

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RUH SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

NİKOTİNAMİD RİBOZİD UYGULAMASININ ALZHEİMER HAYVAN
MODELİNDE BİLİŞSEL VE DAVRANIŞSAL BELİRTİLERE ETKİSİ VE
MİTOFAJİ İLE İLİŞKİSİ

Dr. Aslı AYTULUN

UZMANLIK TEZİ
Olarak hazırlanmıştır.

ANKARA

2023

TC
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RUH SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

NİKOTİNAMİD RİBOZİD UYGULAMASININ ALZHEİMER HAYVAN
MODELİNDE BİLİŞSEL VE DAVRANIŞSAL BELİRTİLERE ETKİSİ VE
MİTOFAJİ İLE İLİŞKİSİ

Dr. Aslı AYTULUN

UZMANLIK TEZİ
Olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Özlem ERDEN AKİ

ANKARA
2023

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimin en başından sonuna kadar, bilgi ve deneyimlerini aktararak eğitimime katkıda bulunan, araştırmanın konusundan bahsettiğim ilk andan itibaren bana güvenen, destekleyen, her ihtiyaç duyduğumda büyük bir nezaket ve güleryüzle sorunları çözmeme yardımcı olan, yanında çalışmaktan gurur ve mutluluk duyduğum tez danışmanım Doç. Dr. Özlem Erden Aki'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasının her aşamasında yol gösterici katkılarda bulunan, fikirleriyle bilime olan inancımı ve heyecanımı pekiştiren, desteğini hep hissettiğim Tıbbi Farmakoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. M. Yıldırım Sara'ya teşekkür borçluyum.

Tez çalışmam esnasında, fikrin oluşturulmasından çıkan sorunların çözülmesine kadar her konuda katkıda bulunan, kullandığım yöntemleri bana sabırla öğreten, keyifli ve öğretici bir tez dönemi geçirmemde en büyük rolü olan sevgili dostum Dr. Barışcan Çimen'i sevgiyle anıyorum.

Asistanlık hayatım boyunca, mesleki kimliğimin oluşmasında emekleri olan, eğitimim süresince desteklerini her an hissettiğim, nitelikli eğitim almamı sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Berna Uluğ'a, Prof. Dr. Kazım Yazıcı'ya, Prof. Dr. Cengiz Kılıç'a, Prof. Dr. Başaran Demir'e, Prof. Dr. Suzan Özer'e, Prof. Dr. Elif Anıl Yağcıoğlu'na, Prof. Dr. Aygün Ertuğrul'a, Prof. Dr. Emine Eren Koçak'a, Prof. Dr. Elif Barışkın'a, Doç. Dr. Koray Başar'a, Doç. Dr. Yavuz Ayhan'a, Doç. Dr. Sertaç Ak'a, Dr. Öğr. Ü. Şeref Can Gürel'e, Dr. Öğr. Ü. İrem Yıldız'a, Dr. Öğr. Ü. Talat Demirsöz'e, Dr. Öğr. Ü. Elçin Özçelik Eroğlu'na, Dr. Öğr. Ü. Emre Mutlu'ya teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık hayatım boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, asistanlık hayatımın en önemli kazanımlarından olan Dr. Nilgün Oktar Erdoğan'a, Dr. Mert Erdoğan'a, Dr. Yankı Gezer'e, Dr. Ertuğ Baki'ye, Dr. İbrahim Aylak'a, Dr. Tayfun Öz'e, Dr. Oğuz Kaan Yalçinkaya'ya, Dr. Esra Tanrıöver'e, Dr. Gülhan Gülşen'e ve deneylerin yoğun olduğu dönemlerde desteğini hep hissettiğim Dr. Tahsin Rollas'a, beraber çalıştığım tüm asistan, psikolog, hemşire, sekreter ve yardımcı sağlık personeli çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tıbbi Farmakoloji Anabilim dalı laboratuvarında birlikte çalışma şansına eriştiğim Dr. Elif Akaydın ve Berkay Alpay başta olmak üzere tüm doktor ve tıp öğrencisi arkadaşlarıma sağladıkları destek için en içten duygularla teşekkür ederim.

Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları ve Nöroloji rotasyonlarım sırasında mesleki eğitimime katkı sağlayan değerli hocalarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan, en büyük dayanağım kardeşim Damla Aytulun'a, anneme, her an aklımda ve kalbimde olan canım babama, tüm aileme, bu süreçte beni hiç yalnız bırakmayan, tüm kararlarımı sevgiyle destekleyen Buğra Ertek'e ayrı ayrı teşekkür borçluyum.

