT CCA GA 3'

Tablo 3. Gerçek zamanlı PCR basamakları

Basamak	Döngü	Tm	Süre
1	1	95 °C	10 dk
2	40	95 °C	15 sn
		60 °C	60 sn
3	1	65 °C-95 °C	5 sn

5.7.2.3. Sonuçların analizi

Light Cycler 480-II (Roche Diagnostic) cihazının otomatik olarak hesapladığı Ct değerleri Livak metodu kullanarak analiz edildi (Livak ve Schmittgen, 2001). Normalizasyon sağlamak için kullanılan Actin- β Ct değerinin ortalamasından çıkarıldı. Elde edilen değerın kuvveti 2 tabanından alındı. Hiçbir uygulama yapılmamış olan kontrol grubu 1 birim baz alınarak değerlendirildi. Hastalık modeli ve farklı uygulamalar yapılmış grup değerleri kontrol gruplarının değerlerine bölünerek bir değer elde edildi. Bu değerler 1'in katı olacak şekilde belirlendi. GraphPad Prism 8.0.2 versiyonu (GraphPad Software, San Diego California, USA) kullanılarak bu değerlerden grafikler oluşturuldu. Minitap 14 software (One Way ANOVA) programı kullanılarak çalışma grupları arasındaki istatistiksel analiz yapıldı (Aydemir ve ark., 2018). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$ anlamlı kabul edilmiştir.

5.8. Histolojik Analizler

5.8.1. Histopatolojik analizler

Deney hayvanları sakrifiye edildikten sonra, elde edilen beyin ve pankreas dokuları hızlıca serum fizyolojik ile yıkanarak ışık mikroskopik incelemeler için %10'luk nötral tamponlu formalin içerisinde 72 saat fikse edildi. Dokular daha sonra %70, %90, %96 ve %100'lük alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilmiş, ardından 2x10 dakika boyunda ksilende tutularak şeffaflaştırıldı, 60 °C'lik etüvde parafinde gece boyunca bekletildikten sonra gömme cihazı ile kasetler içerisinde bloklandı. Parafin bloklardan yaklaşık 4 µm kalınlığında alınan kesitlere genel morfolojik değerlendirme yapabilmek için Hematoksilin ve Eosin (H&E) boyası uygulandı. Kesitler daha sonra ışık mikroskobu (Leica DM 1000) ile incelenerek fotoğraflandı. (Cam ve ark., 2021)

5.8.2. İmmünohistokimyasal analizler

Deney gruplarından alınan beyin dokusunun korteks ve hipokampus bölgeleri ayrılarak, A β ve tau immünohistokimyası için %10'luk nötral tamponlu formalin içerisinde 72 saat fikse edildi. Pozitif şarjlı lamlara alınan 4 µm kalınlığında parafin kesitler 1 gece boyunca 37 °C'lik etüvde bekletildikten sonra, deparafinize etmek amacıyla ksilende 3x5 dakika tutulup, %96'luk alkolde 2 kere 10 dakika bekletildikten sonra endojen enzim blokajı yapmak için metanol ile hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksitte 20 dakika bekletildi. Önce musluk suyu sonra distile suda yıkama işleminden sonra antijen geri kazanımı için ısıtılmış sitrat tamponda (pH 6.0, 60 °C'de) 20 dakika 200 W mikrodalgaya maruz bırakıldı. Oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakılan kesitler PBS ile 2 kere 5 dakika yıkandıktan sonra bloklama solüsyonunda 10 dakika bekletildi. Korteks ve hipokampus kesitleri gece boyunca anti-A β (ABCAM, ab10148) ve anti-tau (ABCAM, ab131354) primer antikoru ile inkübe edildi (negatif kontrol için primer antikor yerine PBS ile inkübe edildi), ardından biyotinlenmiş sekonder antikorlar ve streptavidin-peroksidaz konjugatları (ABCAM, ab236466) ile inkübasyon yapıldı. Kesitler, PBS içinde yıkandı, sıvı diaminobenzidin (DAB) ile ortaya çıkarıldı ve hematoksin ile zıt boyama yapıldı. Her iki primer antikorun ekspresyonu x20 büyütmede ışık mikroskopisi altında fotoğraflandı. (Gocmez ve ark., 2019)

5.9. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Yazılım, San Diego, Ca, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak yapıldı. Tüm veriler ortalama $\pm$ standart hata (SEM) olarak ifade edildi. OGTT ve Morris'in su tankı testinde çift yönlü varyans analizi, diğer testlerde tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Tüm testlerde gruplar arası karşılaştırmalar için Tukey post hoc test kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

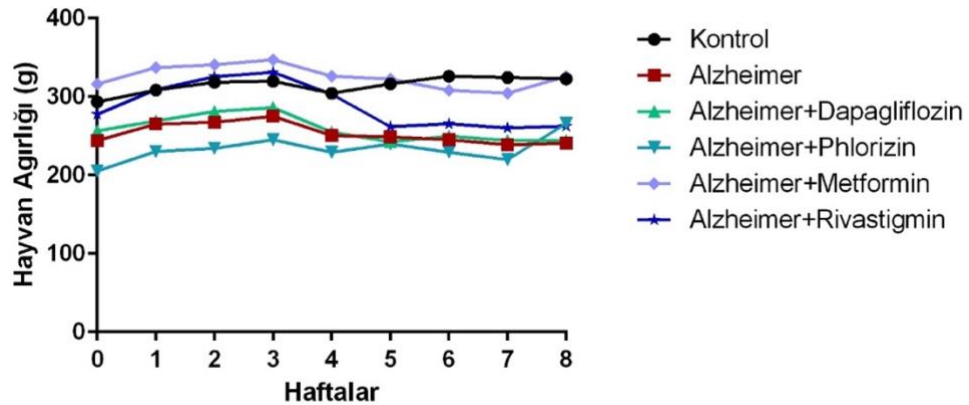


6. BULGULAR

6.1. Deney Hayvanlarının Diyabet Durumlarının Değerlendirilmesi

6.1.1. Ağırlık ölçümlerinin değerlendirilmesi

Deney hayvanlarının vücut ağırlıkları çalışmaya başlamadan önce (0. haftanın başında) ve 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. ve 8. haftaların başında ölçüldü. Şekil 1’de haftalara göre deney hayvanlarının ağırlık ölçümleri verildi. Tüm deney süresince hayvan grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlemlendi. Kontrol grubu hariç diğer gruplar kendi içlerinde değerlendirildiğinde görülmektedir ki ilk 4 hafta boyunca hayvan ağırlıkları artarken, 4. hafta düşük doz STZ uygulanmasından sonra hayvan ağırlıklarında düşüş meydana gelmiştir.

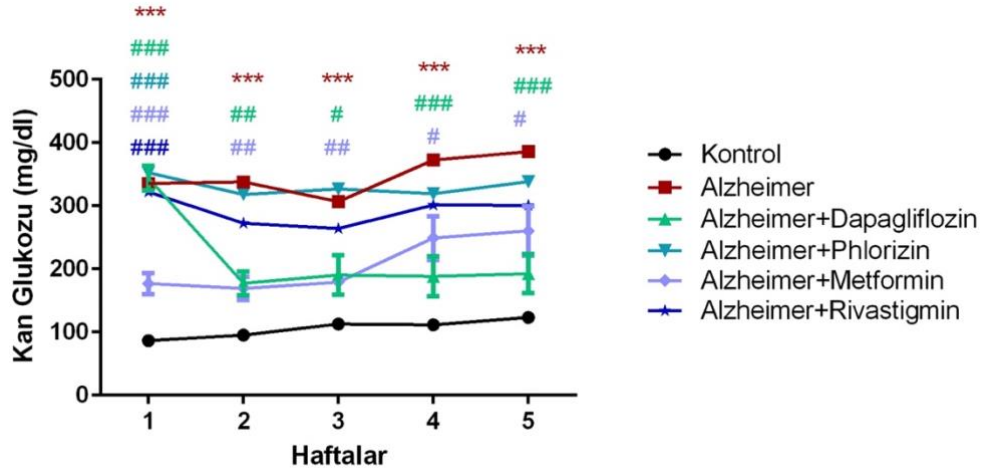


Şekil 1. Haftalara göre hayvan ağırlıkları (g). İstatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı aracılığıyla two-way ANOVA ve post test olarak Tukey kullanılarak yapılmıştır.

6.1.2. Kan glukoz ölçümlerinin değerlendirilmesi

Herhangi zamanda tayin edilen kan glukoz ölçümü deney hayvanlarına tedavilerin uygulanmasından 30 dakika sonra kuyruk veninden alınan kanda glukometre kullanılarak 4.-8. haftalar arasında haftada bir kez yapıldı. Şekil 2’deki grafik incelendiğinde Alzheimer grubunun, kontrol grubuna kıyasla kan glukoz seviyeleri ölçüm süresince yüksek bulundu ($p < 0.001$). Alzheimer+Dapagliflozin grubunun kan glukoz değerleri, Alzheimer grubu ile kıyaslandığında 4. haftada aralarında anlamlı bir

fark gözlenmezken 5. haftadan itibaren anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.05$, $p<0.001$). Metformin grubunun kan glukoz değerleri, Alzheimer grubu ile kıyaslandığında yine 5. haftadan itibaren Alzheimer grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.01$, $p<0.05$, $p<0.05$). Florizin ve Rivastigmin tedavileri ise kan glukozunu Alzheimer grubuna göre düşürmede başarılı olmadı.



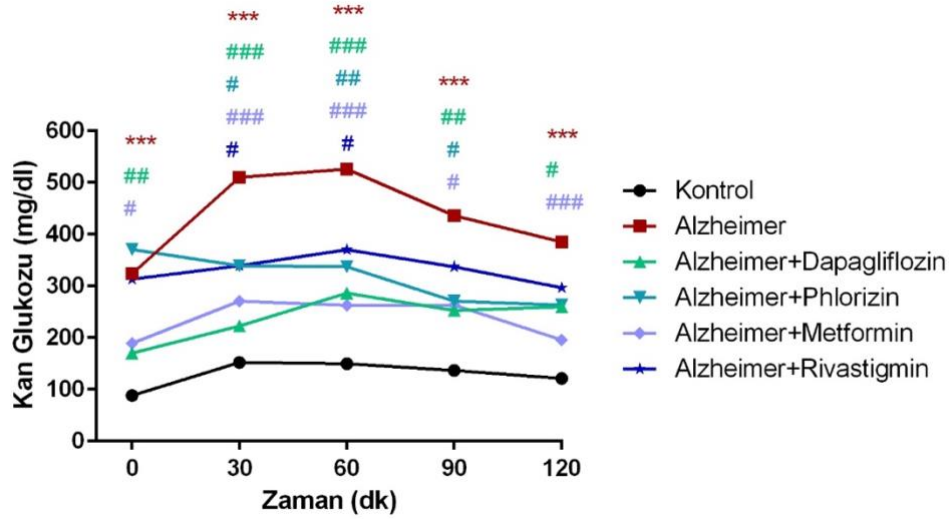
Şekil 2. Haftalara göre kan glukozu (mg/dl). İstatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı aracılığıyla two-way ANOVA ve post test olarak Tukey kullanılarak yapılmıştır. *** $p<0.001$, # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$. *: Kontrol grubuna karşı, #: Alzheimer grubuna karşı

6.1.3. Oral glukoz tolerans testi ölçümlerinin değerlendirilmesi

OGTT, sıçanların glukoz metabolizmasını düzenleyebilme yeteneğini ve glisemik değişiklikleri değerlendirebilmek için ölçüldü. Deneyin 7. haftasında, 12 saatlik açlık sonrası, tedaviler uygulandı ve 30 dk sonra 2 g/kg glukoz i.g. olarak verildi. Kan glukoz seviyesi; enjeksiyondan sonra 0., 30., 60., 90. ve 120. dakikalarda kuyruk veninden alınan kanda glukometre kullanılarak ölçüldü.

Şekil 3'teki sonuçlara göre tüm ölçümlerde kontrol grubu ile Alzheimer grubu arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($p<0.001$). Tedavi grupları incelendiğinde Alzheimer+Dapagliflozin grubunda glukoz yüklemesinden sonra 60. dakikaya kadar kan glukozunda yükselme gözlemlenirken, 60. dakikadan sonra düşüş meydana geldi; Alzheimer grubuyla kıyaslandığında ise anlamlı olarak kan glukoz seviyeleri daha

düşük seyretti (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.01$, $p<0.05$). Diğer bir tedavi grubu metformine bakıldığında 30. dakikaya kadar kan glukozunda yükselme meydana gelirken, 30. dakikadan sonra düşüş başladı; Alzheimer grubu ile kıyaslandığında da Dapagliflozin gibi daha düşük kan glukoz seviyeleri gözlemlendi (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.05$, $p<0.001$). Rivastigmin tedavisi ise 30. ve 60. dakikalarda Alzheimer grubuna göre daha düşük kan glukozu seviyelerine sahipken diğer ölçümlerde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı.



Şekil 3. Oral glukoz tolerans testine göre zamana bağlı kan glukozu (mg/dl). İstatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı aracılığıyla two-way ANOVA ve post test olarak Tukey kullanılarak yapılmıştır. *** $p<0.001$, # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$. *: Kontrol grubuna karşı, #: Alzheimer grubuna karşı

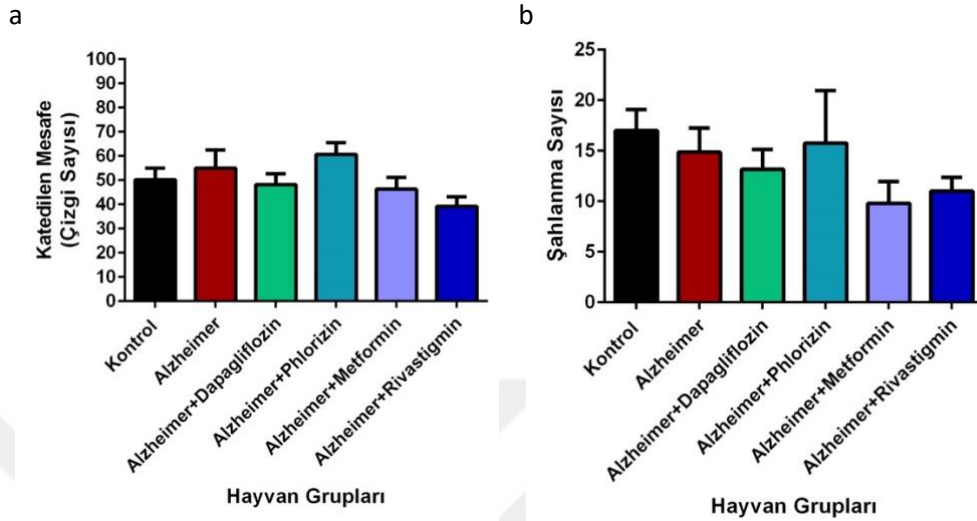
6.2. Deney Hayvanlarının Kognitif Durumlarının Değerlendirilmesi

Deney hayvanlarında uygulanan davranış deneyleri 8 haftalık deney protokolünün 7.-8. haftalarında yapıldı.

6.2.1. Açık alan testi sonuçlarının değerlendirilmesi

Açık alan testi kapsamında katedilen mesafe ve şahlanma sayısı değerlendirildi ve lokomotor aktivitenin ölçüsü olarak kabul edildi. Şekil 4'te verilen katedilen mesafe ve şahlanma sayısı sonuçları incelendiğinde tüm hayvan grupları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı gözlenmektedir. Bu sonuç hayvanlar arasında lokomotor aktivite

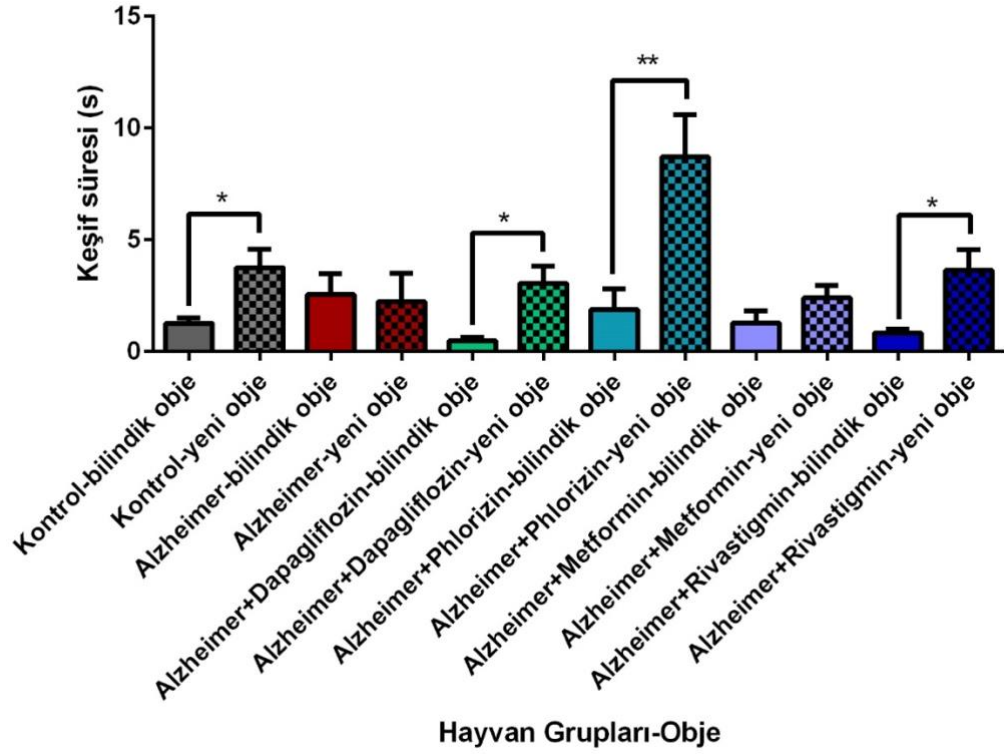
açısından bir farklılık olmadığını göstermektedir. Dolayısı ile hayvanların lokomotor aktivitelerine bağlı olarak değişebilecek yeni obje tanıma, pasif sakınma ve Morris'in su tankı testlerindeki davranış parametreleri olumsuz anlamda etkilenmeyecektir.



Şekil 4. Açık alan testine göre (a) katedilen mesafe (geçilen çizgi sayısı) ve (b) şahlanma sayısı. İstatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı aracılığıyla one-way ANOVA ve post test olarak Tukey kullanılarak yapılmıştır.

6.2.2. Yeni obje tanıma testi sonuçlarının değerlendirilmesi

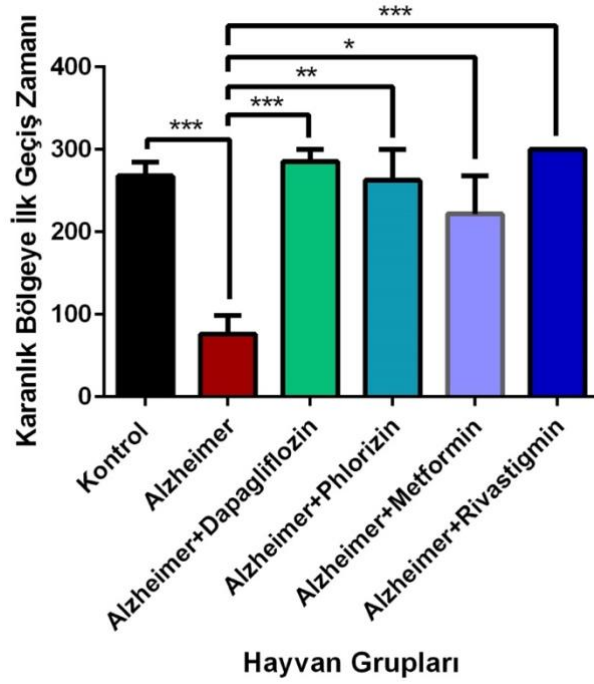
Yeni obje tanıma testinde bilindik ve yeni objelerin keşif süresi, hayvanların nesnelere dokunması, yalması ve koklaması ile belirlendi ve sonuçlar şekil 5’de verildi. Keşif süreleri incelendiğinde kontrol grubuna ait bilindik obje ve yeni obje keşif süreleri arasında anlamlı olarak farklılık meydana geldi ($p < 0.05$). Alzheimer grubu incelendiğinde ise bilindik ve yeni obje keşif süreleri arasında farklılık gözükmemektedir; bu sonuç hastalığın başarılı bir şekilde indüklendiğini göstermektedir. Tedavi gruplarından Dapagliflozin, florizin ve rivastigmine ait sonuçlar incelendiğinde keşif süreleri arasında anlamlı farklılık gözükmemektedir (sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.01$ ve $p < 0.05$); yeni objeye olan ilginin artışı bu ilaç tedavilerinin hayvanlarda Alzheimer hastalığında öğrenme bellekte iyileşmeye yardımcı olduğunu göstermektedir. Tedavilerden metformin ise keşif süreleri arasında anlamlı bir değişikliğe sebep olmadı.



Şekil 5. Yeni obje tanıma testine göre keşif süresi (s) (geçilen çizgi sayısı). İstatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı aracılığıyla one-way ANOVA ve post test olarak Tukey kullanılarak yapılmıştır. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

6.2.3. Pasif sakınma testi sonuçlarının değerlendirilmesi

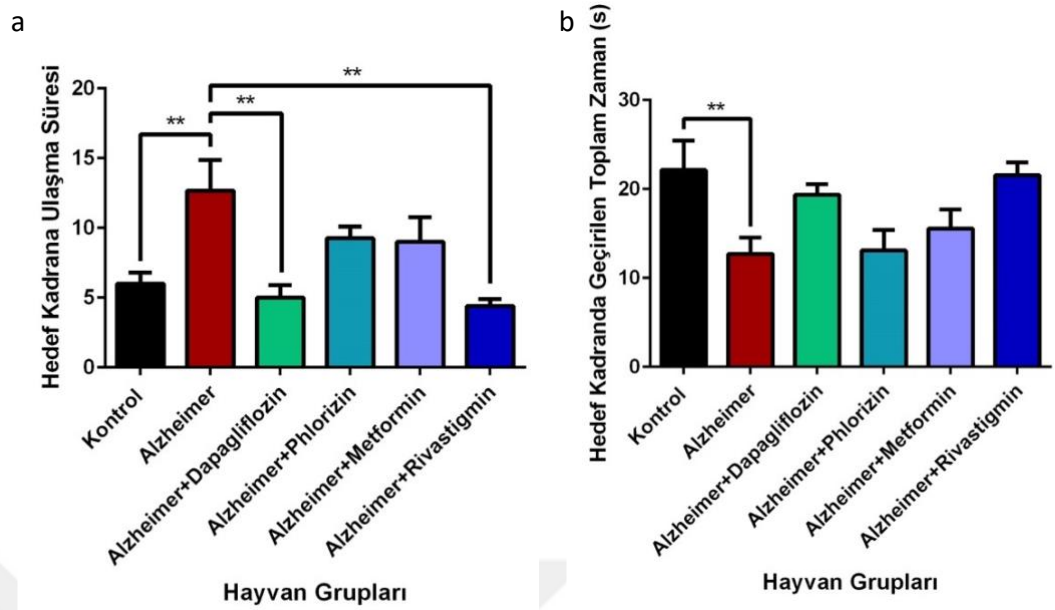
Pasif sakınma sonuçlarının değerlendirildiği Şekil 6 sonuçlarına göre Alzheimer grubunda karanlık bölgeye ilk geçiş zamanında, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş meydana gelmedi ($p<0.001$). Tüm tedavi gruplarında Alzheimer grubuna kıyasla karanlık bölgeye ilk geçiş zamanında artış gözlenirken en yüksek artış dapagliflozin ve rivastigmin tedavileri ile meydana geldi ($p<0.001$), bu artışı florizin ($p<0.01$) ve ardından metformin ($p<0.05$) takip etmektedir.



Şekil 6. Pasif sakınma testine göre karanlık bölgeye ilk geçiş zamanı (s). İstatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı aracılığıyla one-way ANOVA ve post test olarak Tukey kullanılarak yapıldı. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

6.2.4. Morris'in su tankı testi sonuçlarının değerlendirilmesi

Morris'in su tankı testinde prob test gününde hedef kadrana ulaşma süresi ve hedef kadranda geçirilen zaman sonuçların değerlendirilmesinde kullanıldı. Şekil 7'de verilen hedef kadrana ulaşma süreleri incelendiğinde Alzheimer grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir yükselme meydana geldi ($p<0.01$), dapagliflozin ve rivastigmin tedavileri ise bu artışı anlamlı olarak düşürdüler ($p<0.01$). Diğer tedavi gruplarında ise Alzheimer grubuna göre anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Şekil 7'de hedef kadranda geçirilen toplam zaman değerlendirildi ve yalnızca Alzheimer ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlemlendi ($p<0.01$). Tedavi grupları ise Alzheimer grubunda meydana gelen bu düşüşü anlamlı olarak artıramadı.



Şekil 7. Morris'in su tankı testine göre (a) hedef kadrana ulaşma süresi (s) ve (b) hedef kadranda geçirilen toplam zaman. İstatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı aracılığıyla one-way ANOVA ve post test olarak Tukey kullanılarak yapıldı. ** $p<0.01$.

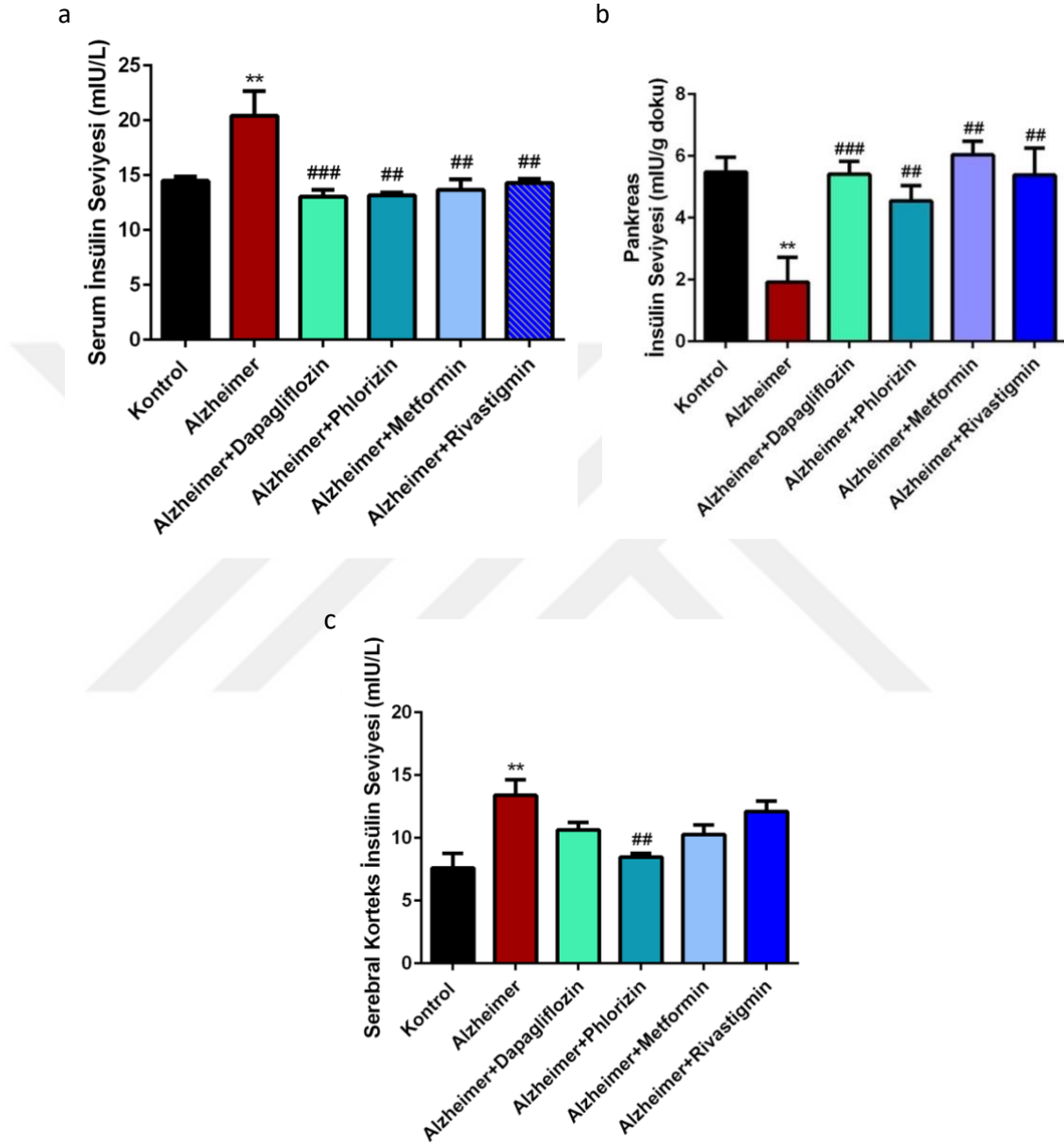
6.3. Biyokimyasal Analizlerin Değerlendirilmesi

6.3.1. ELISA analizlerinin değerlendirilmesi

6.3.1.1. Serum ve serebral korteks dokusunda insülin seviyelerinin değerlendirilmesi

İnsülin seviyesi sıçanlardan alınan serum, pankreas ve serebral korteks dokusunda ELISA yöntemi ile incelendi ve sonuçlar Şekil 8'de verildi. Serum sonuçlarına göre insülin seviyeleri kontrol grubuna kıyasla Alzheimer grubunda yükseldi ($p<0.01$), Alzheimer grubuna kıyasla Alzheimer+Dapagliflozin ($p<0.001$), Alzheimer+Florizin ($p<0.01$), Alzheimer+Metformin ($p<0.01$) ve Alzheimer+Rivastigmin ($p<0.01$) gruplarında düşürdü. Pankreas sonuçlarına göre insülin seviyeleri kontrol grubuna kıyasla Alzheimer grubunda düştü ($p<0.01$), Alzheimer grubuna kıyasla Alzheimer+Dapagliflozin ($p<0.001$), Alzheimer+Florizin ($p<0.01$), Alzheimer+Metformin ($p<0.01$) ve Alzheimer+Rivastigmin ($p<0.01$) gruplarında düştü. Serebral korteks sonuçlarına göre insülin seviyeleri kontrol grubuna kıyasla

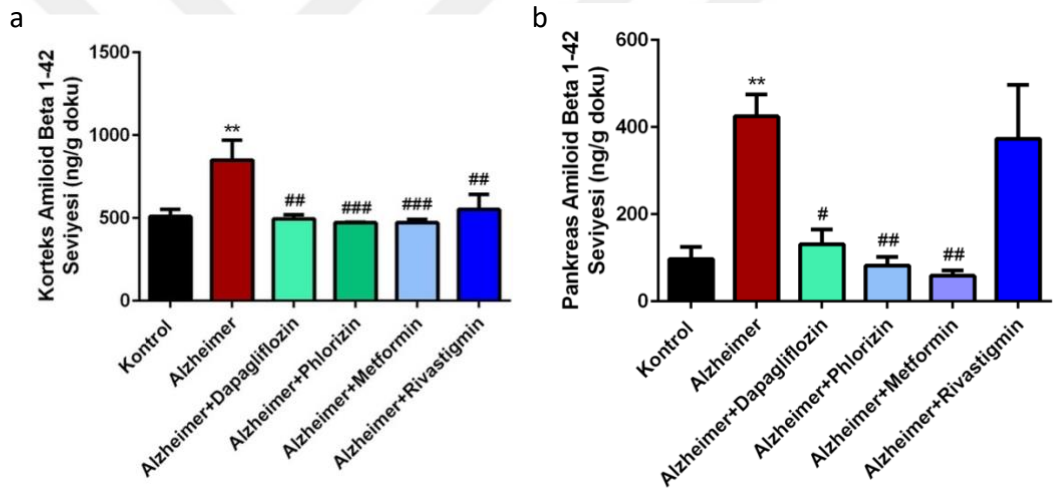
Alzheimer grubunda yükseldi ($p<0.01$), Alzheimer grubuna kıyasla, Alzheimer+Florizin ($p<0.01$) grubunda düştü.



Şekil 8. İnsülin seviyesi (a) Serum (mIU/L), (b) Pankreas ve (c) Serebral korteks (mIU/L). İstatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı aracılığıyla one-way ANOVA ve post test olarak Tukey kullanılarak yapılmıştır. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

6.3.1.2. Serebral korteks ve pankreas dokularında $A\beta_{1-42}$ seviyelerinin değerlendirilmesi

$A\beta_{1-42}$ seviyesi sıçanlardan alınan serebral korteks ve pankreas dokularında ELISA yöntemi ile incelendi ve sonuçlar Şekil 9'da verildi. Serebral korteks sonuçlarına göre $A\beta_{1-42}$ seviyeleri kontrol grubuna kıyasla Alzheimer grubunda yükseldi ($p<0.01$), Alzheimer grubuna kıyasla Alzheimer+Dapagliflozin ($p<0.01$), Alzheimer+Florizin ($p<0.001$), Alzheimer+Metformin ($p<0.001$) ve Alzheimer+Rivastigmin ($p<0.01$) gruplarında düştü. Pankreas sonuçlarına göre $A\beta_{1-42}$ seviyeleri kontrol grubuna kıyasla Alzheimer grubunda yükseldi ($p<0.01$), Alzheimer grubuna kıyasla Alzheimer+Dapagliflozin ($p<0.05$), Alzheimer+Florizin ($p<0.01$) ve Alzheimer+Metformin ($p<0.01$) gruplarında düştü.

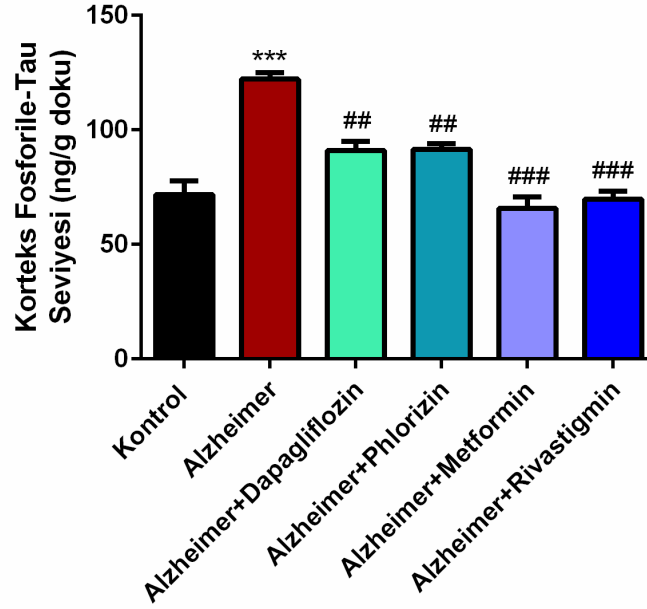


Şekil 9. Amiloid beta $_{1-42}$ seviyesi (a) Serebral korteks (ng/g doku) ve (b) Pankreas (ng/g doku). İstatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı aracılığıyla one-way ANOVA ve post test olarak Tukey kullanılarak yapıldı. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

6.3.1.3. Serebral korteks dokusunda fosforile tau seviyelerinin değerlendirilmesi

Fosforile tau seviyesi sıçanlardan alınan serebral korteks dokusunda ELISA yöntemi ile incelendi ve sonuçlar Şekil 10'da verildi. Serebral korteks sonuçlarına göre fosforile tau seviyeleri kontrol grubuna kıyasla Alzheimer grubunda yükseldi ($p<0.001$), Alzheimer grubuna kıyasla Alzheimer+Dapagliflozin ($p<0.01$),

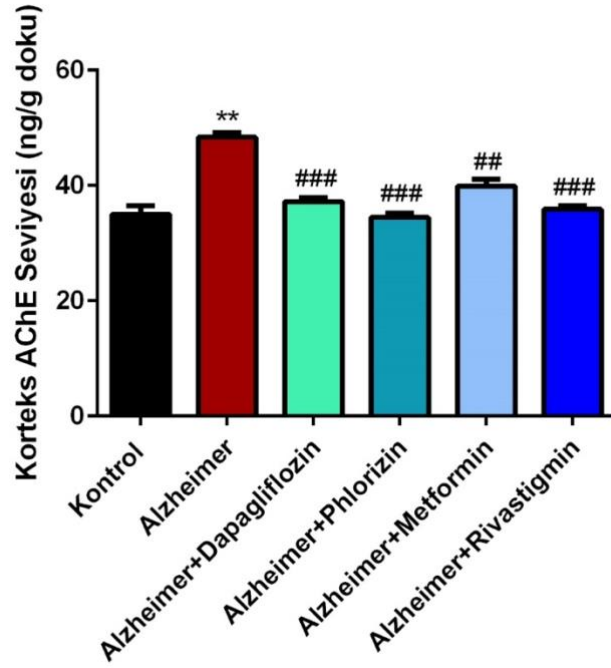
Alzheimer+Florizin ($p<0.01$), Alzheimer+Metformin ($p<0.001$) ve Alzheimer+Rivastigmin ($p<0.001$) gruplarında düştü.



Şekil 10. Serebral korteks fosforile tau seviyesi (ng/g doku). İstatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı aracılığıyla one-way ANOVA ve post test olarak Tukey kullanılarak yapıldı. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

6.3.1.4. Serebral korteks dokusunda ache seviyelerinin değerlendirilmesi

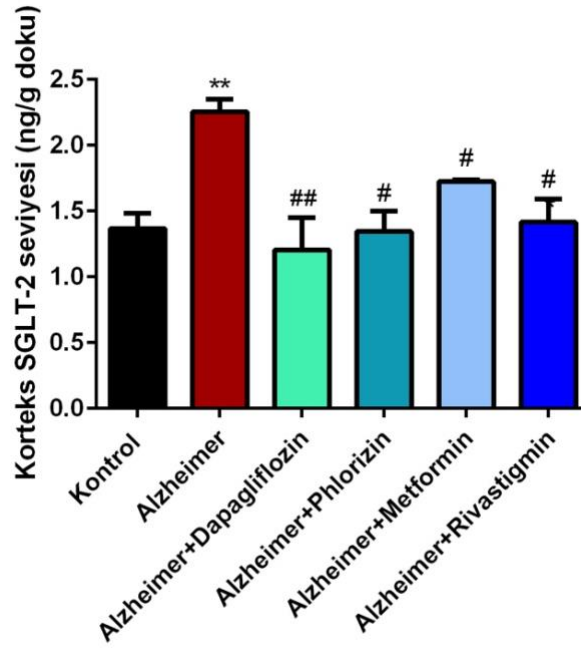
AChE seviyesi sıçanlardan alınan serebral korteks dokusunda ELISA yöntemi ile incelendi ve sonuçlar Şekil 11’de verildi. Serebral korteks sonuçlarına göre AChE seviyeleri kontrol grubuna kıyasla Alzheimer grubunda yükseldi ($p<0.01$), Alzheimer grubuna kıyasla Alzheimer+Dapagliflozin ($p<0.001$), Alzheimer+Florizin ($p<0.001$), Alzheimer+Metformin ($p<0.01$) ve Alzheimer+Rivastigmin ($p<0.001$) gruplarında düştü.



Şekil 11. Serebral korteks asetilkolinesteraz (AChE) seviyesi (ng/g doku). İstatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı aracılığıyla one-way ANOVA ve post test olarak Tukey kullanılarak yapıldı. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

6.3.1.5. Serebral korteks dokusunda SGLT2 seviyelerinin değerlendirilmesi

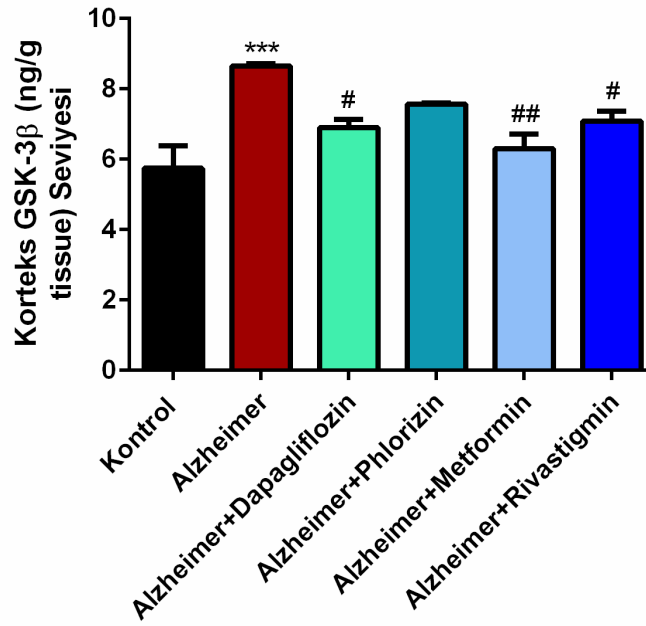
SGLT2 seviyesi sıçanlardan alınan serebral korteks dokusunda ELISA yöntemi ile incelendi ve sonuçlar Şekil 12’de verildi. Serebral korteks sonuçlarına göre SGLT2 seviyeleri kontrol grubuna kıyasla Alzheimer grubunda yükseldi ($p<0.01$), Alzheimer grubuna kıyasla Alzheimer+Dapagliflozin ($p<0.01$), Alzheimer+Florizin ($p<0.05$), Alzheimer+Metformin ($p<0.05$) ve Alzheimer+Rivastigmin ($p<0.05$) gruplarında düştü.



Şekil 12. Serebral korteks sodyum-glukoz ko-transporter-2 (SGLT2) seviyesi (ng/g doku). İstatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı aracılığıyla one-way ANOVA ve post test olarak Tukey kullanılarak yapıldı. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

6.3.1.6. Serebral korteks dokusunda GSK-3 β seviyelerinin değerlendirilmesi

GSK-3 β seviyesi sıçanlardan alınan serebral korteks dokusunda ELISA yöntemi ile incelendi ve sonuçlar Şekil 13’de verildi. Serebral korteks sonuçlarına göre GSK-3 β seviyeleri kontrol grubuna kıyasla Alzheimer grubunda yükseldi ($p<0.001$), Alzheimer grubuna kıyasla Alzheimer+Dapagliflozin ($p<0.05$), Alzheimer+Metformin ($p<0.01$) ve Alzheimer+Rivastigmin ($p<0.05$) gruplarında düştü.

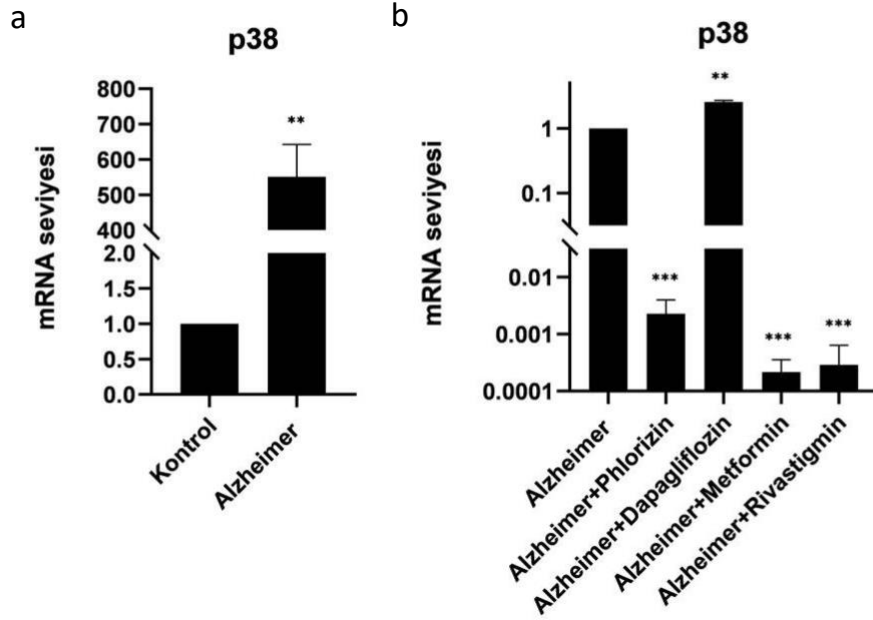


Şekil 13. Serebral korteks asetilkolinesteraz (GSK-3 β) seviyesi (ng/g doku). İstatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı aracılığıyla one-way ANOVA ve post test olarak Tukey kullanılarak yapıldı. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

6.3.2. Gen ekspresyonu analizlerinin değerlendirilmesi

Light Cycler 480-II (Roche Diagnostic) cihazının otomatik olarak hesapladığı Ct değerler Livak metodu kullanılarak analiz edildi (Livak & Schmittgen, 2001). Normalizasyon sağlamak için kullanılan Actin- β Ct değerinin ortalamasından çıkarıldı. Elde edilen değerlerin kuvveti 2 tabanından alındı. Hiçbir uygulama yapılmamış olan kontrol grubu 1 birim baz alınarak değerlendirildi. Hastalık modeli ve farklı uygulamalar yapılmış grup değerleri kontrol gruplarının değerlerine bölünerek bir değer elde edildi. Bu değerler 1'in katı olacak şekilde belirlendi. GraphPad Prism 8.0.2 versiyonu (GraphPad Software, San Diego California, USA) kullanılarak bu değerlerden grafikler oluşturuldu. Minitap 14 software (One Way ANOVA) programı kullanılarak çalışma grupları arasındaki istatistiksel analiz yapıldı (Aydemir ve ark., 2018). * $P<0,05$ ** $P<0,01$ ve *** $P<0,001$ anlamlı kabul edildi. (Şekil 14)

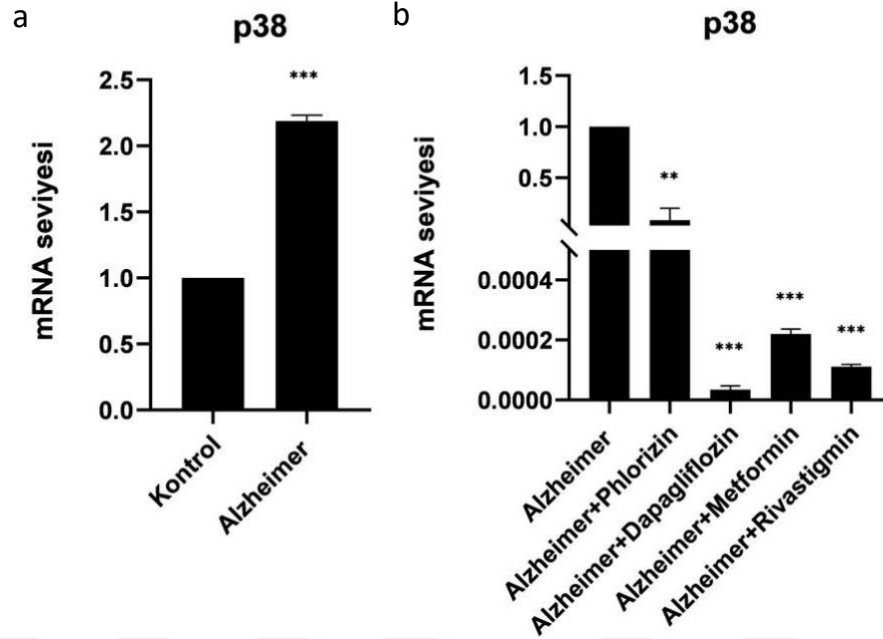
Korteks doku örneklerinde P38 (mitojenle aktive olan protein kinaz) ile yapılan gen ekspresyon analizinde kontrol grubunun Alzheimer grubuna kıyasla 551 kat istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlendi. Alzheimer grubu ise tedavi uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında Alzheimer+Florizin grubunda yaklaşık 437 kat istatistiksel olarak azalma olduğu belirlendi. Alzheimer, Alzheimer+Dapagliflozin grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yaklaşık 2.5 kat arttığı belirlendi. Alzheimer+Metformin ve Alzheimer+Rivastigmin grubuyla yapılan kıyaslamada ise sırayla anlamlı bir şekilde yaklaşık 4629 kat ve 3460 kat azalma olduğu belirlendi. (Şekil 14)



Şekil 14. Korteks doku örneklerinde p38 mRNA ekspresyon değişimi: (a) Kontrol grubunun Alzheimer grubuyla karşılaştırılması, (b) Alzheimer grubunun; Alzheimer+Florizin, Alzheimer+Dapagliflozin, Alzheimer+Metformin ve Alzheimer+Rivastigmin gruplarıyla karşılaştırılması

P38 (mitojenle aktive olan protein kinaz) ile yapılan gen ekspresyon analizinde kontrol grubuna göre Alzheimer grubunun yaklaşık 2.1 kat istatistiksel olarak arttığı belirlendi. Alzheimer grubu tedavi gruplarıyla kıyaslandığında Alzheimer+Florizin grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yaklaşık 12 kat azaldığı, Alzheimer+Dapagliflozin grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yaklaşık

28818 kat azaldığı, Alzheimer+Metformin grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yaklaşık 4545 kat azaldığı, Alzheimer+Rivastigmin grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yaklaşık 9000 kat azaldığı belirlendi. (Şekil 15)



Şekil 15. Pankreas doku örneklerinde p38 mRNA ekspresyon değişimi: (a) Kontrol grubunun Alzheimer grubuyla karşılaştırılması, (b) Alzheimer grubunun; Alzheimer+Florizin, Alzheimer+Dapagliflozin, Alzheimer+Metformin ve Alzheimer+Rivastigmin gruplarıyla karşılaştırılması

6.4. Histolojik Analizlerin Değerlendirilmesi

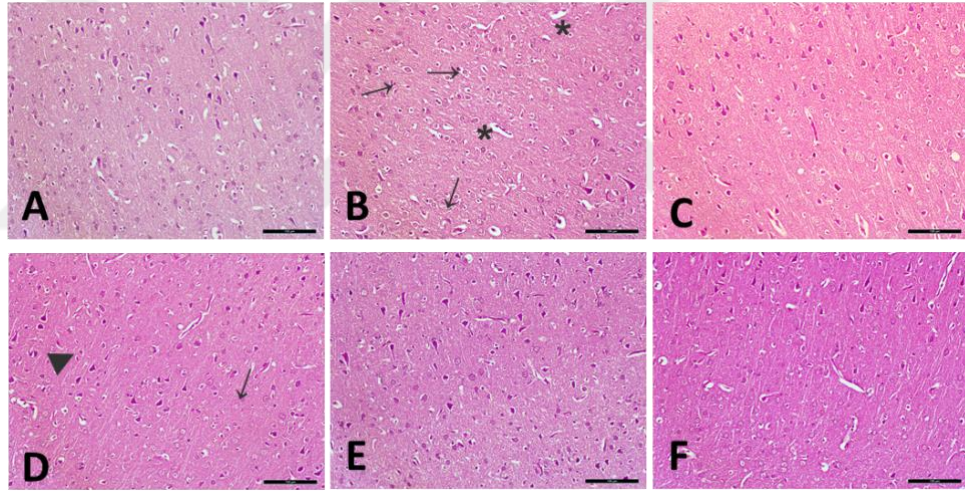
6.4.1. Histopatolojik analizlerin değerlendirilmesi

Kontrol grubunda, düzenli serebral korteks (Resim 1) ve hipokampus (Resim 2) morfolojisi gözlemlendi. Kontrol ile kıyaslandığında Alzheimer grubuna ait korteks ve hipokampus dokularında şiddetli dejenere nöronlar, vasküler konjesyon ve ödem gözlemlendi. Alzheimer gruplarına metformin, rivastigmin, dapagliflozin ve florizin uygulanmasının beyinde oluşan nöronal kayıpları ve dejenerasyonu geriye çevirerek onardığı gözlemlendi.

Kontrol grubuna ait sıçanlarda ışık mikroskopik değerlendirmeler sonucunda pankreas ekzokrin alanlarda normal bazal çekirdek ve apikal asidofilik sitoplazma, endokrin alanlarında ise düzenli adacık morfolojisi gözlemlendi (Resim 3). Kontrol ile

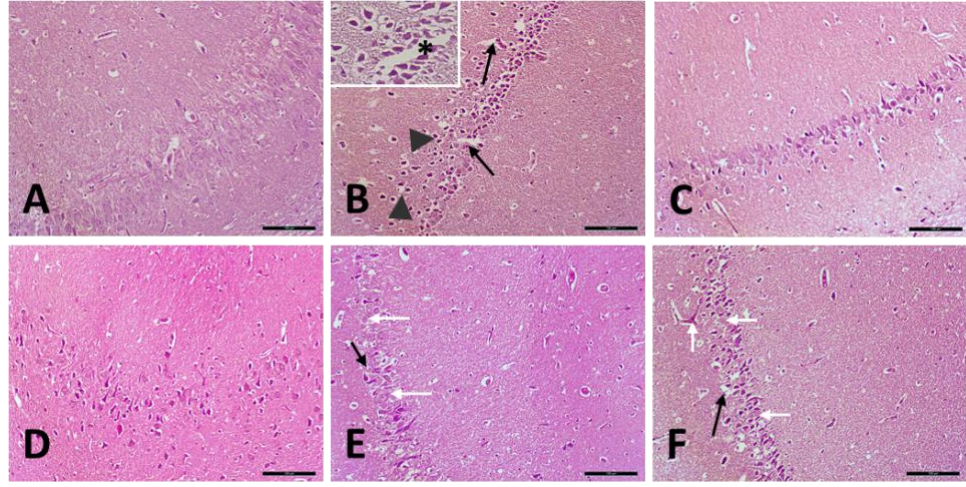
karşılaştırıldığında Alzheimer grubuna ait pankreas dokusunda asiner hücre hiperplazisi, hücre hasarı (apoptoz/nekroz) ve otofaji ile beraber endokrin ve ekzokrin hasarın artmış olduğu bulundu. Alzheimer grubundaki sıçanlarda inflamatuvar hücre infiltrasyonu belirgin olmamakla birlikte interlobüler veya intralobüler alanlarda sadece birkaç lenfosit gözlemlendi. Alzheimer olan gruplara metformin, rivastigmin, dapagliflozin ve florizin uygulanması ile pankreas dokularında, Alzheimer grubuna göre asiner hücre hiperplazisi, apoptoz/nekroz ve otofajide azalma görüldü. Daha çok rivastigmin grubunda olmak üzere tedavi gruplarında yer yer hipertrofik asiner hücreler gözlemlendi. Langerhans adacıkları ise kontrol grubuna benzer şekilde normal görünümde izlendi.

6.4.1.1. Serebral korteks



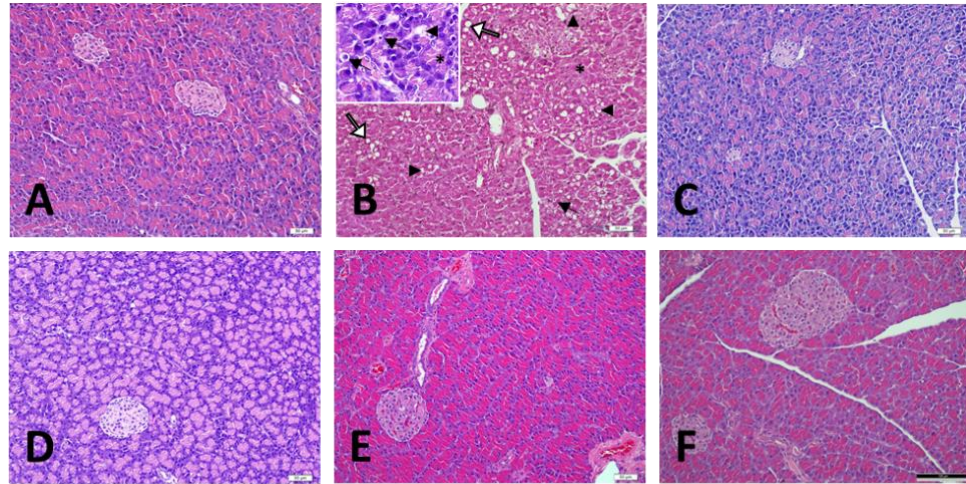
Resim 1. Serebral korteks Hematoksilen-Eozin boyaması. (A) Kontrol Grubu: düzenli serebral korteks morfolojisi; (B) Alzheimer grubu: beyinde şiddetli vasküler konjesyon ve ödem (*) ve dejenere nöronlar (→); (C ve D) Alzheimer+Metformin ve Alzheimer+Rivastigmin Grubu, sırasıyla: yer yer dejenere nöronlar (→), rejenere nöronlar (▶); (E ve F) Alzheimer+Dapagliflozin ve Alzheimer+Florizin Grubu, sırasıyla: serebral kortekste nadir vasküler konjesyon (*) gözüksede kontrol gruba benzer morfoloji. Bar: 100 µm.

6.4.1.2. Hipokampus



Resim 2. Hipokampus Hematoksilen-Eozin boyaması. (A) Kontrol Grubu: düzenli hipokampus morfolojisi; (B) Alzheimer grubu: Hipokampusün CA2 bölgesinde nöronal kayıpları ($\rightarrow$), piknotik çekirdekli dejenere nöronlar ($\blacktriangleright$) ve şiddetli dispersiyon (*); (C ve D) Alzheimer+Metformin ve Alzheimer+Rivastigmin Grubu: kontrole benzer hipokampus morfolojisi; (E ve F) Alzheimer+Dapagliflozin ve Alzheimer+Florizin Grubu, nadir dejenere nöronlar ($\blacktriangleright$) olmasına rağmen genel morfolojide nöronal kayıpların onarımı (beyaz ok).

6.4.1.3. Pankreas



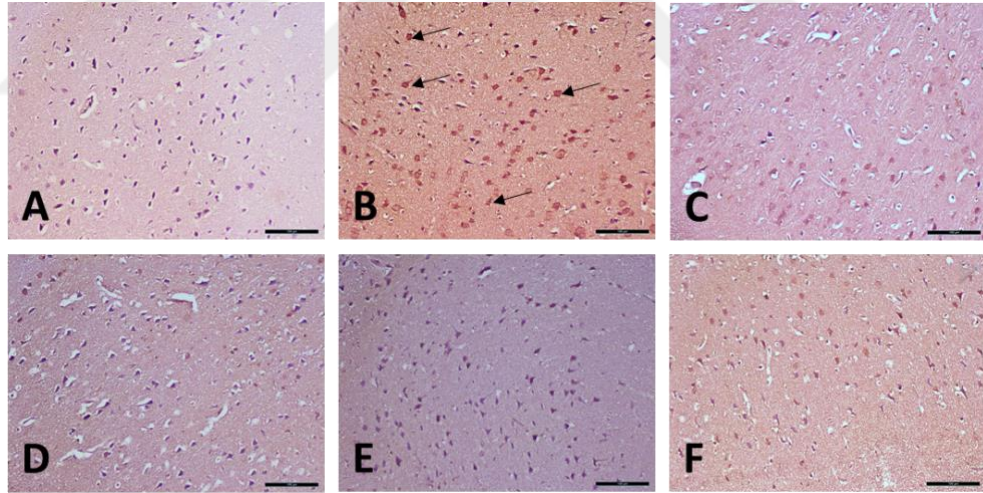
Resim 3. Pankreas Hematoksilen-Eozin boyaması. (A) Kontrol grubu: düzenli pankreas morfolojisi, (B) Alzheimer grubu: *: Hipertrofi, ok: Apoptoz, siyah çerçeveli ok: otofaji, ok ucu: nekroz. (C, D, E, F) Alz+Metformin, Rivastigmin, Dapagliflozin ve florizin grubu, sırasıyla: Yer yer hipertrofik hücreler olmasına rağmen genel morfolojisi kontrole benzer şekilde. H&E. Ölçek: 50 μ m.

6.4.2. İmmünohistokimya analizlerinin değerlendirilmesi

YYD/STZ ile oluşturulan Alzheimer modelinde, kontrol ile kıyaslandığında, beyin dokusunun korteks ve hipokampus bölgesinde yoğun amiloid plakları ve tau protein ekspresyonu ortaya çıktı. Alzheimer gruplarına metformin, rivastigmin ve florizin uygulanması sonunda korteks ve hipokampusta yer yer hafif amiloid plakları gözlenmekle beraber amiloid plakları en az dapagliflozin uygulanan grupta gözlendi. Aynı zamanda, rivastigmin ve dapagliflozin uygulanması ile korteks bölgesinde tau protein ekspresyonu yer yer hafif gözlenirken, metformin ve florizin uygulaması ile bu ekspresyonun daha az olduğu tespit edildi.

6.4.2.1. Serebral kortekste amiloid beta ölçümlerinin değerlendirilmesi

Serebral kortekste $A\beta_{1-42}$ immünohistokimya boyamaları Resim 4’de verilmiştir. Sonuçlara göre kontrol ile kıyaslandığında Alzheimer grubunda şiddetli immünreaktivite artışı gözlenmiştir. Bu artışın tedavi gruplarında azaldığı gözlemlendi.

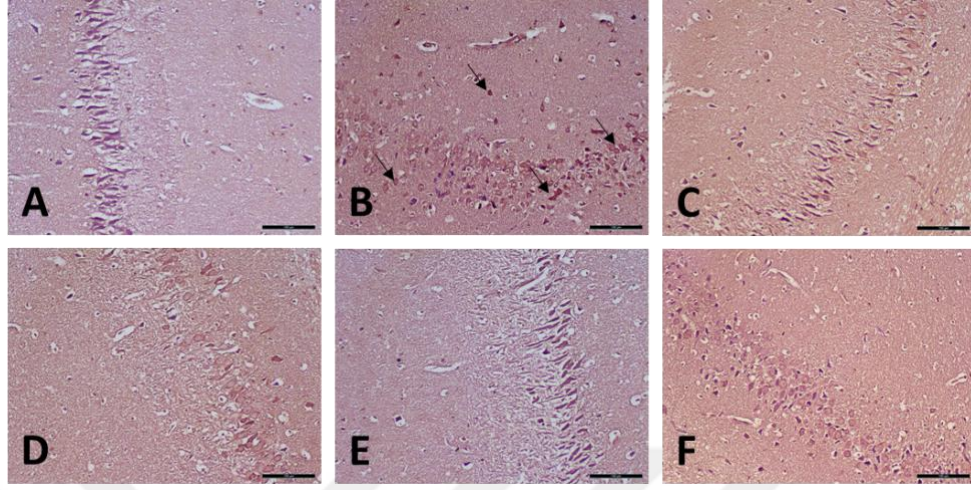


Resim 4. Serebral kortekste $A\beta$ immünohistokimyası. →: Pozitif boyanma. Ölçek: 100 μ m. A: Kontrol grubu, B: Alzheimer grubu, C: Alzheimer+Dapagliflozin, D: Alzheimer+Florizin, E: Alzheimer+Metformin, F: Alzheimer+Rivastigmin

6.4.2.2. Hipokampüste amiloid beta ölçümlerinin değerlendirilmesi

Hipokampus $A\beta_{1-42}$ immünohistokimya boyamaları Resim 5’de verildi. Sonuçlara göre kontrol ile kıyaslandığında Alzheimer grubunda hipokampüste hücre gövdesinde

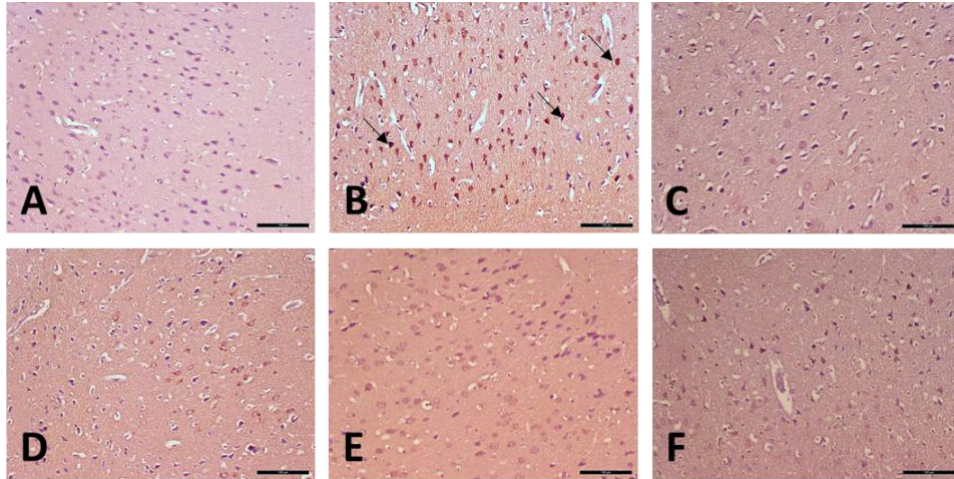
şiddetli immünreaktivite artışı gözlemlendi. Bu artışın tedavi gruplarında azaldığı gözlemlendi.



Resim 5. Hipokampüste A β immunohistokimyası. →: Pozitif boyanma. Ölçek: 100 μ m. A: Kontrol grubu, B: Alzheimer grubu, C: Alzheimer+Dapagliflozin, D: Alzheimer+Florizin, E: Alzheimer+Metformin, F: Alzheimer+Rivastigmin

6.4.2.3. Serebral kortekste fosforile tau ölçümlerinin değerlendirilmesi

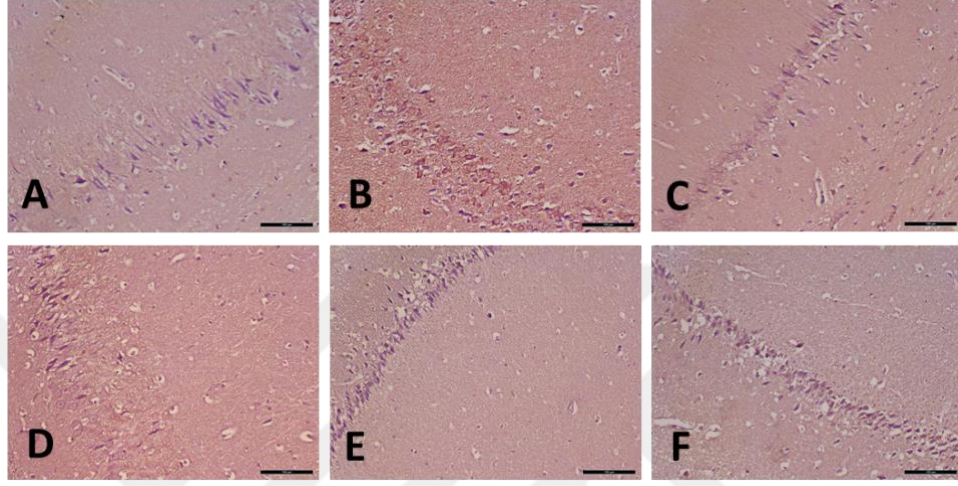
Serebral kortekste fosforile tau immünohistokimya boyamaları Resim 6’da verildi. Sonuçlara göre kontrol ile kıyaslandığında Alzheimer grubunda ciddi bir şekilde artışı ve bu artışın tedavi gruplarında azaldığı gözlemlendi.



Resim 6. Serebral kortekste fosforile tau immunohistokimyası. →: Pozitif boyanma. Ölçek: 100 μ m. A: Kontrol grubu, B: Alzheimer grubu, C: Alzheimer+Dapagliflozin, D: Alzheimer+Florizin, E: Alzheimer+Metformin, F: Alzheimer+Rivastigmin

6.4.2.4. Hipokampüste fosforile tau ölçümlerinin değerlendirilmesi

Hipokampüste fosforile tau immünohistokimya boyamaları Resim 7’de verildi. Sonuçlara göre kontrol ile kıyaslandığında Alzheimer grubunda hipokampus hücre gövdesinde şiddetli immünreaktivite gözlemlendi ve bu immünreaktivitenin tedavi gruplarında azaldığı gözlemlendi.



Resim 7. Hipokampüste fosforile tau immünohistokimyası. →: Pozitif boyanma. Ölçek: 100 µm. A: Kontrol grubu, B: Alzheimer grubu, C: Alzheimer+Dapagliflozin, D: Alzheimer+Florizin, E: Alzheimer+Metformin, F: Alzheimer+Rivastigmin

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında SGLT2 inhibitörü dapagliflozinin, sıçanlarda YYD ve düşük doz STZ uygulaması ile oluşturulmuş T2DM indüklü AH modelinde etkileri ve antidiyabetik ve anti-Alzheimer etki mekanizması seçici olmayan SGLT inhibitörü florizin, antidiyabetik ilaç metformin ve anti-Alzheimer ilaç rivastigmin ile kıyaslanarak araştırıldı.

Diyabet indüklü AH modeli ufak değişikliklerle, Srinivasan ve ark. tarafından 2005 yılında T2DM oluşturmak için tanımlanan yüksek yağlı diyet ve düşük doz STZ uygulaması ile oluşturuldu. Sıçanlarda T2DM oluşturmak için çeşitli modeller olmasına rağmen çoğu model hastalığın başlangıcı ve gelişme şekli açısından insanlardaki klinik duruma uygun değildir. Bazı genetik modellerin pahalı olması ve bunlara araştırmacının ulaşımının zor olmasının yanında, bu modeller genetik çeşitlilikteki heterojenitenin fazla olmasından dolayı bir bütün olarak insanlara hitap etmeyebilir. Yüksek doz streptozotosin enjeksiyonu ile oluşturulan modellerde ise hiperglisemi gelişimi öncelikle direkt pankreatik beta hücre hasarına bağlıdır ve dolayısıyla patoloji insülin direnci yerine insülin eksikliğine bağlıdır ve T2DM'den daha fazla T1DM'nin tipik özelliklerini gösterir. Buna karşılık yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda obezite, hiperinsülinemi ve insülin direnci birlikte gelişir; fakat hiperglisemi ve diyabet tam olarak açıklanamayabilir. Dolayısı ile son iki modelin kombinasyonu ile oluşturulan model ile T2DM için ideal model oluşturulmaya çalışılmıştır (Srinivasan ve ark., 2005). Sıçanlarda T2DM indüklü AH modeli oluşturmak için kullanılan YYD ve düşük doz STZ (YYD/STZ) uygulamasının önceki çalışmalarda gözlemlenenlerle karşılaştırılabilir T2DM ve AH benzeri bir görünüme sahip olduğu bulunmuştur (Hu ve ark., 2013). T2DM modelleri sıklıkla nispeten yüksek dozda STZ (>50 mg/kg) ile indüklenir (Lenzen, 2008). Bu modellerde çoğunlukla AH indüklenmeksizin sadece diyabet modeli oluşturulur; bununla birlikte, yüksek dozda STZ genellikle ölüm oranında dramatik bir artışa neden olur (Ventura-Sobrevilla ve ark., 2011). Ayrıca YYD ile farklı dozlarda STZ'nin T2DM oluşturma yeteneğinin kıyaslandığı bir çalışmada görülmüştür ki YYD ile beraber uygulanan STZ'nin yüksek dozla uygulanması (45 mg/kg ve 50 mg/kg) sıçanlarda ciddi ağırlık

kaybuna neden olmuş ve çok düşük doz STZ (25 mg/kg) ise diyabetik durumu oluşturmada yeterli olmazken düşük doz STZ (35 mg/kg) ile istenen diyabetik durum oluşturulmuştur (Srinivasan ve ark., 2005). Ayrıca kognitif bozukluklar da STZ ve/veya yüksek yağlı diyet ile oluşturulan modellerde çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Amin ve ark., 2013; Arnold ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2008). Bu nedenle tez çalışmamızda T2DM indüklü AH oluşturmak için YYD ile beslenme ve düşük doz STZ (35 mg/kg) uygulaması ideal model olarak seçilmiştir. Bu modelde, insülin direncini indüklemek için YYD ile beslenme ve ardından insülin sekresyonunu tamamen tehlikeye atmadan β -hücrelerinde hafif işlev bozukluğuna neden olmak için düşük doz STZ enjeksiyonu yapılmıştır. Model, T2DM'nin doğal gelişimini (insülin direncinden β -hücre disfonksiyonuna kadar) ve metabolik özelliklerini yakından taklit eder ve hem T2DM'de yer alan mekanizmaları araştırmak hem de potansiyel tedavileri değerlendirmek için ideal bir model olarak çalışmalarda tercih edilmektedir (Guo ve ark., 2018).

Bu tez çalışmasında seçici SGLT2 inhibitörü dapagliflozin ve seçici olmayan SGLT inhibitörü florizinin, sıçanlarda oluşturulan YYD/STZ ile oluşturulan T2DM indüklü AH modelinde etkileri ve etki mekanizmaları araştırıldı. Pozitif kontrol ilaçları olarak T2DM'de uzun yıllardır ilk basamak ilaç olarak kullanılan metformin ve AH tedavisinde kullanılmakta olan rivastigmin ilaçları seçildi.

Çalışmamızda sıçanların diyabetik durumları; ağırlık ölçümleri, kan glukoz ölçümleri ve oral glukoz tolerans testi ile, davranış durumları ise açık alan testi, yeni obje tanıma testi, pasif sakınma testi ve Morris'in su tankı testi ile değerlendirildi. Ayrıca ELISA analizleri ile serum, pankreas ve serebral korteks dokularında insülin; serebral korteks ve pankreas dokularında $A\beta_{1-42}$, serebral korteks dokusunda fosforile tau, AChE, SGLT2, GSK-3 β seviyeleri değerlendirildi. Gen ekspresyon analizleri ile serebral korteks ve pankreas dokularında p38 protein ekspresyonu araştırıldı. Ayrıca histopatolojik analizler ile serebral korteks, hipokampus ve pankreas doku morfolojisi değerlendirildi ve immünohistokimyasal olarak serebral korteks ve hipokampusta $A\beta$ ve hiperfosforile tau seviyeleri değerlendirildi.

Çalışmamızda sıçanların ağırlık ölçümleri değerlendirildiğinde gruplar arasında bir farklılık görülmedi. Sonuçlar incelendiğinde görülmektedir ki ilk 4 hafta kontrol grubu

hariç diğer gruplarda sıçanların vücut ağırlıklarında artış gözlenmektedir. Henüz tedaviye başlanmayan ve STZ uygulanmayan bu sıçanlarda vücut ağırlığında meydana gelen artış muhtemelen YYD ile beslenmeye bağlı gerçekleşti. YYD ile beslenme ile sıçan ağırlıklarında meydana gelen artış önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (Guo ve ark., 2018; Vatandoust ve ark., 2018). 4. hafta itibari ile ise bu sıçanların vücut ağırlığında bir azalma görülmektedir. Bunun sebebi ise muhtemelen STZ uygulamasının ardından pankreasta meydana gelen harabiyete bağlı glukoz metabolizmasının bozulmasıdır. YYD ile beraber 35 mg/kg dozunda STZ uygulamasının, vücut ağırlığında azalmaya sebep olduğu bilinmektedir (Guo ve ark., 2018). 8. haftanın sonunda ise çalışmanın başına kıyasla sıçanların vücut ağırlıklarında bir değişim olmadığı bulundu.

Kan glukoz ölçümleri sıçanlara 4. hafta düşük doz STZ uygulamasının ardından 4., 5., 6., 7. ve 8. haftaların sonunda yapıldı. Hayvanların beslenmesi kısıtlanmaksızın ölçülen kan glukozu sıçanlara tedavi uyguladıktan 30 dakika sonra kuyruk veninden alınan kanda glukometre kullanılarak yapıldı. Tüm ölçümlerin sonuçlar değerlendirildiğinde kontrol grubuna kıyasla Alzheimer grubunda kan glukozu yüksek bulundu. Kontrol grubunda kan glukoz seviyesi normal sınırlarda iken Alzheimer grubunda tüm ölçümler 300 mg/dl'nin üzerinde bulundu. 35 mg/kg STZ ve YYD uygulamasının kan glukozu üzerine etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada YYD+STZ uygulamasının; normal yemle beslenen (101.06 ± 3.94), normal yemle beslenen ve aynı dozda STZ uygulanan (137.11 ± 5.47) ve STZ uygulanmaksızın yalnızca YYD ile beslenen sıçanlara (129.33 ± 2.49) kıyasla kan glukozunu artırdığı ($418.42 \pm 8.45^*$) gösterilmiştir (Srinivasan ve ark., 2005). Antidiyabetik bir ajanın etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise yine düşük doz STZ ve YYD ile beslenen sıçanlarda kontrol grubuna göre kan glukozunda yükseliş bildirilmiştir (Jiang ve ark., 2012). Çalışmamızda kan glukozu üzerine etkilerini değerlendirdiğimiz ilaçlardan dapagliflozine ait sonuçlar incelendiğinde görülmektedir ki kan glukozu Alzheimer grubuna göre düşmüş, metformin ile benzer bir profil sergiledi. Dapagliflozin (Shin ve ark., 2016) ve metforminin (Cam ve ark., 2019) T2DM indüklenmiş sıçanlarda kan glukozunu düşürücü etkisi önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Kan glukozunu düşürme üzerine etkisini araştırdığımız diğer ajan selektif olmayan SGLT inhibitörü florizin ise kan glukozunu düşürmede başarılı

olamadı, Alzheimer grubu ile benzer şekilde kan glukoz seviyesine sahip oldu. Elma ağaçlarının kök kabuğundan izole edilen bir bileşik olan florizin T2DM’de karakterize olan insülin direncini düzeltici etkilerinden dolayı araştırılan bir maddedir fakat bu ajanın stabilite, seçici olmayan inhibisyon ve düşük biyoyararlanıma sahip olması nedeniyle ilaç olarak geliştirilememiş, dapagliflozin gibi seçici türevlerin sentezlenmesi yoluna gidilmiştir (Chao ve Henry, 2010; Ríos ve ark., 2015). Biz de çalışmamızda kan glukozunu düşürmede florizine kıyasla dapagliflozini daha başarılı bulduk. Çalışmamızda anti-Alzheimer ilaç olarak kullanılan rivastigminin ise kan glukozunu düşürmede etkili olmadığını bulduk. Literatür incelendiğinde AChE inhibitörü olan rivastigminin T2DM’de etkilerinin denendiği oldukça az sayıda çalışma olduğu görülmektedir. YYD ile T2DM-AH indüklenen farelerde rivastigminin diyabet üzerine herhangi iyileştirici etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Matsuda ve Hisatsune, 2017). Ayrıca yapılan klinik bir çalışmada rivastigminin AH’si olan yaşlı hastalarda insülin direnci üzerine bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Isik ve ark., 2012).

Herhangi bir zamanda ölçülen kan glukoz ölçümünün yanında sıçanlarda ayrıca OGTT de yapıldı. OGTT, sıçanların glukoz metabolizmasını düzenleyebilme yeteneğini ve glisemik değişiklikleri değerlendirebilmek için ölçüldü. Sonuçlara göre Alzheimer grubunun kan glukozu seviyesi kontrol grubuna kıyasla tüm ölçümlerde (0., 30., 60., 90. ve 120. dakikalarda) yüksek bulundu. Kontrol grubu sıçanlarının kan glukoz seviyeleri ölçümlerde normal sınırlar içinde kaldı, bu sonuçlar bu sıçanların glukozu tolere edebildiğini göstermektedir. Alzheimer grubunda ise 0. dakikada henüz glukoz yeni uygulanmışken, kan glukoz değeri yaklaşık 300 mg/dl; 30. ve 60 dakikalarda ise yaklaşık 500 mg/dl bulundu. 90. dakika itibariyle düşüş başlamış fakat yine de yeterli düşüş sağlanamadı; 90. ve 120. dakikalarda yaklaşık 400 mg/dl kan glukoz ölçümü izlendi. Bu sonuçlara göre Alzheimer grubu sıçanları glukozu tolere etmede başarılı olmadı Literatürde STZ-YYD indüklü AH modelinde benzer sonuçlar izlenmektedir; bu sonuçlara göre AH grubunda 0. dakikada da hiperglisemi gözlenirken, maksimum seviyelere yaklaşık 30. dakikada ulaşıldı, 45. dakika itibariyle düşüş başlamasına rağmen 120 dakika boyunca kan glukozu 0. dakika ölçümlerine inemedi (Kang ve ark., 2017). Çalışmamızda Alzheimer+Dapagliflozin grubunda glukoz yüklemesinin ardından 60. dakikaya kadar kan glukozunda yükseliş izlenirken, 60. dakikadan

itibaren düşüş başladı ve 120. dakikaya kadar devam etti. Dapagliflozin kan glukozunu kontrol grubu kadar başarılı tolere edemese de sonuçta Alzheimer grubuna göre iyileşme gözlemlendi. Dapagliflozinin STZ-YYD indüklü T2DM’de sonuçlarının araştırıldığı bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edildi; 30. dakikaya kadar kan glukozu 300 mg/dl’nin üzerine çıkarken, bu süreden sonra düşüş izlendi ve glukozu tolere edebildiği gösterilmiştir (Shin ve ark., 2016). Alzheimer+Florizin grubunda 30. dk itibariyle 120 dk’ya kadar sürekli düşüş izlenmiştir. Florizinin literatürdeki çalışmaları da bu sonucu desteklemektedir (Krook ve ark., 1997). Alzheimer+Metformin grubunda ise 30. dakikaya kadar kan glukozunda yükseliş gözlenirken, bu süreden sonra düşüş izlendi. Literatürde de benzer sonuçlar bulunmuş; bir çalışmada OGTT’de kan glukozunda benzer şekilde 30. dakikaya kadar yükseliş izlenirken, 30. dakikadan sonra düşüş izlenmiştir (Cam ve ark., 2017). Rivastigmin uygulanan grupta ise 60. dakikaya kadar kan glukozunda yükseliş gözlenirken, 60. dakikadan sonra düşüş izlendi, fakat Alzheimer grubu ile aralarında anlamlı bir farklılık görülemedi; dolayısıyla glukozu tolere etmede başarılı bulunamadı. Bu sonuç muhtemelen yukarıda bahsedildiği gibi rivastigminin diyabet üzerine herhangi iyileştirici özelliği bulunmamasından kaynaklanmaktadır (Isik ve ark., 2012; Matsuda ve Hisatsune, 2017).

T2DM, insülin etkisinde ilerleyici bir düşüş (insülin direnci) ve ardından beta hücrelerinin insülin direncini telafi edememesi (pankreatik beta hücre disfonksiyonu) ile karakterize heterojen bir hastalıktır. İnsülin direnci, beta hücre disfonksiyonundan önce gelen karakteristik bir metabolik bozukluktur ve öncelikle periferde insülin aracılı glukoz atılımına direnç ve kompensatuar hiperinsülinemi ile ilişkilidir. Beta hücreleri, normal olarak, glukoz homeostazını sürdürmek için daha fazla miktarda insülin salgılayarak insülin direncini telafi eder. Ancak zamanla, bu beta hücre işlevi bozularak glukoz homeostazında bozulmaya ve ardından hiperglisemi ve bozulmuş glukoz toleransına neden olur (Lebovitz ve Banerji, 2004; Saltiel ve Olefsky, 1996). Çalışmamızda T2DM indüklü AH grubunda görülen hiperglisemi ve glukoz toleransındaki bozulma muhtemelen bu sebeplerden kaynaklanmakta ve etkisini araştırdığımız ilaç dapagliflozin hem hiperglisemide hem de bozulmuş glukoz toleransında iyileşme sağladı. Dapagliflozin, T2DM tedavisinde kullanılmakta olan metformin ile benzer sonuçlar sergilemiş; seçici olmayan SGLT inhibitörü florizin ve

AH’de kullanılmakta olan rivastigminde ise hiperglisemi ve glukoz toleransı yönetimi başarılı bulunmadı.

Bu tez çalışmasında sıçanların kognitif fonksiyonlarının değerlendirilmesi için sıçanlara yeni obje tanıma, pasif sakınma ve Morris’in su tankı testleri yapıldı. Testler sıçanların lokomotor aktivitelerindeki değişikliklerden etkilenebileceği için, testler uygulanmadan önce ayrıca açık alan testi yapıldı ve bu test ile sıçanların lokomotor aktiviteleri değerlendirildi.

Sıçanların lokomotor aktivitelerini değerlendirmek için uygulanan açık alan testinde, sıçanların testin uygulandığı test aparatında katettikleri mesafe ve şahlanma sayısı değerlendirildi. Bu parametrelerin sonuçları değerlendirildiğinde bütün gruplar arasında anlamlı farklılık olmadığı gözlemlendi. Bu sonuçlar çalışmada uygulanan model ve tedavilerin lokomotor aktivite üzerine etkisinin olmadığını göstermekte ve kognitif fonksiyonları değerlendirmede kullanılacak testler üzerinde testlerin sonuçlarını yanıltıcı şekilde etkilemeyeceğini kanıtlamaktadır. Literatür incelendiğinde de hem YYD’nin hem de STZ’nin lokomotor aktiviteyi etkilemediği açık alan testi ile gösterilmiştir (Lin ve ark., 2017). Dapagliflozinin Parkinson hastalığında motor fonksiyonlara olan etkisinin incelendiği bir çalışmada, kontrol grubuna kıyasla dapagliflozinin açık alan testinde toplam kat edilen mesafe, ortalama hız, çizgi geçişi, şahlanma sıklığı, hareketsizlik süresi ve temsili yol üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Arab ve ark., 2021). Dapagliflozinin açık alan testindeki davranış biçimini gösteren bu çalışmada, bizim çalışmamızla benzer sonuçlar elde edildi. Florizin (Karkanias ve ark., 1997), metformin (Qin ve ark., 2021) ve rivastigminin (Comim ve ark., 2009) de açık alan testinde davranış parametrelerini değiştirmede bilinmektedir.

Sıçanların kısa süreli belleğini değerlendirmek için kullanılan yeni obje tanıma testinde öğrenme bellek, sıçanların bilindik ve yeni objeyi keşfetme süreleri arasındaki fark ile değerlendirilmektedir. Bu test dışarıdan motivasyon, ödül veya ceza gerektirmediği ve dolayısıyla kısa süreli de olduğu için sıklıkla öğrenme-belleği ölçmede tercih edilir. Testte öğrenme ve test süreleri arasındaki zamanın değiştirilmesiyle hayvanlarda kısa, orta ve uzun süreli bellek değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Bu tez çalışmasında bu süre 1 saat olarak ayarlanmış ve hayvanların

kısa süreli belleği değerlendirildi. Ayrıca bu testin sonuçları hem hipokampal hem de kortikal lezyonlardan etkilenir. Primatlar ve kemirgenlerde yapılan çalışmalar, görsel obje tanıma belleği için temporal lobun parahipokampal bölgelerinin (yani perirhinal, entorhinal ve inferior temporal korteksler) önemli rol oynadığını göstermektedir (Antunes ve Biala, 2012). Kontrol grubunda sıçanların bilindik objeye kıyasla yeni obje ile geçirdikleri keşif süresinin artması, bu grupta öğrenme-belleğin bozulmadığını kanıtlarken; Alzheimer grubunda bilindik ve yeni obje keşif süreleri arasında farklılık olmaması, bu grupta öğrenme-belleğin bozulduğunu göstermektedir (Mathiasen ve DiCamillo, 2010). Çalışmamızda Alzheimer grubunda bilindik ve yeni objeler ile geçirilen keşif süresi benzer olup aralarında farklılık bulunamadı. STZ-YYD indüklü modellerin kullanıldığı diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edildi ve bu durum bu modelin sıçanlarda kısa süreli öğrenme-belleği bozduğu şeklinde yorumlanmaktadır (Cassano ve ark., 2020; Liu ve ark., 2020). Çalışmamızda dapagliflozin Alzheimer grubuna kıyasla yeni obje tanıma testinde STZ-YYD ile bozulan öğrenme-belleği iyileştirdi. Dapagliflozinin liraglutid ile etkisinin kıyaslandığı bir çalışmada da gösterilmektedir ki, dapagliflozin bizim çalışmamızla benzer şekilde kısa süreli belleği iyileştirdi (Millar ve ark., 2017). Ayrıca intraserebroventriküler STZ ile indüklenen AH modelinde dapagliflozinin etkinliğini araştırdığımız çalışmamızda, dapagliflozinin bu modelde de yeni obje tanıma testinde AH üzerinde iyileştirici etkisi olduğu gösterilmiştir (Hazar-Yavuz ve ark.). Bu tez çalışmasında florizinin yeni obje tanıma testinde AH'yi iyileştirmede başarılı olduğu gösterildi. Literatürde elma yaprak ekstresinin ve onun ikincil majör metaboliti florizinin etkilerinin kıyaslandığı bir çalışmada her ikisinin de yeni obje tanıma testinde tanıtık objeye kıyasla yeni objeyi keşif sürelerinin arttığı bulunmuştur (El-Hawary ve ark., 2021). Çalışmamızda metforminin bu testte etkisi bulunmazken, Alzheimer ilacı rivastigmin AH'de görülen kısa süreli bozulmayı iyileştirdi. Literatürde A β indüklü AH modelinde etkinliği araştırılan rivastigminin bu testte AH'deki bozulmayı düzeltici etkisi olduğu belirtildi (Furukawa-Hibi ve ark., 2011).

Pasif sakınma testi kemirgenlerde öğrenme ve belleği incelemek için kullanılan korku güdümlü bir testtir. Sıçanlar doğuştan gelen eğilimleri gereği aydınlık ve karanlık alanı bulunan pasif sakınma testinde karanlık alana geçiş yapmayı tercih ederler. Bu testte ise sıçanlara karanlık alana geçtiklerinde elektrik şoku uygulanarak, bu alanı tercih

etmemeleri gerektiği öğretilir. Karanlık bölgeye ilk geçiş süresinin artması öğrenme-belleğin iyileştiği anlamına gelmektedir (Cassano ve ark., 2020). Çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla, Alzheimer grubunda karanlık bölgeye ilk geçiş süresi kısaldı ve bu durum bu grupta öğrenme-bellek hasarının oluştuğunu göstermektedir. STZ-YYD indüklü AH modelinde pasif sakınma testinde öğrenme-bellekteki bozulma önceki çalışmalarda da gösterildi (Cassano ve ark., 2020). Tedavi gruplarından dapagliflozin ise bu süreyi uzatarak iyileşme sağladı. Literatürde dapagliflozinin pasif sakınma testinde etkilerinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda florizin de bu testte AH ile bozulan öğrenme-bellek hasarını iyileştirdi. Literatürde florizinin AH modelinde pasif sakınma testindeki etkilerini değerlendiren bir çalışma olmamakla birlikte deney hayvanlarında iskemi modeli ile indüklenen nöronal hasara bağlı bozulmayı iyileştirdiği pasif sakınma testi ile gösterilmiştir (Harada ve ark., 2013). T2DM ilacı metformin bizim çalışmamızda bu testte öğrenme-bellekte düzelme sağlamış, benzer şekilde daha önce yapılan STZ-YYD indüklü AH modelinde de metforminin bu etkisi gösterilmiştir (Cassano ve ark., 2020). STZ-YYD indüklü AH modelinde rivastigminin etkilerinin denendiği herhangi bir çalışma bulunmamakla birlikte farklı Alzheimer modellerinde pasif sakınma testinde rivastigminin iyileştirici etkileri kanıtlanmıştır (Sedighi ve ark., 2019).

Morris'in su tankı testi deney hayvanlarında uzun süreli ve uzaysal öğrenme-belleği ölçmek için kullanılan bir testtir. Çalışmamızda da sıçanların uzun süreli ve uzaysal öğrenme-belleğini ölçmek için bu test kullanıldı. Prob test gününde ölçülen hedef kadrana ulaşma süresi ve hedef kadranda geçirilen süreler öğrenme-belleğin bir ölçüsü olarak kabul edildi. Hedef kadrana ulaşma süresinin uzaması öğrenme-bellekteki bozulmayı ifade etmektedir. Bizim çalışmamızda da Alzheimer grubunda bu süre kontrol grubuna göre arttı. Önceki çalışmalarda da STZ-YYD indüklü AH modelinde hedef kadrana ulaşma süresinde artış gözlemlenmiştir (Ko ve ark., 2021). Bu tez çalışmasında dapagliflozin ve rivastigmin Alzheimer grubuna kıyasla hedef kadrana ulaşma süresini düşürdü. Florizin ve metformin ise Alzheimer grubunda görülen bozukluk üzerine bu teste göre etkili olmadı. Literatürde daha önce dapagliflozinin Alzheimer'da Morris'in su tankı testinde etkisinin denendiğini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Daha önceki çalışmalarda STZ indüklü T2DM modelinde dapagliflozinin Morris'in su tankı testinde etkili olduğu bulunmuştur (El-Safty ve ark.,

2022). Rivastigminin ise bu modelde Morris'in su tankı testinde etkinliğini gösteren bir çalışma bulunmamakla birlikte farklı AH hayvan modellerinde öğrenme-belleği düzeltici etkisi gösterilmiştir (Abdel-Aal ve ark., 2011). Bu tez çalışmasında hedef kadranda geçirilen toplam zaman Alzheimer grubunda kontrol grubuna göre düşürdü. Bu modelde Alzheimer grubunda toplam zamandaki düşüş önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (Ko ve ark., 2021). Tedavi gruplarında ise Alzheimer grubuna kıyasla anlamlı farklılık olmadı.

Bu tez çalışmasında ELISA analizleri ile T2DM ve AH patolojilerini birbirine bağlayan protein seviyelerine uyguladığımız tedavilerin etkisi incelendi. ELISA ile serum, pankreas ve serebral korteks dokularında insülin; serebral korteks ve pankreas dokularında $A\beta_{1-42}$, serebral korteks dokusunda fosforile tau, AChE, SGLT2, GSK-3 β seviyeleri değerlendirildi.

Sıçanlardan alınan serum, pankreas ve serebral korteks dokusunda insülin seviyeleri incelendi. Bunlara göre serum insülin seviyeleri kontrol grubuna kıyasla Alzheimer grubunda artarken, tedavi gruplarında bu seviyeler düştü. Tüm tedavilerde düşüş gözlenirken, en anlamlı düşüş dapagliflozin tedavisi ile görüldü. T2DM endikasyonlu dapagliflozin STZ-YYD indüklü sıçan modelinde yükselen insülin seviyelerini düşürmede başarılı bulundu. STZ-YYD modeli önceki çalışmalarda da belirtildiği (Falusi ve ark., 2021) ve bizim çalışmamızda da görüldüğü üzere sıçanlarda hiperinsülinemi oluşturmuştur. YYD ve STZ ile oluşturulan T2DM indüklü AH modeli, T1DM'den farklı olarak dolaşımdaki serum insülinini artırdı. Çalışma sonucumuza göre uygulanan tedaviler pankreasta STZ'nin neden olduğu zararlı etkileri ve YYD'nin neden olduğu insülin direncini tersine çevirdi.

Serebral korteks dokusunda ise yine Alzheimer grubunda kontrol grubuna kıyasla insülin seviyesinde artış oldu. Tedavi gruplarından ise dapagliflozin AH'deki yükselişe etki etmezken, florizin düşüş sağladı.

Bu tez çalışmasında $A\beta_{1-42}$ seviyeleri serebral korteks ve pankreas dokularında incelendi. Serebral korteks dokusunda $A\beta_{1-42}$ seviyesi kontrol grubuna kıyasla Alzheimer grubunda yükseldi. Tüm tedavi grupları Alzheimer grubuna kıyasla düşüş sağladı. Daha önceki çalışmalarda da YYD-STZ indüklü AH oluşturulan sıçanlarda serebral kortekste $A\beta_{1-42}$ seviyelerinde yükselme gösterilmiştir (Yang ve ark., 2013).

Önceki çalışmalarda dapagliflozinin $A\beta_{1-42}$ seviyeleri üzerine etkisi incelenmemiştir. SGLT-2 inhibitörlerinden sadece empagliflozinin beyinde $A\beta_{1-42}$ seviyeleri üzerine etkisi incelenmiştir ve empagliflozinin yüksek fruktoz indüklü T2DM ve T2DM-AH model (APP/PS1xdb/db fareleri)lerinde yükselen $A\beta_{1-42}$ seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir (Hierro-Bujalance ve ark., 2020; Khan ve ark., 2021). Non-selektif SGLT inhibitörü florizin'in ise $A\beta_{1-42}$ seviyeleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Metforminin ise YYD-STZ indüklü sıçan modelinde beyinde yükselen $A\beta_{1-42}$ seviyesini düşürdüğü önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (Abdulmalek ve ark., 2021). Rivastigminin ise YYD-STZ indüklü sıçan modelinde $A\beta_{1-42}$ seviyeleri üzerine etkisini gösteren herhangi bir çalışma literatürde bulunmamakla birlikte, farklı AH modellerinde beyinde $A\beta_{1-42}$ seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir (Mohamed ve ark., 2016).

$A\beta_{1-42}$ seviyeleri serebral korteks dokusu dışında pankreas dokusunda da incelendi. Pankreas dokusunda kontrol grubuna kıyasla Alzheimer grubunda $A\beta_{1-42}$ yüksek bulundu. Tedavi gruplarından ise rivastigmin etki etmezken, dapagliflozin, florizin ve metformin Alzheimer grubuna kıyasla $A\beta_{1-42}$ seviyelerini düşürdü. T2DM'li insanlardan alınan postmortem pankreas dokularında $A\beta_{1-42}$ seviyelerininin sağlıklı insanlara göre yükseldiği bilinmektedir (Miklossy ve ark., 2010). Dapagliflozin, florizin, metformin ve rivastigminin ise pankreas dokusunda $A\beta_{1-42}$ seviyeleri üzerine etkisini gösteren herhangi bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.

Fosforile tau seviyeleri bu tez çalışması kapsamında serebral korteks dokusunda incelendi. Serebral kortekste fosforile tau seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla Alzheimer grubunda arttığı gözlemlendi. Daha önceki çalışmalarda da YYD-STZ indüklü hayvanlarda fosforile tau seviyelerinin beyinde arttığı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2010). Sırasıyla selektif SGLT2 inhibitörü ve selektif olmayan SGLT inhibitörü dapagliflozin ve florizin benzer şekilde AH ile yükselen fosforile tau seviyesini düşürdü. SGLT inhibitörlerinin serebral tau miktarı üzerine etkisinin incelendiği herhangi bir çalışma literatürde bulunmazken, SGLT2 inhibitörlerinden empagliflozinin tau kaynaklı patolojik serebral atrofiyi azalttığı gösterilmiştir (Michał Wiciński ve ark., 2020). Metforminin fosforile tau seviyelerini düşürdüğü YYD-STZ indüklü hayvanlarda da gösterilmiştir. Rivastigminin de benzer şekilde fosforile tau

seviyeleri üzerine düşürücü etkisi önceki çalışmalarda gösterilmekle beraber (Gupta ve ark., 2021), YYD-STZ indüklü hayvanlarda çalışılmamıştır.

Bu tez kapsamında AChE seviyeleri serebral korteks dokusunda incelendi. Çalışmamıza göre kontrol grubuna kıyasla AChE seviyeleri Alzheimer grubunda artarken, uygulanan tedavilerden dapagliflozin, florizin, metformin ve rivastigmin AChE seviyelerini Alzheimer grubuna göre düşürdü. Etkisini araştırdığımız ilaçlardan dapagliflozinin beyin AChE seviyeleri üzerine etkisini gösteren herhangi bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Ancak bu ilacın (Shaikh ve ark., 2016) diğer SGLT-2 inhibitörleri (Rizvi ve ark., 2014) gibi SGLT-2 ve AChE dual inhibitörü olduğu moleküler modelleme çalışmalarında gösterilmiştir, dolayısı ile AChE seviyelerini düşürmesi beklenmektedir (Wiciński ve ark., 2020). Florizinin beyinde AChE seviyelerini düşürdüğü liposakkarit indüklü kognitif bozukluk oluşturulan farelerde gösterilmiştir (Kamdi ve ark., 2021). Metforminin de beyin AChE seviyelerini düşürdüğü önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Pandey ve Garabadu, 2017). Rivastigminin ise AH'deki temel etki mekanizması AChE'yi inhibe etmesidir (Polinsky, 1998). Rivastigminin beyinde AChE seviyelerini düşürdüğünü gösteren çok sayıda çalışma literatürde bulunmakla birlikte YYD-STZ indüklü AH modelinde AChE üzerine etkisi daha önce çalışılmamıştır.

Bu çalışmada SGLT2 seviyeleri serebral kortekste ölçüldü. Alzheimer grubunda kontrol grubuna göre SGLT2 seviyesinde artış oldu. Tedavi gruplarında da SGLT2 seviyelerinde düşüş gözlemlendi. Dapagliflozin ile florizin incelendiğinde selektif SGLT2 inhibitörü dapagliflozin, florizine kıyasla beklendiği üzere SGLT2'yi daha fazla düşürdü. Pozitif kontrol gruplarına verilen metformin ve rivastigmin tedavileri de SGLT2'yi düşürücü etki yapmışlardır. Dapagliflozinin endike olduğu T2DM'yi tedavi etmedeki temel etki mekanizması böbreklerde SGLT2 inhibisyonu yapmasıdır. Antidiyabetik etkinliği bulunan ilk SGLT inhibitörü olan florizin de SGLT1 ve SGLT2'yi inhibe ettiği bilinmektedir. Fakat uyguladığımız tedavilerden hiçbirinin beyindeki SGLT2 seviyeleri üzerine etkisi daha önce literatürde çalışılmamıştır. Santral sinir sisteminde SGLT ekspresyonu olduğu ise çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Yu ve ark., 2010; Yu ve ark., 2013).

GSK-3 β serebral korteks dokusunda incelendi. GSK-3 β 'nın kontrol grubuna kıyasla Alzheimer grubunda yükseldiği gözlemlendi. Önceki çalışmalarda da YYD-STZ indüklü deney hayvanlarında GSK-3 β 'nın beyinde yükseldiği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2010). Uyguladığımız tedavilerden dapagliflozin, metformin ve rivastigmin GSK-3 β 'yı düşürürken, florizin yükselen GSK-3 β üzerine etki etmedi. Dapagliflozin ve florizinin beyin GSK-3 β seviyeleri üzerine etkisini inceleyen bir çalışma literatürde bulunmamıştır. Metforminin beyinde GSK-3 β seviyelerini düşürdüğü daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Farr ve ark., 2019). Rivastigminin de benzer şekilde beyinde GSK-3 β seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir (Akhtar ve ark., 2020).

Tez çalışması kapsamında Alzheimer hastalığında rol oynayan proteinlerden P38 mitojenle aktive olan kinaz (p38 MAPK)'ın gen ekspresyon analizi yapıldı. Protein kinazlar, terapötik uygulamalar ve özellikle kanser için pazarlama onayları ile 21. yüzyılın başından beri ilaç keşfinde önemli hedeflerden biri haline gelmiştir. Bununla birlikte, protein kinazları hedefleyen bileşikler, bu enzimlerin çeşitli patofizyolojik süreçlerdeki önemli rollerine rağmen, diğer terapötik alanlarda hala sınırlıdır. Bu tür kinazlar arasında, MAPK, farklılaşma, mitogenez, hücre sağkalımı ve apoptoz dâhil olmak üzere sayısız hücresel olaydaki rolleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir. P38 MAPK, inflamatuvar sitokinler ve reaktif oksijen türleri (ROS) gibi stres uyaranlarına yanıt veren bir MAPK sınıfıdır. Birçok çalışma, p38 MAPK'nın kronik inflamasyonda merkezi bir rolünü ortaya çıkarmış ve p38 MAPK inhibitörlerinin romatoid artrit ve astım gibi inflamatuvar hastalıklarda uygulanması için klinik öncesi veya klinik denemelere yol açmıştır. P38 MAPK inhibitörlerinin son zamanlarda bir tür kronik inflamatuvar hastalık olan nörodejeneratif hastalıklar için yeni ve potansiyel terapötikler olduğu iddia edilmiştir. AH hastalarının ve hayvan modellerinin ölüm sonrası beyinlerinde p38 MAPK yolunun aktivasyonu gözlemlendiğinden, P38 MAPK'nın AD patolojilerinde farklı rolleri olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, p38 MAPK'nın inhibisyonu, AD tedavisi için umut verici bir terapötik strateji olabilir (Lee ve Kim, 2017). Bundan dolayı bu tez çalışmasında p38 MAPK'nın gen ekspresyonu araştırıldı. Sonuçlarımıza göre kontrol grubuna kıyasla Alzheimer grubunda p38 MAPK ekspresyonu arttı. P38 MAPK, YYD-STZ uygulanan deney hayvanlarında çalışılmış ve periferik dokularda ekspresyonunun değiştiği gösterilmiştir (Cui ve ark., 2018; Lian ve ark., 2017); ancak bu hayvan modelinde p38 MAPK'nın beyinde ekspresyonunun

değişip değişmediği literatürde çalışılmamıştır, dolayısıyla bilinmemektedir. P38 MAPK'nın farklı AH modellerinde beyindeki ekspresyonunun arttığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Schnöder ve ark., 2016). Çalışmamızda uyguladığımız tüm tedavi gruplarında Alzheimer grubuna kıyasla p38 MAPK ekspresyonunda düşüş gözlemlendi. Etkisini araştırdığımız ilaçlar dapagliflozin ve florizinin beyinde p38 MAPK inhibisyonu yaptığı bu şekilde kanıtlandı. Literatürde dapagliflozinin p38 MAPK üzerine etkisinin araştırdığı yalnızca bir çalışma bulunmaktadır. Dapagliflozinin yüksek basınçla indüklenen kardiyak yeniden şekillenme üzerindeki etkisi ve mekanizmasının araştırıldığı bu çalışmada, dapagliflozinin kalpte p38 MAPK'yı inhibe ettiği gösterilmiştir (Shi ve ark., 2019). Çalışmamızda selektif olmayan SGLT inhibitörü olan florizin, dapagliflozine göre p38 MAPK seviyelerini daha fazla düşürdü. Literatürde yalnızca bir çalışmada florizinin p38 MAPK üzerine etkisi değerlendirildi. Florizinin ultraviyole B (UVB) ışınlarına karşı etkileri ve moleküler mekanizmasının araştırıldığı bu çalışmada, UVB'ye maruz kalan nude fare derisinde florizinin p38 MAPK inhibisyonu yaptığı bulunmuştur (Zhai ve ark., 2015). Daha önce yapılan çalışmalarda metforminin beyinde p38 MAPK ekspresyonunu düşürdüğü gözlenmiştir (Abdelsaid ve ark., 2015). Literatürde rivastigminin beyin p38 MAPK üzerine etkileri daha önce çalışılmamıştır.

Ayrıca tez çalışmasında p38 MAPK ekspresyonu pankreas dokusunda da araştırıldı. Çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla Alzheimer grubunda p38 MAPK ekspresyonu arttı. Uyguladığımız tedaviler ise Alzheimer grubuna kıyasla p38 MAPK ekspresyonunu düşürdü. Dapagliflozin, florizine göre daha yüksek düşüş sağlamanın yanında, diğer tedavi grupları arasında da en fazla düşüşe sebep olan tedavi oldu. Dapagliflozin ve florizinin yukarıda belirtildiği gibi sırasıyla kalp ve deri dokularında p38 MAPK düzeyini düşürdüğü literatürde gösterilmiştir (Shi ve ark., 2019; Zhai ve ark., 2015). Rivastigminin yukarıda bahsedildiği gibi p38 MAPK seviyeleri üzerine etkisi daha önce çalışılmamıştır. Metforminin ise pankreas dokusunda p38 MAPK ekspresyonunu düşürdüğü daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (He ve ark., 2021).

Histopatolojik analizler, serebral korteks, hipokampus ve pankreas dokularında yapıldı. Serebral korteks ve hipokampus dokuları incelendiğinde Alzheimer grubunda kontrol grubuna kıyasla şiddetli dejenere nöronlar, vasküler konjesyon ve ödem gözlenmektedir. Literatürde de benzer sonuçlar elde edilmiş, önceki bir çalışmada

kontrol grubu serebral korteks dokusunda normal hücre yapıları gözlenirken; YYD/STZ grubunda piknotik çekirdek ve apoptotik nöronların varlığı, inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu, kan damarı tıkanıklığı ve intranöronal boşluk içinde vakuolasyon ile karakterize edilen nöronlarda dejenerasyon gösterilmiştir (Al-Brakati ve ark., 2020). Ayrıca çalışmamızda uygulanan tedavilerin beyinde oluşan nöronal kayıpları ve dejenerasyonu düzelttiği gözlemlendi. Dapagliflozinin beyindeki histopatolojik değişikliklere etkisini gösteren az sayıda çalışma literatürde mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde rotenon ile Parkinson hastalığı oluşturulmuş deney hayvanlarında dapagliflozinin beyinde meydana gelen dejenerasyonu ve histopatolojik değişiklikleri hafiflettiği gösterilmiştir (Arab ve ark., 2021). Benzer şekilde florizinin beyindeki histopatolojik değişimler üzerine etkisini gösteren az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde icv STZ indüklü AH modelinde florizinin nötrofilik infiltrasyonda düzelmeye sebep olduğu (Janssen ve ark., 2003), bir diğerinde piknotik çekirdekli küçülmüş nöron sayısını azalttığı gösterilmiştir (Ishida ve ark., 2021). Daha önce yapılan bir çalışmada metforminin icv STZ indüklü AH modelinde hipokampus dokusunda nöron dejenerasyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir (Saffari ve ark., 2020). Benzer şekilde rivastigmin de alüminyum indüklü AH modelinde beyin dokusunda nörodejenerasyonu iyileştirmiştir (Kakkar ve Kaur, 2011).

Bu tez çalışmasında pankreas dokusu da histopatolojik olarak incelendi. Sonuçlara göre kontrol ile kıyaslandığında Alzheimer grubu pankreas dokusunda asiner hücre hiperplazisi, hücre hasarı ve otofaji ile beraber endokrin ve ekzokrin hasarın artmış olduğu gösterildi. Literatürde YYD/STZ indüklü deney hayvanlarında YYD/STZ'nin pankreas dokusu üzerindeki histopatolojik etkilerinin incelendiği bir çalışmada, kontrol grubuna kıyasla ciddi pankreas bozulması ve vakuolizasyonun yanı sıra adacıkların boyutunda azalma ve β -hücrelerinin sayısında nispeten azalma gözlenmiştir (Erfani Majd ve ark., 2018). Önceki bir çalışmada da YYD/STZ indüklü deney hayvanlarında dapagliflozinin, pankreas beta hücresinin kendini yenilemesini geliştirdiği, alfa hücreden beta hücresine dönüşümünü indüklediği ve kanaldan türetilmiş beta hücresi neogenezini desteklediği gösterilmiştir (Wei ve ark., 2020). Florizin ile daha önce yapılan nispeten eski bir çalışmada florizin tedavisinin Zucker diyabetik yağlı sıçanların yaşlanması sırasında plazma insülin seviyelerinde düşüşü önlemesine rağmen pankreatik adacıklarında ilerleyici histopatolojik değişiklikler

üzerine etkisi olmadığı gösterilmiştir (Janssen ve ark., 2003). Bunun dışında farklı bir T2DM ya da AH modelinde etkilerinin gösterildiği bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda ise florizin pankreas dokusu üzerinde iyileştirici etki gösterdi. Daha önce yapılan bir çalışmada metformin YYD/STZ indüklü deney hayvanlarında β -hücrelerinin sayısını artırmıştır (Majd ve ark., 2018). Alzheimer olan gruplara dapagliflozin, florizin, metformin ve rivastigmin uygulanması ile pankreas dokularında, Alzheimer grubuna göre asiner hücre hiperplazisi, apoptoz/nekroz ve otofajide azalma görüldü. Rivastigminin ise T2MD veya AH'de pankreasta meydana gelen histopatolojik değişimlere etkisine dair herhangi bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında serebral korteks ve hipokampus dokularında $A\beta_{1-42}$ ve fosforile tau immünohistokimyasal olarak ölçüldü. YYD/STZ ile oluşturulan T2DM indüklü AH modelinde, kontrol ile kıyaslandığında, beyin dokusunun korteks ve hipokampus bölgesinde yoğun amiloid plakları ve tau protein ekspresyonu ortaya çıktı. Alzheimer gruplarına florizin, metformin ve rivastigmin uygulanması sonunda korteks ve hipokampusta yer yer hafif amiloid plakları gözlemlendi. Amiloid plakları en az dapagliflozin uygulanan grupta gözlemlendi. Aynı zamanda, rivastigmin ve dapagliflozin uygulanması ile korteks bölgesinde tau protein ekspresyonu yer yer hafif gözlenirken, metformin ve florizin uygulaması ile bu ekspresyonun daha az olduğu tespit edildi. Literatürde AH oluşturulan sıçanlarda serebral korteks ve hipokampüste $A\beta_{1-42}$ (Mandour ve ark., 2021) ve tau ekspresyonunun arttığı bilinmektedir (Mandour ve ark., 2021). YYD ve STZ ile oluşturulan sıçan modelinde tau ekspresyonunun immünohistokimyasal analizlerle arttığını gösteren yalnızca bir çalışma bulunmaktadır (Cai ve ark., 2013). YYD ve STZ ile oluşturulan sıçan modelinde $A\beta_{1-42}$ ekspresyonunun immünohistokimyasal analizlerle arttığını gösteren bir çalışma bulunmamakla beraber $A\beta_{1-42}$ ekspresyonunun western blot analizi ile arttığı literatürde gösterilmiştir (Cai ve ark., 2013). Literatürde dapagliflozin ve florizinin $A\beta_{1-42}$ ve tau ekspresyonu üzerine etkilerinin immünohistokimyasal ya da farklı bir analiz ile incelendiğine dair bir çalışma bulunmamaktadır. Benzer şekilde metforminin de immünohistokimyasal olarak $A\beta_{1-42}$ ve tau ekspresyonu üzerine etkileri çalışılmamıştır. Rivastigminin ise $A\beta_{1-42}$ ve tau ekspresyonu üzerine olan düzeltici etkileri birçok çalışmada gösterilmiştir.

Daha önce de bahsedildiği gibi AH gittikçe artmakta ancak tedavisi ne yazık ki uzun yıllardır yerinde saymaktadır. Mevcut AH tedavi seçeneklerinin hastalığı iyileştirmede yetersiz olması nedeniyle bu alandaki çalışmalara ve yeni tedavi arayışına ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, T2DM ve AH birbirleri ile ilişkili bulunmakta ve her iki hastalığa etkili ortak bir tedavi stratejisinin hastalıkların birbirini tetiklemesinin önüne geçilmesine fayda sağlayacağı düşünülmektedir. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre non-selektif SGLT inhibitörü florizin ve SGLT2 inhibitörü dapagliflozin T2DM indüklü AH hastalığında iyileştirici etki göstermiştir.



8. KAYNAKLAR

2014 Alzheimer's disease facts and figures. (2014). *Alzheimers Dement.* 10(2), e47-92.

Abdel-Aal RA, Assi AA, Kostandy BB. Rivastigmine reverses aluminum-induced behavioral changes in rats. *Eur J Pharmacol.* 2011;659(2-3): 169-176.

Abdelsaid M, Prakash R, Li W, Coucha M, Hafez S, Johnson MH, Fagan SC, Ergul A. Metformin treatment in the period after stroke prevents oxidative stress and restores angiogenic signaling in the brain in diabetes. *Diabetes.* 2015;64(5):1804-1817.

Abdulmalek S, Nasef M, Awad D, Balbaa M. Protective effect of natural antioxidant, curcumin nanoparticles, and zinc oxide nanoparticles against type 2 diabetes-promoted hippocampal neurotoxicity in rats. *Pharmaceutics.* 2021;13(11):1937.

Adzovic L, Lynn AE, D'Angelo HM, Crockett AM, Kaercher RM, Royer SE, Hopp SC, Wenk GL. Insulin improves memory and reduces chronic neuroinflammation in the hippocampus of young but not aged brains. *Journal of Neuroinflammation.* 2015;12(1):63.

Ahima RS, Antwi DA. Brain regulation of appetite and satiety. *Endocrinology and metabolism clinics of North America.* 2008;37(4):811-823.

Akhtar A, Dhaliwal J, Saroj P, Uniyal A, Bishnoi M, Sah SP. Chromium picolinate attenuates cognitive deficit in ICV-STZ rat paradigm of sporadic Alzheimer's-like dementia via targeting neuroinflammatory and IRS-1/PI3K/AKT/GSK-3 β pathway. *Inflammopharmacology.* 2020;28(2):385-400.

Al-Brakati A, Albarakati AJA, Daabo H, Baty RS, Salem FEH, Habotta OA, Elmahallawy EK, Abdel-Mohsen DM, Taha H, Akabawy A. Neuromodulatory effects of green coffee bean extract against brain damage in male albino rats with experimentally induced diabetes. *Metabolic Brain Disease*. 2020;35(7):1175-1187.

Ali MA, El-Abhar HS, Kamel MA, Attia AS. Antidiabetic effect of galantamine: novel effect for a known centrally acting drug. *PLoS ONE*. 2015;10(8):e0134648.

Alvarez A, Bronfman F, Pérez CA, Vicente M, Garrido J, Inestrosa NC. Acetylcholinesterase, a senile plaque component, affects the fibrillogenesis of amyloid-beta-peptides. *Neurosci Lett*. 1995;201(1):49-52.

Amin SN, Younan SM, Youssef MF, Rashed LA, Mohamady I. A histological and functional study on hippocampal formation of normal and diabetic rats. *F1000Res*. 2013;2:151.

Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*. 2012;13(2):93-110.

Arab HH, Safar MM, Shahin NN. Targeting ROS-dependent AKT/GSK-3 β /NF- κ B and DJ-1/Nrf2 pathways by dapagliflozin attenuates neuronal injury and motor dysfunction in rotenone-induced Parkinson's disease rat model. *ACS Chem Neurosci*. 2021;12(4):689-703.

Arafa NMS, Ali EHA, Hassan MK. Canagliflozin prevents scopolamine-induced memory impairment in rats: Comparison with galantamine hydrobromide action. *Chem Biol Interact*. 2017;277:195-203.

Armagan G, Keser A, Atalayın Ç, Dagcı T. Tideglusib protects neural stem cells against NMDA receptor overactivation. *Pharmacol Rep.* 2015;67(5):823-831.

Arnold SE, Lucki I, Brookshire BR, Carlson GC, Browne CA, Kazi H, Bang S, Choi BR, Chen Y, McMullen MF, Kim SF. High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. *Neurobiol Dis.* 2014;67:79-87.

Artiga MJ, Bullido MJ, Sastre I, Recuero M, García MA, Aldudo J, Vázquez J, Valdivieso F. Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene. *FEBS Lett.* 1998;421(2):105-108.

Asadbegi M, Yaghmaei P, Salehi I, Ebrahim-Habibi A, Komaki A. Neuroprotective effects of metformin against A β -mediated inhibition of long-term potentiation in rats fed a high-fat diet. *Brain Res Bull.* 2016;121:178-185.

Asuni AA, Boutajangout A, Quartermain D, Sigurdsson EM. Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2007;27(34):9115-9129.

Austin SA, Santhanam AV, Hinton DJ, Choi DS, Katusic ZS. Endothelial nitric oxide deficiency promotes Alzheimer's disease pathology. *J Neurochem.* 2013;127(5):691-700.

Aydemir AT, Alper M, Kockar F. SP1-mediated downregulation of ADAMTS3 gene expression in osteosarcoma models. *Gene.* 2018;659:1-10.

Bales KR, Liu F, Wu S, Lin S, Koger D, DeLong C, Hansen JC, Sullivan PM, Paul SM. Human APOE isoform-dependent effects on brain beta-amyloid levels in PDAPP transgenic mice. *J Neurosci*. 2009;29(21):6771-6779.

Ballantyne CM, Hoogeveen RC, McNeill AM, Heiss G, Schmidt MI, Duncan BB, Pankow JS. Metabolic syndrome risk for cardiovascular disease and diabetes in the ARIC study. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(2):S21-24.

Banks WA, Jaspan JB, Kastin AJ. Effect of diabetes mellitus on the permeability of the blood-brain barrier to insulin. *Peptides*. 1997;18(10):1577-1584.

Banks WA, Owen JB, Erickson MA. Insulin in the brain: there and back again. *Pharmacol Ther*. 2012;136(1):82-93.

Bateman RJ, Siemers ER, Mawuenyega KG, Wen G, Browning KR, Sigurdson WC, Yarasheski KE, Friedrich SW, Demattos RB, May PC, Paul SM, Holtzman DM. A gamma-secretase inhibitor decreases amyloid-beta production in the central nervous system. *Ann Neurol*. 2009;66(1): 48-54.

Bevins RA, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1306-1311.

Bezprozvanny I. The rise and fall of Dimebon. *Drug News Perspect*. 2010;23(8):518-523.

Biessels GJ, Reagan LP. Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(11), 660-671.

Bonora E. The metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Ann Med.* 2006;38(1):64-80.

Brodbeck J, McGuire J, Liu Z, Meyer-Franke A, Balestra ME, Jeong DE, Pleiss M, McComas C, Hess F, Witter D, Peterson S, Childers M, Goulet M, Liverton N, Hargreaves R, Freedman S, Weisgraber KH, Mahley RW, Huang Y. Structure-dependent impairment of intracellular apolipoprotein E4 trafficking and its detrimental effects are rescued by small-molecule structure correctors. *J Biol Chem.* 2011;286(19):17217-17226.

Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(10):783-793.

Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Müller-Wieland D, Kahn CR. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science.* 2000;289(5487):2122-2125.

Cai Z, Yan Y, Wang Y. Minocycline alleviates beta-amyloid protein and tau pathology via restraining neuroinflammation induced by diabetic metabolic disorder. *Clin Interv Aging.* 2013;8:1089-1095.

Calzavara MB, Medrano WA, Levin R, Kameda SR, Andersen ML, Tufik S, Silva RH, Frussa-Filho R, Abílio VC. Neuroleptic drugs revert the contextual fear conditioning deficit presented by spontaneously hypertensive rats: a potential animal model of emotional context processing in schizophrenia? *Schizophr Bull.* 2009;35(4):748-759.

Cam M, Yıldız S, Ertas B, Acar A, Taşkın T, Kabasakal L. Antidiabetic effects of *Salvia triloba* and *Thymus praecox* subsp. *Skorpilii* var. *skorpilii* in a rat model of streptozotocin/nicotinamide-induced diabetes. *Marmara Pharmaceutical Journal*. 2017;21:818-827.

Cam ME, Ertas B, Alenezi H, Hazar-Yavuz AN, Cesur S, Ozcan GS, Ekentok C, Guler E, Katsakouli C, Demirbas Z, Akakin D, Eroglu MS, Kabasakal L, Gunduz O, Edirisinghe M. Accelerated diabetic wound healing by topical application of combination oral antidiabetic agents-loaded nanofibrous scaffolds: An in vitro and in vivo evaluation study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;119111586.

Cam ME, Hazar-Yavuz AN, Yildiz S, Ertas B, Ayaz Adakul B, Taskin T, Alan S, Kabasakal L. The methanolic extract of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii* restores glucose homeostasis, ameliorates insulin resistance and improves pancreatic β -cell function on streptozotocin/nicotinamide-induced type 2 diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2019;231:29-38.

Carvalho C, Machado N, Mota PC, Correia SC, Cardoso S, Santos RX, Santos MS, Oliveira CR, Moreira PI. Type 2 diabetic and Alzheimer's disease mice present similar behavioral, cognitive, and vascular anomalies. *J Alzheimers Dis*. 2013;35(3):623-635.

Cassano V, Leo A, Tallarico M, Nesci V, Cimellaro A, Fiorentino TV, Citraro R, Hribal ML, De Sarro G, Perticone F, Sesti G, Russo E, Sciacqua A. Metabolic and cognitive effects of ranolazine in type 2 diabetes mellitus: data from an in vivo model. *Nutrients*. 2020;12(2):382.

Castellano JM, Kim J, Stewart FR, Jiang H, DeMattos RB, Patterson BW, Fagan AM, Morris JC, Mawuenyega KG, Cruchaga C, Goate AM, Bales K R, Paul SM, Bateman

RJ, Holtzman DM. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Science translational medicine*. 2011;3(89):89ra57.

Chao EC, Henry RR. SGLT2 inhibition — a novel strategy for diabetes treatment. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010;9(7):551-559.

Charnigo RJ, Beidler D, Rybin D, Pittman DD, Tan B, Howard J, Michelson AD, Frelinger AL, Clarke N. PF-04447943, a phosphodiesterase 9A inhibitor, in stable sickle cell disease patients: a phase Ib randomized, placebo-controlled study. *Clinical and translational science*. 2019;12(2):180-188.

Chen Y, Durakoglugil MS, Xian X, Herz J. ApoE4 reduces glutamate receptor function and synaptic plasticity by selectively impairing ApoE receptor recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(26):12011-12016.

Chen Z, Zhong C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Prog Neurobiol*. 2013;108:21-43.

Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(8):233-236.

Citron M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010;9(5):387-398.

American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 2015;38:8-16.

American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes-2018. *Diabetes Care*. 2018;41(1):13-27.

Claxton A, Baker LD, Hanson A, Trittschuh EH, Cholerton B, Morgan A, Callaghan M, Arbuckle M, Behl C, Craft S. Long-acting intranasal insulin detemir improves cognition for adults with mild cognitive impairment or early-stage Alzheimer's disease dementia. *J Alzheimers Dis*. 2015;44(3):897-906.

Cohen E, Paulsson JF, Blinder P, Burstyn-Cohen T, Du D, Estepa G, Adame A, Pham HM, Holzenberger M, Kelly JW, Masliah E, Dillin A. Reduced IGF-1 signaling delays age-associated proteotoxicity in mice. *Cell*. 2009;139(6):1157-1169.

Cohen TJ, Guo JL, Hurtado DE, Kwong LK, Mills IP, Trojanowski JQ, Lee VM. The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation. *Nat Commun*. 2011;2:252.

Cole GM, Frautschy SA. Mechanisms of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2010;9(2):140-148.

Comim CM, Pereira JG, Steckert A, Petronilho F, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Rivastigmine reverses habituation memory impairment observed in sepsis survivor rats. *Shock*. 2009;32(3):270-271.

Convit A, Wolf OT, Tarshish C, de Leon MJ. Reduced glucose tolerance is associated with poor memory performance and hippocampal atrophy among normal elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(4):2019-2022.

Craft S, Peskind E, Schwartz MW, Schellenberg GD, Raskind M, Porte D. Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype. *Neurology*. 1998;50(1):164-168.

Cui X, Qian DW, Jiang S, Shang EX, Zhu ZH, Duan JA. Scutellariae radix and coptidis rhizoma improve glucose and lipid metabolism in T2DM rats via regulation of the metabolic profiling and MAPK/PI3K/Akt signaling pathway. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11).

Cummings JL. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2004;351(1):56-67.

DaRocha-Souto B, Coma M, Pérez-Nievas BG, Scotton TC, Siao M, Sánchez-Ferrer P, Hashimoto T, Fan Z, Hudry E, Barroeta I, Serenó L, Rodríguez M, Sánchez MB, Hyman BT, Gómez-Isla T. Activation of glycogen synthase kinase-3 beta mediates β -amyloid induced neuritic damage in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2012;45(1):425-437.

de la Monte SM. Contributions of brain insulin resistance and deficiency in amyloid-related neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Drugs*. 2012;72(1):49-66.

de la Torre JC. Impaired cerebrovascular perfusion. Summary of evidence in support of its causality in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;924:136-152.

de Matos AM, de Macedo MP, Rauter AP. Bridging Type 2 diabetes and Alzheimer's disease: assembling the puzzle pieces in the quest for the molecules with therapeutic and preventive potential. *Med Res Rev*. 2018;38(1):261-324.

De Strooper B, Vassar R, Golde T. The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nature reviews. Neurology*. 2010;6(2):99-107.

Del Prato S, Marchetti P. Beta- and alpha-cell dysfunction in type 2 diabetes. *Horm Metab Res*. 2004;36(11-12): 775-781.

Deninno MP, Andrews M, Bell AS, Chen Y, Eller-Zarbo C, Eshelby N, Etienne JB, Moore DE, Palmer MJ, Visser MS, Yu LJ, Zavadski WJ, Michael Gibbs E. The discovery of potent, selective, and orally bioavailable PDE9 inhibitors as potential hypoglycemic agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009;19(9):2537-2541.

Despa S, Margulies KB, Chen L, Knowlton AA, Havel PJ, Taegtmeyer H, Bers DM, Despa F. Hyperamylinemia contributes to cardiac dysfunction in obesity and diabetes: a study in humans and rats. *Circulation research*. 2012;110(4):598-608.

Devaskar SU, Giddings SJ, Rajakumar PA, Carnaghi LR, Menon RK, Zahm DS. Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *J Biol Chem*. 1994;269(11):8445-8454.

Devi L, Alldred MJ, Ginsberg SD, Ohno M. Mechanisms underlying insulin deficiency-induced acceleration of β -amyloidosis in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE*. 2012;7(3): e32792.

Dias C, Rauter AP. Chapter 8 Carbohydrates and glycomimetics in Alzheimer's disease therapeutics and diagnosis. In *Carbohydrates in Drug Design and Discovery*. The Royal Society of Chemistry. p:180-208.

Dias C, Rauter AP, Jimenez-Barbero J, Canada FJ, Martin-Santamaria S. Carbohydrates in drug design and discovery. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2015; p:180-204.

Dickey CA, Kamal A, Lundgren K, Klosak N, Bailey RM, Dunmore J, Ash P, Shoraka S, Zlatkovic J, Eckman CB, Patterson C, Dickson DW, Nahman NS, Hutton M, Burrows F, Petrucelli L. The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. *J Clin Invest.* 2007;117(3):648-658.

Dinamarca MC, Sagal JP, Quintanilla RA, Godoy JA, Arrázola MS, Inestrosa NC. Amyloid-beta-Acetylcholinesterase complexes potentiate neurodegenerative changes induced by the Aβ peptide. Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2010;5:4.

Domínguez JM, Fuertes A, Orozco L, del Monte-Millán M, Delgado E, Medina M. Evidence for irreversible inhibition of glycogen synthase kinase-3β by tideglusib. *The Journal of biological chemistry.* 2012;287(2):893-904.

Doré S, Kar S, Rowe W, Quirion R. Distribution and levels of [125I]IGF-I, [125I]IGF-II and [125I]insulin receptor binding sites in the hippocampus of aged memory-unimpaired and -impaired rats. *Neuroscience.* 1997;80(4):1033-1040.

El-Hawary SS, Hammam WE, El-Mahdy El-Tantawi M, Yassin NAZ, Kirolos FN, Abdelhameed MF, Abdelfattah MAO, Wink M, Sobeh M. Apple leaves and their major secondary metabolite florizin exhibit distinct neuroprotective activities: Evidence from in vivo and in silico studies. *Arabian Journal of Chemistry.* 2021;14(6):103188.

El-Safty H, Ismail A, Mohsen R, El-Sahar AE, Saad MA. Dapagliflozin diminishes memory and cognition impairment in Streptozotocin induced diabetes through its effect on Wnt/ β -Catenin and CREB pathway. *Brain Res Bull.* 2022.

Erfani Majd N, Tabandeh MR, Shahriari A, Soleimani Z. Okra (*Abelmoschus esculentus*) improved islets structure, and down-regulated PPARs gene expression in pancreas of high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Journal.* 2018;20(1):31-40.

Evans CG, Jinwal UK, Makley LN, Dickey CA, Gestwicki JE. Identification of dihydropyridines that reduce cellular tau levels. *Chemical Communications (Cambridge, England).* 2011;47(1):529-531.

Falusi V, Oluwayomi S, Imoukhuede B, Oladipo G. *Alstonia boonei* leaf mitigated deleterious effects of experimental type-II-diabetes-mellitus against pancreatic and neurocognitive functions. *Asian Journal of Research in Biochemistry.* 2021;8:19-35.

Farr SA, Roesler E, Niehoff ML, Roby DA, McKee A, Morley JE. Metformin improves learning and memory in the SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2019;68(4):1699-1710.

Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *Jama.* 1997;278(16):1349-1356.

Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of

insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(7):4162-4167.

International Diabetes Federation. *International Diabetes Federation (IDF) Diabetes Atlas*, 7th Edition. 2015.

International Diabetes Federation. *International Diabetes Federation (IDF) Diabetes Atlas* 10th Edition. 2021.

Fukumoto H, Cheung BS, Hyman BT, Irizarry MC. Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2002;59(9):1381-1389.

Furukawa-Hibi Y, Alkam T, Nitta A, Matsuyama A, Mizoguchi H, Suzuki K, Moussaoui S, Yu QS, Greig N. H, Nagai T, Yamada K. Butyrylcholinesterase inhibitors ameliorate cognitive dysfunction induced by amyloid- β peptide in mice. *Behavioural Brain Research*. 2011;225(1):222-229.

Galimberti D, Scarpini E. Inflammation and oxidative damage in Alzheimer's disease: friend or foe? *Front Biosci*. 2011;3:252-266.

Genders AJ, Bradley EA, Rattigan S, Richards SM. cGMP phosphodiesterase inhibition improves the vascular and metabolic actions of insulin in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;301(2):E342-350.

Ghosh AK, Brindisi M, Yen YC, Xu X, Huang X, Devasamudram T, Bilcer G, Lei H, Koelsch G, Mesecar AD, Tang J. Structure-based design, synthesis and biological

evaluation of novel β -secretase inhibitors containing a pyrazole or thiazole moiety as the P3 ligand. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015;25(3):668-672.

Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, Eisner L, Kirby L, Rovira MB, Forette F, Orgogozo JM. Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology*. 2005;64(9):1553-1562.

Gocmez SS, Şahin TD, Yazir Y, Duruksu G, Eraldemir FC, Polat S, Utkan T. Resveratrol prevents cognitive deficits by attenuating oxidative damage and inflammation in rat model of streptozotocin diabetes induced vascular dementia. *Physiology & Behavior*. 2019;201:198-207.

Golde TE, Eckman CB, Younkin SG. Biochemical detection of Abeta isoforms: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1502(1):172-187.

Golde TE, Schneider LS, Koo EH. Anti-a β therapeutics in Alzheimer's disease: the need for a paradigm shift. *Neuron*. 2011;69(2):203-213.

Gothwal A, Singh H, Jain SK, Dutta A, Borah A, Gupta U. Behavioral and biochemical implications of dendrimeric rivastigmine in memory-deficit and Alzheimer's induced rodents. *ACS Chemical Neuroscience*. 2019;10(8):3789-3795.

Gozes I, Stewart A, Morimoto B, Fox A, Sutherland K, Schmeche D. Addressing Alzheimer's disease tangles: from NAP to AL-108. *Current Alzheimer Research*. 2009;6(5):455-460.

Gresele P, Momi S, Falcinelli E. Anti-platelet therapy: phosphodiesterase inhibitors. *Br J Clin Pharmacol*. 2011;72(4):634-646.

Guo X.X, Wang Y, Wang K, Ji BP, Zhou F. Stability of a type 2 diabetes rat model induced by high-fat diet feeding with low-dose streptozotocin injection. *Journal of Zhejiang University. Science. B.* 2018;19(7):559-569.

Gupta P, Tiwari S, Singh A, Pal A, Mishra A, Singh S. Rivastigmine attenuates the Alzheimer's disease related protein degradation and apoptotic neuronal death signalling. *Biochem J.* 2021;478(7): 1435-1451.

Gura T. Hope in Alzheimer's fight emerges from unexpected places. *Nat Med.* 2008;14(9):894.

Hansen HH, Barkholt P, Fabricius K, Jelsing J, Terwel D, Pyke C, Knudsen LB, Vrang N. The GLP-1 receptor agonist liraglutide reduces pathology-specific tau phosphorylation and improves motor function in a transgenic hTauP301L mouse model of tauopathy. *Brain Res.* 2016;1634:158-170.

Hanyu H, Sato T, Kiuchi A, Sakurai H, Iwamoto T. Pioglitazone improved cognition in a pilot study on patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment with diabetes mellitus. *J Am Geriatr Soc.* 2009;57(1):177-179.

Harada S, Yamazaki Y, Nishioka H, Tokuyama S. Neuroprotective effect through the cerebral sodium–glucose transporter on the development of ischemic damage in global ischemia. *Brain Research.* 2013;1541:61-68.

Harris H, Rubinsztein DC. Control of autophagy as a therapy for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol.* 2011;8(2):108-117.

Hasselbalch SG, Knudsen GM, Videbaek C, Pinborg LH, Schmidt JF, Holm S, Paulson OB. No effect of insulin on glucose blood-brain barrier transport and cerebral metabolism in humans. *Diabetes*. 1999;48(10):1915-1921.

Hazar-Yavuz AN, Kaya RK, Ertas B, Cam ME, Topal F, Kabasakal L. Sodium-glucose co-transporter inhibitor dapagliflozin enhanced cognitive deficits in diabetes mellitus-induced Alzheimer's disease rat model. 12th International Congress on Psychopharmacology. 2021:103.

He X, Gao F, Hou J, Li T, Tan J, Wang C, Liu X, Wang M, Liu H, Chen Y, Yu Z, Yang M. Metformin inhibits MAPK signaling and rescues pancreatic aquaporin 7 expression to induce insulin secretion in type 2 diabetes mellitus. *J Biol Chem*. 2021;297(2):101002.

Hierro-Bujalance C, Infante-Garcia C, Del Marco A, Herrera M, Carranza-Naval MJ, Suarez J, Alves-Martinez P, Lubian-Lopez S, Garcia-Alloza M. Empagliflozin reduces vascular damage and cognitive impairment in a mixed murine model of Alzheimer's disease and type 2 diabetes. *Alzheimers Res Ther*. 2020;12(1):40.

Hiramatsu M, Takiguchi O, Nishiyama A, Mori H. Cilostazol prevents amyloid β peptide(25-35)-induced memory impairment and oxidative stress in mice. *Br J Pharmacol*. 2010;161(8):1899-1912.

Hishikawa N, Yamashita T, Deguchi K, Wada J, Shikata K, Makino H, Abe K. Cognitive and affective functions in diabetic patients associated with diabetes-related factors, white matter abnormality and aging. *Eur J Neurol*. 2015;22(2):313-321.

Hobday AL, Parmar MS. The link between diabetes mellitus and tau hyperphosphorylation: implications for risk of Alzheimer's Disease. *Cureus*. 2021;13(9):e18362-e18362.

Holtzman DM. In vivo effects of ApoE and clusterin on amyloid-beta metabolism and neuropathology. *J Mol Neurosci.* 2004;23(3):247-254.

Holtzman DM, Bales KR, Paul SM, DeMattos RB. Abeta immunization and anti-Abeta antibodies: potential therapies for the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(12):1603-1613.

Holtzman DM, Bales KR, Wu S, Bhat P, Parsadanian M, Fagan AM, Chang LK, Sun Y, Paul SM. Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid-beta deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Clin Invest.* 1999;103(6):R15-r21.

Hoover BR, Reed MN, Su J, Penrod RD, Kotilinek LA, Grant MK, Pitstick R, Carlson GA, Lanier LM, Yuan LL, Ashe KH, Liao D. Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron.* 2010;68(6):1067-1081.

Horai S, Nakagawa S, Tanaka K, Morofuji Y, Couraud PO, Deli MA, Ozawa M, Niwa M. Cilostazol strengthens barrier integrity in brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol.* 2013;33(2):291-307.

Hu SH, Jiang T, Yang SS, Yang Y. Pioglitazone ameliorates intracerebral insulin resistance and tau-protein hyperphosphorylation in rats with type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2013;121(4):220-224.

Huang CJ, Haataja L, Gurlo T, Butler AE, Wu X, Soeller WC, Butler PC. Induction of endoplasmic reticulum stress-induced beta-cell apoptosis and accumulation of polyubiquitinated proteins by human islet amyloid polypeptide. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(6):E1656-1662.

Huang Y. Molecular and cellular mechanisms of apolipoprotein E4 neurotoxicity and potential therapeutic strategies. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2006;9(5):627-641.

Huang Y, Weisgraber KH, Mucke L, Mahley RW. Apolipoprotein E: diversity of cellular origins, structural and biophysical properties, and effects in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci.* 2004;23(3):189-204.

Humpel C, Marksteiner J. Cerebrovascular damage as a cause for Alzheimer's disease. *Curr Neurovasc Res.* 2005;2(4):341-347.

Hutson PH, Finger EN, Magliaro BC, Smith SM, Converso A, Sanderson PE, Mullins D, Hyde LA, Eschle BK, Turnbull Z, Sloan H, Guzzi M, Zhang X, Wang A, Rindgen D, Mazzola R, Vivian JA, Eddins D, Uslaner JM, Parmentier-Batteur S. The selective phosphodiesterase 9 (PDE9) inhibitor PF-04447943 (6-[(3S,4S)-4-methyl-1-(pyrimidin-2-ylmethyl)pyrrolidin-3-yl]-1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1,5-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one) enhances synaptic plasticity and cognitive function in rodents. *Neuropharmacology.* 2011;61(4):665-676.

Ihara M, Nishino M, Taguchi A, Yamamoto Y, Hattori Y, Saito S, Takahashi Y, Tsuji M, Kasahara Y, Takata Y, Okada M. Cilostazol add-on therapy in patients with mild dementia receiving donepezil: a retrospective study. *PLoS ONE.* 2014;9(2):e89516-e89516.

Ishida N, Saito M, Sato S, Tezuka Y, Sanbe A, Taira E, Hirose M. Mizagliflozin, a selective SGLT1 inhibitor, improves vascular cognitive impairment in a mouse model of small vessel disease. *Pharmacology Research & Perspectives.* 2021;9(5):e00869.

Isik AT, Bozoglu E, Eker D. aChE and BuChE inhibition by rivastigmin have no effect on peripheral insulin resistance in elderly patients with Alzheimer disease. *J Nutr Health Aging*. 2012;16(2):139-141.

Jankowsky JL, Fadale D J, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Lee MK, Younkin LH, Wagner SL, Younkin SG, Borchelt DR. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. *Human Molecular Genetics*. 2003;13(2):159-170.

Janson J, Ashley RH, Harrison D, McIntyre S, Butler PC. The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles. *Diabetes*. 1999;48(3):491-498.

Janssen SWJ, Martens GJM, Sweep CGJ, Span PN, Verhofstad AAJ, Hermus ARMM. Florizin treatment prevents the decrease in plasma insulin levels but not the progressive histopathological changes in the pancreatic islets during aging of Zucker diabetic fatty rats. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2003;26(6): 508-515.

Jiang LY, Tang SS, Wang XY, Liu LP, Long Y, Hu M, Liao MX, Ding QL, Hu W, Li JC, Hong H. PPAR γ agonist pioglitazone reverses memory impairment and biochemical changes in a mouse model of type 2 diabetes mellitus. *CNS Neurosci Ther*. 2012;18(8):659-666.

Kaidanovich O, Eldar-Finkelman H. The role of glycogen synthase kinase-3 in insulin resistance and type 2 diabetes. *Expert Opin Ther Targets*. 2002;6(5):555-561.

Kaiyala KJ, Prigeon RL, Kahn SE, Woods SC, Schwartz MW. Obesity induced by a high-fat diet is associated with reduced brain insulin transport in dogs. *Diabetes*. 2000;49(9):1525-1533.

Kakkar V, Kaur IP. Evaluating potential of curcumin loaded solid lipid nanoparticles in aluminium induced behavioural, biochemical and histopathological alterations in mice brain. *Food and Chemical Toxicology*. 2011;49(11):2906-2913.

Kamdi SP, Raval A, Nakhate KT. Phloridzin attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive impairment via antioxidant, anti-inflammatory and neuromodulatory activities. *Cytokine*. 2021;139:155408.

Kang S, Kim CH, Jung H, Kim E, Song HT, Lee JE. Agmatine ameliorates type 2 diabetes induced-Alzheimer's disease-like alterations in high-fat diet-fed mice via reactivation of blunted insulin signalling. *Neuropharmacology*. 2017;113(PtA):467-479.

Karkanias GB, Morales JC, Li CS. Deficits in reproductive behavior in diabetic female rats are due to hypoinsulinemia rather than hyperglycemia. *Horm Behav*. 1997;32(1):19-29.

Karran E, Mercken M, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(9):698-712.

Kawahara M, Kuroda Y, Arispe N, Rojas E. Alzheimer's beta-amyloid, human islet amylin, and prion protein fragment evoke intracellular free calcium elevations by a common mechanism in a hypothalamic GnRH neuronal cell line. *J Biol Chem*. 2000;275(19):14077-14083.

Kesavulu MM, Giri R, Kameswara Rao B, Apparao C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in type 2 diabetics with microvascular complications. *Diabetes Metab.* 2000;26(5):387-392.

Khachaturian AS, Corcoran CD, Mayer LS, Zandi PP, Breitner JC. Apolipoprotein E epsilon4 count affects age at onset of Alzheimer disease, but not lifetime susceptibility: The Cache County Study. *Arch Gen Psychiatry.* 2004;61(5):518-524.

Khan T, Khan S, Akhtar M, Ali J, Najmi AK. Empagliflozin nanoparticles attenuates type2 diabetes induced cognitive impairment via oxidative stress and inflammatory pathway in high fructose diet induced hyperglycemic mice. *Neurochem Int.* 2021;150:105158.

Kim B, Backus C, Oh S, Feldman EL. Hyperglycemia-induced tau cleavage in vitro and in vivo: a possible link between diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2013;34(3):727-739.

Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron.* 2009;63(3):287-303.

Kim J, Jiang H, Park S, Eltorai AE, Stewart FR, Yoon H, Basak JM, Finn MB, Holtzman D.M. Haploinsufficiency of human APOE reduces amyloid deposition in a mouse model of amyloid- β amyloidosis. *J Neurosci.* 2011;31(49):18007-18012.

Ko CY, Xu JH, Lo YM, Tu RS, Wu JSB, Huang WC, Shen SC. Alleviative effect of alpha-lipoic acid on cognitive impairment in high-fat diet and streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Frontiers in aging neuroscience.* 2021;13:774477-774477.

Ko SY, Ko HA, Chu KH, Shieh TM, Chi TC, Chen HI, Chang WC, Chang SS. The Possible mechanism of advanced glycation end products (AGEs) for Alzheimer's disease. PLoS ONE. 2015;10(11):e0143345.

Koekkoek PS, Kappelle LJ, van den Berg E, Rutten GE, Biessels GJ. Cognitive function in patients with diabetes mellitus: guidance for daily care. Lancet Neurol. 2015;14(3):329-340.

Koh MT, Haberman RP, Foti S, McCown TJ, Gallagher M. Treatment strategies targeting excess hippocampal activity benefit aged rats with cognitive impairment. Neuropsychopharmacology. 2010;35(4):1016-1025.

Kotronen A, Juurinen L, Tiikkainen M, Vehkavaara S, Yki-Järvinen H. Increased liver fat, impaired insulin clearance, and hepatic and adipose tissue insulin resistance in type 2 diabetes. Gastroenterology. 2008;135(1): 122-130.

Krook A, Kawano Y, Song XM, Efendić S, Roth RA, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR. Improved glucose tolerance restores insulin-stimulated Akt kinase activity and glucose transport in skeletal muscle from diabetic Goto-Kakizaki rats. Diabetes. 1997;46(12):2110-2114.

Kumar M, Bhattacharya V. Cilostazol: a new drug in the treatment intermittent claudication. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov. 2007;2(3):181-185.

Kumar-Singh S, Theuns J, Van Broeck B, Pirici D, Vennekens K, Corsmit E, Cruts M, Dermaut B, Wang R, Van Broeckhoven C. Mean age-of-onset of familial alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased Abeta42 and decreased Abeta40. Hum Mutat. 2006;27(7):686-695.

Kwon KJ, Lee EJ, Kim MK, Kim SY, Kim JN, Kim JO, Kim HJ, Kim HY, Han JS, Shin CY, Han SH. Diabetes augments cognitive dysfunction in chronic cerebral hypoperfusion by increasing neuronal cell death: implication of cilostazol for diabetes mellitus-induced dementia. *Neurobiol Dis.* 2015;73:12-23.

Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol.* 2018;25(1):59-70.

Lebovitz HE, Banerji MA. Treatment of insulin resistance in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol.* 2004;490(1-3):135-146.

Lee HP, Zhu X, Casadesus G, Castellani RJ, Nunomura A, Smith MA, Lee HG, Perry G. Antioxidant approaches for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother.* 2010;10(7): 1201-1208.

Lee JK, Kim NJ. Recent advances in the inhibition of p38 mapk as a potential strategy for the treatment of Alzheimer's disease. *Molecules.* 2017;22(8).

Lee SC, Kim HT, Park CH, Lee DY, Chang HJ, Park S, Cho JM, Ro S, Suh YG. Design, synthesis and biological evaluation of novel imidazopyridines as potential antidiabetic GSK3 β inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012;22(13):4221-4224.

Leibson CL, Rocca WA, Hanson VA, Cha R, Kokmen E, O'Brien PC, Palumbo PJ. The risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;826: 422-427.

Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2008;51(2):216-226.

Li X, Lu F, Tian Q, Yang Y, Wang Q, Wang JZ. Activation of glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer-like tau hyperphosphorylation in rat hippocampus slices in culture. *J Neural Transm (Vienna)*. 2006;113(1): 93-102.

Lian H, Cheng Y, Wu X. TMEM16A exacerbates renal injury by activating P38/JNK signaling pathway to promote podocyte apoptosis in diabetic nephropathy mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;487(2):201-208.

Lin B, Koibuchi N, Hasegawa Y, Sueta D, Toyama K, Uekawa K, Ma M, Nakagawa T, Kusaka H, Kim-Mitsuyama S. Glycemic control with empagliflozin, a novel selective SGLT2 inhibitor, ameliorates cardiovascular injury and cognitive dysfunction in obese and type 2 diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13:148.

Lin WS, Lo JH, Yang JH, Wang HW, Fan SZ, Yen JH, Wang PY. *Ludwigia octovalvis* extract improves glycemic control and memory performance in diabetic mice. *J Ethnopharmacol*. 2017;207:211-219.

Liu JS, Chuang TJ, Chen JH, Lee CH, Hsieh CH, Lin TK, Hsiao FC, Hung YJ. Cilostazol attenuates the severity of peripheral arterial occlusive disease in patients with type 2 diabetes: the role of plasma soluble receptor for advanced glycation end-products. *Endocrine*. 2015;49(3):703-710.

Liu S, Zheng M, Li Y, He L, Chen T. The protective effect of Geniposide on diabetic cognitive impairment through BTK/TLR4/NF- κ B pathway. *Psychopharmacology*. 2020;237(2):465-477.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.

Lopez OL, Kuller LH. Chapter 9 - Epidemiology of aging and associated cognitive disorders: Prevalence and incidence of Alzheimer's disease and other dementias. In S. T. Dekosky & S. Asthana (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier. 2019; vol. 167, p. 139-148.

Lovestone S, Boada M, Dubois B, Hüll M, Rinne JO, Huppertz HJ, Calero M, Andrés MV, Gómez-Carrillo B, León T, del Ser T. A phase II trial of tideglusib in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2015;45(1):75-88.

Luchsinger JA, Tang MX, Shea S, Mayeux R. Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease. *Neurology*. 2004;63(7):1187-1192.

Luna-Medina R, Cortes-Canteli M, Sanchez-Galiano S, Morales-Garcia JA, Martinez A, Santos A, Perez-Castillo A. NP031112, a thiadiazolidinone compound, prevents inflammation and neurodegeneration under excitotoxic conditions: potential therapeutic role in brain disorders. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(21):5766-5776.

Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(15):5644-5651.

Mandour DA, Bendary MA, Alsemeh AE. Histological and imunohistochemical alterations of hippocampus and prefrontal cortex in a rat model of Alzheimer like-disease with a preferential role of the flavonoid "hesperidin". *J Mol Histol*. 2021;52(5):1043-1065.

Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Sagara Y, Mallory M, Hashimoto M, Mucke L. beta-amyloid peptides enhance alpha-synuclein accumulation and neuronal deficits

in a transgenic mouse model linking Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(21):12245-12250.

Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL. Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15056.

Mathiasen JR, DiCamillo A. Novel object recognition in the rat: a facile assay for cognitive function. *Curr Protoc Pharmacol*. 2010;5:5.59.

Matsuda T, Hisatsune T. Cholinergic Modification of Neurogenesis and Gliosis Improves the Memory of A β PP^{swe}/PSEN1^{dE9} Alzheimer's Disease Model Mice Fed a High-Fat Diet. *J Alzheimers Dis*. 2017;56(1):1-23.

Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science*. 2010;330(6012):1774.

McClellan PL, Jalewa J, Hölscher C. Prophylactic liraglutide treatment prevents amyloid plaque deposition, chronic inflammation and memory impairment in APP/PS1 mice. *Behav Brain Res*. 2015;293:96-106.

Messier C, Gagnon M. Glucose regulation and cognitive functions: relation to Alzheimer's disease and diabetes. *Behav Brain Res*. 1996;75(1-2):1-11.

Miklossy J, Qing H, Radenovic A, Kis A, Vilenó B, László F, Miller L, Martins RN, Waeber G, Mooser V, Bosman F, Khalili K, Darbinian N, McGeer PL. Beta amyloid

and hyperphosphorylated tau deposits in the pancreas in type 2 diabetes. *Neurobiol Aging*. 2010;31(9):1503-1515.

Millar P, Pathak N, Parthsarathy V, Bjourson AJ, O’Kane M, Pathak V, Moffett RC, Flatt PR, Gault VA. Metabolic and neuroprotective effects of dapagliflozin and liraglutide in diabetic mice. *Journal of Endocrinology*. 2017;234(3):255-267.

Min SW, Cho SH, Zhou Y, Schroeder S, Haroutunian V, Seeley WW, Huang EJ, Shen Y, Masliah E, Mukherjee C, Meyers D, Cole PA, Ott M, Gan L. Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron*. 2010;67(6):953-966.

Mohamed LA, Keller JN, Kaddoumi A. Role of P-glycoprotein in mediating rivastigmine effect on amyloid- β brain load and related pathology in Alzheimer's disease mouse model. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(4):778-787.

Mooradian AD, Chung HC, Shah GN. GLUT-1 expression in the cerebra of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1997;18(5):469-474.

Morán MA, Mufson EJ, Gómez-Ramos P. Colocalization of cholinesterases with beta amyloid protein in aged and Alzheimer's brains. *Acta Neuropathol*. 1993;85(4):362-369.

Morris GP, Clark IA, Vissel B. Inconsistencies and controversies surrounding the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*. 2014;2:135.

Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L. The many faces of tau. *Neuron*. 2011;70(3):410-426.

Mushtaq G, Greig NH, Khan JA, Kamal MA. Status of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2014;13(8):1432-1439.

Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res*. 1991;541(1):163-166.

Nauck MA. Update on developments with SGLT2 inhibitors in the management of type 2 diabetes. *Drug Des Devel Ther*. 2014;8:1335-1380.

Neel JD, Kruse RL, Dombrovskiy VY, Vogel TR. Cilostazol and freedom from amputation after lower extremity revascularization. *J Vasc Surg*. 2015;61(4):960-964.
z

Ng TP, Feng L, Nyunt MSZ, Feng L, Gao Q, Lim ML, Collinson SL, Chong MS, Lim WS, Lee TS, Yap P, Yap KB. Metabolic syndrome and the risk of mild cognitive impairment and progression to dementia: Follow-up of the singapore longitudinal ageing study cohort. *JAMA Neurology*. 2016;73(4):456-463.

Ong QR, Chan ES, Lim ML, Cole GM, Wong BS. Reduced phosphorylation of brain insulin receptor substrate and Akt proteins in apolipoprotein-E4 targeted replacement mice. *Scientific Reports*. 2014;4:3754.

Palop JJ, Chin J, Mucke L. A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. *Nature*. 2006;443(7113):768-773.

Pandey S, Garabadu D. Piracetam facilitates the anti-amnesic but not anti-diabetic activity of metformin in experimentally induced type-2 diabetic encephalopathic rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2017;37(5):791-802.

Peila R, Rodriguez BL, Launer LJ. Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies: The Honolulu-Asia Aging Study. *Diabetes*. 2002;51(4):1256-1262.

Peineau S, Taghibiglou C, Bradley C, Wong TP, Liu L, Lu J, Lo E, Wu D, Saule E, Bouschet T, Matthews P, Isaac JT, Bortolotto ZA, Wang YT, Collingridge GL. LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3beta. *Neuron*. 2007;53(5):703-717.

Perry VH, Nicoll JA, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2010;6(4):193-201.

Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS. GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature*. 2003;423(6938):435-439.

Polinsky RJ. Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Clin Ther*. 1998;20(4):634-647.

Polonsky KS, Sturis J, Bell GI. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Non-insulin-dependent diabetes mellitus - a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. *N Engl J Med*. 1996;334(12):777-783.

Potter R, Patterson BW, Elbert DL, Ovod V, Kasten T, Sigurdson W, Mawuenyega K, Blazey T, Goate A, Chott R, Yarasheski KE, Holtzman DM, Morris JC, Benzinger TLS, Bateman RJ. Increased in vivo amyloid- β 42 production, exchange, and loss in presenilin mutation carriers. *Science translational medicine*. 2013;5(189):189ra177-189ra177.

Powell DR, DaCosta CM, Smith M, Doree D, Harris A, Buhning L, Heydorn W, Nouraldean A, Xiong W, Yalamanchili P, Mseeh F, Wilson A, Shadoan M, Zambrowicz B, Ding ZM. Effect of LX4211 on glucose homeostasis and body composition in preclinical models. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;350(2):232-242.

Prakash A, Kumar A, Ming LC, Mani V, Majeed AB. Modulation of the Nitroergic Pathway via Activation of PPAR- γ Contributes to the neuroprotective effect of pioglitazone against streptozotocin-induced memory dysfunction. *J Mol Neurosci*. 2015;56(3):739-750.

Prati F, De Simone A, Armirotti A, Summa M, Pizzirani D, Scarpelli R, Bertozzi SM, Perez DI, Andrisano V, Perez-Castillo A, Monti B, Massenzio F, Polito L, Racchi M, Sabatino P, Bottegoni G, Martinez A, Cavalli A, Bolognesi ML. 3,4-Dihydro-1,3,5-triazin-2(1H)-ones as the first dual BACE-1/GSK-3 β fragment hits against Alzheimer's disease. *ACS Chem Neurosci*. 2015;6(10):1665-1682.

Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement*. 2013;9(1):63-75.e62.

Qin Z, Zhou C, Xiao X, Guo C. Metformin attenuates sepsis-induced neuronal injury and cognitive impairment. *BMC Neurosci*. 2021;22(1):78.

Qiu WQ, Folstein MF. Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiol Aging*. 2006;27(2):190-198.

Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2010;362(4):329-344.

Raffaitin C, Gin H, Empana JP, Helmer C, Berr C, Tzourio C, Portet F, Dartigues JF, Alperovitch A, Barberger-Gateau P. Metabolic syndrome and risk for incident Alzheimer's disease or vascular dementia: the Three-City Study. *Diabetes Care*. 2009;32(1):169-174.

Raza H, John A, Howarth FC. Increased oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Zucker diabetic rat liver and brain. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(3):1241-1251.

Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2011;7(3):137-152.

Riddell DR, Zhou H, Atchison K, Warwick HK, Atkinson PJ, Jefferson J, Xu L, Aschmies S, Kirksey Y, Hu Y, Wagner E, Parratt A, Xu J, Li Z, Zaleska MM, Jacobsen JS, Pangalos MN, Reinhart PH. Impact of apolipoprotein E (ApoE) polymorphism on brain ApoE levels. *J Neurosci*. 2008;28(45):11445-11453.

Ríos JL, Francini F, Schinella GR. Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Planta Med*. 2015;81(12-13):975-994.

Rizvi SM, Shakil S, Biswas D, Shakil S, Shaikh S, Bagga P, Kamal MA. Invokana (Canagliflozin) as a dual inhibitor of acetylcholinesterase and sodium glucose co-

transporter 2: advancement in Alzheimer's disease- diabetes type 2 linkage via an enzoinformatics study. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2014;13(3):447-451.

Ryman DC, Acosta-Baena N, Aisen PS, Bird T, Danek A, Fox NC, Goate A, Frommelt P, Ghetti B, Langbaum JB, Lopera F, Martins R, Masters CL, Mayeux RP, McDade E, Moreno S, Reiman EM, Ringman JM, Salloway S, Bateman RJ. Symptom onset in autosomal dominant Alzheimer disease: a systematic review and meta-analysis. *Neurology*. 2014;83(3):253-260.

Sa-Nguanmoo P, Tanajak P, Kerdphoo S, Jaiwongkam T, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. SGLT2-inhibitor and DPP-4 inhibitor improve brain function via attenuating mitochondrial dysfunction, insulin resistance, inflammation, and apoptosis in HFD-induced obese rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2017;333:43-50.

Sacchettini JC, Kelly JW. Therapeutic strategies for human amyloid diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2002;1(4):267-275.

Sadowski MJ, Pankiewicz J, Scholtzova H, Mehta PD, Prelli F, Quartermain D, Wisniewski T. Blocking the apolipoprotein E/amyloid-beta interaction as a potential therapeutic approach for Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(49):18787-18792.

Saffari PM, Alijanpour S, Takzaree N, Sahebgharani M, Etemad-Moghadam S, Noorbakhsh F, Partoazar A. Metformin loaded phosphatidylserine nanoliposomes improve memory deficit and reduce neuroinflammation in streptozotocin-induced Alzheimer's disease model. *Life Sciences*. 2020;255:117861.

Sahara N, Murayama M, Mizoroki T, Urushitani M, Imai Y, Takahashi R, Murata S, Tanaka K, Takashima A. In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. *J Neurochem*. 2005;94(5):1254-1263.

Sakurai H, Hanyu H, Sato T, Kume K, Hirao K, Kanetaka H, Iwamoto T. Effects of cilostazol on cognition and regional cerebral blood flow in patients with Alzheimer's disease and cerebrovascular disease: a pilot study. *Geriatr Gerontol Int*. 2013;13(1):90-97.

Salloway S, Sperling R, Gilman S, Fox NC, Blennow K, Raskind M, Sabbagh M, Honig LS, Doody R, van Dyck CH, Mulnard R, Barakos J, Gregg KM, Liu E, Lieberburg I, Schenk D, Black R, Grundman M. A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology*. 2009;73(24):2061-2070.

Saltiel AR, Olefsky JM. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes*. 1996;45(12):1661-1669.

Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad L, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Younkin S. Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Medicine*. 1996;2(8):864-870.

Schirmer RH, Adler H, Pickhardt M, Mandelkow E. "Lest we forget you--methylene blue...". *Neurobiol Aging*. 2011;32(12):2325.e2327-2316.

Schnöder L, Hao W, Qin Y, Liu S, Tomic I, Liu X, Fassbender K, Liu Y. Deficiency of neuronal p38 α MAPK attenuates amyloid pathology in Alzheimer disease mouse and cell models through facilitating lysosomal degradation of BACE1. *J Biol Chem*. 2016;291(5):2067-2079.

Schor NF. What the halted phase III γ -secretase inhibitor trial may (or may not) be telling us. *Ann Neurol*. 2011;69(2):237-239.

Schwam EM, Nicholas T, Chew R, Billing CB, Davidson W, Ambrose D, Altstiel LD. A multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of the PDE9A inhibitor, PF-04447943, in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research*. 2014;11(5):413-421.

Sedighi S, Tehranipour M, Vaezi G, Hojati V, Hashemi-Moghaddam H. The effect of hydroalcoholic extract of *Ziziphora clinopodioides* L. on spatial memory and neuronal density of hippocampal CA1 region in rats with sporadic Alzheimer's disease. *Avicenna journal of phytomedicine*. 2019;9(4):362-373.

Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*. 2001;81(2):741-766.

Serenó L, Coma M, Rodríguez M, Sánchez-Ferrer P, Sánchez MB, Gich I, Agulló JM, Pérez M, Avila J, Guardia-Laguarta C, Clarimón J, Lleó A, Gómez-Isla T. A novel GSK-3 β inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo. *Neurobiol Dis*. 2009;35(3):359-367.

Shah K, DeSilva S, Abbruscato T. The role of glucose transporters in brain disease: diabetes and Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13(10):12629-12655.

Shaikh S, Rizvi SM, Shakil S, Riyaz S, Biswas D, Jahan R. Forxiga (dapagliflozin): Plausible role in the treatment of diabetes-associated neurological disorders. *Biotechnol Appl Biochem*. 2016;63(1):145-150.

Shakil S. Molecular interaction of anti-diabetic drugs with acetylcholinesterase and sodium glucose co-transporter 2. *J Cell Biochem*. 2017;118(11):3855-3865.

Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ. Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine*. 2008;14(8):837-842.

Shao YX, Huang M, Cui W, Feng LJ, Wu Y, Cai Y, Li Z, Zhu X, Liu P, Wan Y, Ke H, Luo HB. Discovery of a phosphodiesterase 9A inhibitor as a potential hypoglycemic agent. *J Med Chem*. 2014;57(24):10304-10313.

Sheng ZH, Cai Q. Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*. 2012;13(2):77-93.

Shewamene Z, Abdelwuhab M, Birhanu Z. Methanolic leaf extract of *Otostegia integrifolia* Benth reduces blood glucose levels in diabetic, glucose loaded and normal rodents. *BMC complementary and alternative medicine*. 2015;15:19-19.

Shi L, Zhu D, Wang S, Jiang A, Li F. Dapagliflozin attenuates cardiac remodeling in mice model of cardiac pressure overload. *Am J Hypertens*. 2019;32(5):452-459.

Shin SJ, Chung S, Kim SJ, Lee EM, Yoo YH, Kim JW, Ahn YB, Kim ES, Moon SD, Kim MJ, Ko SH. Effect of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor, dapagliflozin,

on renal renin-angiotensin system in an animal model of type 2 diabetes. PLoS ONE. 2016;11(11):e0165703.

Shumaker SA, Legault C, Rapp SR, Thal L, Wallace RB, Ockene JK, Hendrix SL, Jones BN, Assaf AR, Jackson RD, Kotchen JM, Wassertheil-Smoller S, Wactawski-Wende J. Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *Jama*. 2003;289(20):2651-2662.

Sigurdsson EM. Tau-focused immunotherapy for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Current Alzheimer research*. 2009;6(5):446-450.

Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced glycation end products and diabetic complications. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*. 2014;18(1):1-14.

Sperling RA, Jack CR, Black SE, Frosch MP, Greenberg SM, Hyman BT, Scheltens P, Carrillo MC, Thies W, Bednar MM, Black RS, Brashear HR, Grundman M, Siemers ER, Feldman HH, Schindler RJ. Amyloid-related imaging abnormalities in amyloid-modifying therapeutic trials: recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*. 2011;7(4):367-385.

Sridhar GR, Lakshmi G, Nagamani G. Emerging links between type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *World journal of diabetes*. 2015;6(5):744-751.

Sridhar GR, Lakshmi G, Nagamani G. Emerging links between type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *World J Diabetes*. 2015;6(5):744-751.

Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res.* 2005;52(4):313-320.

Stirban A, Gawlowski T, Roden M. Vascular effects of advanced glycation endproducts: Clinical effects and molecular mechanisms. *Mol Metab.* 2014;3(2):94-108.

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1993;90(5):1977-1981.

Sun GY, Horrocks LA, Farooqui AA. The roles of NADPH oxidase and phospholipases A2 in oxidative and inflammatory responses in neurodegenerative diseases. *J Neurochem.* 2007;103(1):1-16.

Şahin TD, Gocmez SS, Duruksu G, Yazir Y, Utkan T. Infliximab prevents dysfunction of the vas deferens by suppressing inflammation and oxidative stress in rats with chronic stress. *Life Sci.* 2020;250:117545.

Tabaton M, Perry G, Zhu X, Lee HG, Casadesus G, Smith MA. Memantine: "hypothesis testing" not "disease modifying" in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 2010;176(2):540-541.

Tan CC, Yu JT, Wang HF, Tan MS, Meng XF, Wang C, Jiang T, Zhu XC, Tan L. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, rivastigmine, and memantine for the

treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Alzheimers Dis.* 2014;41(2):615-631.

Tan SY, Mei Wong JL, Sim YJ, Wong SS, Mohamed Elhassan SA, Tan SH, Ling Lim GP, Rong Tay NW, Annan NC, Bhattamisra SK, Candasamy M. Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. *Diabetes Metab Syndr.* 2019;13(1):364-372.

Taniguchi S, Suzuki N, Masuda M, Hisanaga S, Iwatsubo T, Goedert M, Hasegawa M. Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. *J Biol Chem.* 2005;280(9):7614-7623.

Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International journal of nanomedicine.* 2019;14:5541-5554.

Tong Y, Zhou W, Fung V, Christensen MA, Qing H, Sun X, Song W. Oxidative stress potentiates BACE1 gene expression and Abeta generation. *J Neural Transm (Vienna).* 2005;112(3):455-469.

Treviño S, Aguilar-Alonso P, Flores Hernandez JA, Brambila E, Guevara J, Flores G, Lopez-Lopez G, Muñoz-Arenas G, Morales-Medina JC, Toxqui V, Venegas B, Diaz A. A high calorie diet causes memory loss, metabolic syndrome and oxidative stress into hippocampus and temporal cortex of rats. *Synapse.* 2015;69(9):421-433.

Tripathy D, Yin X, Sanchez A, Luo J, Martinez J, Grammas P. Cerebrovascular expression of proteins related to inflammation, oxidative stress and neurotoxicity is altered with aging. *Journal of Neuroinflammation.* 2010;7(1):63.

Tseng SY, Chao TH, Li YH, Liu PY, Lee CH, Cho CL, Wu HL, Chen JH. Cilostazol improves high glucose-induced impaired angiogenesis in human endothelial progenitor cells and vascular endothelial cells as well as enhances vasculoangiogenesis in hyperglycemic mice mediated by the adenosine monophosphate-activated protein kinase pathway. *J Vasc Surg.* 2016;63(4):1051-1062.e1053.

Vatandoust N, Rami F, Salehi AR, Khosravi S, Dashti G, Eslami G, Momenzadeh S, Salehi R. Novel high-fat diet formulation and streptozotocin treatment for induction of prediabetes and type 2 diabetes in rats. *Advanced biomedical research.* 2018;7:107-107.

Ventura-Sobrevilla J, Boone-Villa VD, Aguilar CN, Román-Ramos R, Vega-Avila E, Campos-Sepúlveda E, Alarcón-Aguilar F. Effect of varying dose and administration of streptozotocin on blood sugar in male CD1 mice. *Proc West Pharmacol Soc.* 2011;54:5-9.

Verhoest PR, Fonseca KR, Hou X, Proulx-Lafrance C, Corman M, Helal CJ, Claffey MM, Tuttle JB, Coffman KJ, Liu S, Nelson F, Kleiman RJ, Menniti FS, Schmidt CJ, Vanase-Frawley M, Liras S. Design and discovery of 6-[(3S,4S)-4-methyl-1-(pyrimidin-2-ylmethyl)pyrrolidin-3-yl]-1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1,5-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one (PF-04447943), a selective brain penetrant PDE9A inhibitor for the treatment of cognitive disorders. *J Med Chem.* 2012;55(21):9045-9054.

Verma N, Ly H, Liu M, Chen J, Zhu H, Chow M, Hersh LB, Despa F. Intraneuronal amylin deposition, peroxidative membrane injury and increased IL-1 β synthesis in brains of Alzheimer's disease patients with type-2 diabetes and in diabetic HIP rats. *J Alzheimers Dis.* 2016;53(1):259-272.

Vulih-Shultzman I, Pinhasov A, Mandel S, Grigoriadis N, Touloumi O, Pittel Z, Gozes I. Activity-dependent neuroprotective protein snippet NAP reduces tau hyperphosphorylation and enhances learning in a novel transgenic mouse model. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;323(2):438-449.

Wada T, Onogi Y, Kimura Y, Nakano T, Fusanobori H, Ishii Y, Sasahara M, Tsuneki H, Sasaoka T. Cilostazol ameliorates systemic insulin resistance in diabetic db/db mice by suppressing chronic inflammation in adipose tissue via modulation of both adipocyte and macrophage functions. *Eur J Pharmacol*. 2013;707(1-3):120-129.

Wei R, Cui X, Feng J, Gu L, Lang S, Wei T, Yang J, Liu J, Le Y, Wang H, Yang K, Hong T. Dapagliflozin promotes beta cell regeneration by inducing pancreatic endocrine cell phenotype conversion in type 2 diabetic mice. *Metabolism*. 2020;111:154324.

Welander H, Frånberg J, Graff C, Sundström E, Winblad B, Tjernberg LO. Abeta43 is more frequent than Abeta40 in amyloid plaque cores from Alzheimer disease brains. *J Neurochem*. 2009;110(2):697-706.

Weller J, Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Research*. 2018;7:1161.

Westermarck P, Andersson A, Westermarck GT. Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiol Rev*. 2011;91(3):795-826.

Westermarck P, Wilander E, Westermarck GT, Johnson KH. Islet amyloid polypeptide-like immunoreactivity in the islet B cells of type 2 (non-insulin-dependent) diabetic and non-diabetic individuals. *Diabetologia*. 1987;30(11):887-892.

Wiciński M, Wódkiewicz E, Górski K, Walczak M, Malinowski B. Perspective of SGLT2 inhibition in treatment of conditions connected to neuronal loss: focus on Alzheimer's disease and ischemia-related brain injury. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020;13(11).

Wiciński M, Wódkiewicz E, Górski K, Walczak M, Malinowski B. Perspective of SGLT2 Inhibition in treatment of conditions connected to neuronal loss: Focus on Alzheimer's disease and ischemia-related brain injury. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*. 2020;13(11):379.

Willette AA, Bendlin BB, Starks EJ, Birdsill AC, Johnson SC, Christian BT, Okonkwo OC, La Rue A, Hermann BP, Kosciuk RL, Jonaitis EM, Sager MA, Asthana S. Association of insulin resistance with cerebral glucose uptake in late middle-aged adults at risk for alzheimer disease. *JAMA Neurol*. 2015;72(9):1013-1020.

Williamson R, McNeilly A, Sutherland C. Insulin resistance in the brain: An old-age or new-age problem? *Biochemical pharmacology*. 2012;84:737-745.

Williamson R, McNeilly A, Sutherland C. Insulin resistance in the brain: an old-age or new-age problem? *Biochem Pharmacol*. 2012;84(6):737-745.

Wisniewski T, Ghiso J, Frangione B. Biology of A β Amyloid in Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Disease*. 1997;4(5):313-328.

Wongchitrat P, Lansubakul N, Kamsrijai U, Sae-Ung K, Mukda S, Govitrapong P. Melatonin attenuates the high-fat diet and streptozotocin-induced reduction in rat hippocampal neurogenesis. *Neurochem Int*. 2016;100:97-109.

Yang HT, Sheen YJ, Kao CD, Chang CA, Hu YC, Lin JL. Association between the characteristics of metabolic syndrome and Alzheimer's disease. *Metabolic Brain Disease*. 2013;28(4):597-604.

Yang J, Ji Y, Mehta P, Bates KA, Sun Y, Wisniewski T. Blocking the apolipoprotein E/amyloid- β interaction reduces fibrillar vascular amyloid deposition and cerebral microhemorrhages in TgSwDI mice. *J Alzheimers Dis*. 2011;24(2):269-285.

Yao Y, Chinnici C, Tang H, Trojanowski JQ, Lee VM, Praticò D. Brain inflammation and oxidative stress in a transgenic mouse model of Alzheimer-like brain amyloidosis. *J Neuroinflammation*. 2004;1(1):21.

Ye S, Huang Y, Müllendorff K, Dong L, Giedt G, Meng EC, Cohen FE, Kuntz ID, Weisgraber KH, Mahley RW. Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid beta peptide production in cultured neuronal cells: apoE structure as a potential therapeutic target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(51):18700-18705.

Yin QQ, Pei JJ, Xu S, Luo DZ, Dong SQ, Sun MH, You L, Sun ZJ, Liu XP. Pioglitazone improves cognitive function via increasing insulin sensitivity and strengthening antioxidant defense system in fructose-drinking insulin resistance rats. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e59313.

Yu AS, Hirayama BA, Timbol G, Liu J, Basarah E, Kepe V, Satyamurthy N, Huang SC, Wright EM, Barrio JR. Functional expression of SGLTs in rat brain. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;299(6):C1277-1284.

Yu AS, Hirayama BA, Timbol G, Liu J, Diez-Sampedro A, Kepe V, Satyamurthy N, Huang SC, Wright EM, Barrio JR. Regional distribution of SGLT activity in rat brain in vivo. *American journal of physiology. Cell physiology*. 2013;304(3):C240-C247.

Yuan J, Venkatraman S, Zheng Y, McKeever BM, Dillard LW, Singh SB. Structure-based design of β -site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *J Med Chem*. 2013;56(11):4156-4180.

Zempel H, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM. Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *J Neurosci*. 2010;30(36):11938-11950.

Zhai Y, Dang Y, Gao W, Zhang Y, Xu P, Gu J, Ye X. P38 and JNK signal pathways are involved in the regulation of flORIZIN against UVB-induced skin damage. *Exp Dermatol*. 2015;24(4):275-279.

Zhang B, Maiti A, Shively S, Lakhani F, McDonald-Jones G, Bruce J, Lee EB, Xie SX, Joyce S, Li C, Toleikis PM, Lee VM, Trojanowski JQ. Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(1):227-231.

Zhang T, Pan BS, Sun GC, Sun X, Sun FY. Diabetes synergistically exacerbates poststroke dementia and tau abnormality in brain. *Neurochemistry International*. 2010;56(8):955-961.

Zhang WJ, Tan YF, Yue JT, Vranic M, Wojtowicz JM. Impairment of hippocampal neurogenesis in streptozotocin-treated diabetic rats. *Acta Neurol Scand*. 2008;117(3):205-210.