ÖZET

Aytulun A., Nikotinamid Ribozid Uygulamasının Alzheimer Hayvan Modelinde Bilişsel ve Davranışsal Belirtilere Etkisi ve Mitofaji İle İlişkisi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara, 2023. Alzheimer hastalığında (AH) görülen nöropsikiyatrik belirtiler hem hastalar hem de bakımverenler için zorlayıcıdır. AH'nin nöropsikiyatrik belirtilerinden olan depresyon hem klinik özellikleri hem de tedaviye yanıt açısından major depresyondan farklıdır. Antidepresanların Alzheimer hastalarında bilişsel belirtilere eşlik eden depresyonun tedavisinde umulan faydayı göstermemesi, Alzheimer hastalığındaki depresif belirtilerin mekanizmasının diğer depresyon sendromlarından farklı olduğu düşündürmektedir. Alzheimer hastalığının oluşumunda ve sürdürülmesinde mitokondriyal işlevlerde bozulmanın kritik bir rolü olduğu düşünülmektedir. Hasarlı mitokondrilerin seçici olarak ortadan kaldırılması anlamına gelen 'mitofaji' de bozulma görüldüğü bildirilmektedir. Çalışmalar nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+)'yı artırarak mitofajiyi indüklemenin amiloid β ($A\beta$) kümelenmesini azalttığını ve AH hayvan modellerinde bilişsel işlevlerde görülen bozulmayı iyileştirdiğini göstermiştir, ancak NAD^+ 'nin AH'ye eşlik eden depresyonun tedavisinde kullanımına yönelik çalışmaya rastlanmamıştır. Bu amaçla tek doz intraserebroventriküler (ICV) $A\beta^{1-42}$ enjeksiyonu yapılan sıçan AH modelinde, NAD^+ öncülü olan nikotinamid ribozidin (NR) hem bilişsel hem de nöropsikiyatrik belirtilere etkisinin değerlendirildiği bir çalışma yapılması amaçlanmıştır. AH modelinde sıçanlar, bellek işlevlerinde bozulmanın yanı sıra nöropsikiyatrik belirtilere benzer şekilde depresyon benzeri davranış göstermişlerdir. Yirmi üç gün boyunca orogastrik gavaj yoluyla 700 mg/kg NR verilen sıçanlarda tedavi verilmeyen ($A\beta$ +salin) gruba göre bellek işlevlerinin daha iyi olduğu, depresyon benzeri davranışın daha az, agresyon skorlarının daha düşük ve kilo alımının daha yavaş olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma Alzheimer hastalığı modelinde görülen nöropsikiyatrik semptomların ve bilişsel kötüleşmenin tedavisinde bir NAD^+ öncülü olan NR'nin etkili olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Alzheimer hastalığı, Nöropsikiyatrik belirtiler, Mitofaji, NAD , Nikotinamid ribozid

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: THD-2022-20013

ABSTRACT

Aytulun A., The Effect of Nicotinamide Riboside on Cognitive and Behavioral Symptoms in Alzheimer's Disease Animal Model and Its Relation with Mitophagy. Hacettepe University Medical Faculty Department of Psychiatry Residency Thesis, Ankara, 2023. Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease (AD) are challenging for both caregivers and patients. Depression as one of the neuropsychiatric symptoms of AD, differs from major depression in terms of both clinical features and response to treatment. Antidepressants do not show the expected benefit in the treatment of depression accompanying cognitive symptoms in Alzheimer's patients, thus the mechanism of depressive symptoms in Alzheimer's disease are thought to differ from other depression syndromes. Therefore, studies to explain the pathophysiology of the disease have gained importance. Mitochondrial dysfunction is thought to play a critical role in the development and maintenance of Alzheimer's disease. In many studies impairment in mitophagy, the selective elimination of damaged mitochondria, has been reported. Studies have shown that inducing mitophagy by increasing nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) reduces amyloid β (A β) aggregation and improves cognitive dysfunction in animal models of AD, but there is no data about its' effect on depression observed in AD. The aim of the present study was to investigate the effect of the NAD⁺ precursor NR on cognitive and neuropsychiatric symptoms in single dose intracerebroventricular (ICV) A β ¹⁻⁴² injected rat model of AD. In this AD model, rats showed depression-like behaviors similar to neuropsychiatric symptoms in addition to memory impairment. Rats treated with 700 mg/kg NR via orogastric gavage for 23 days, had better memory performance, less depressive like behavior and lower aggression scores, and slower weight gain rate compared to the no treatment (A β +saline) group. This study has shown that the NAD⁺ precursor NR is effective in the treatment of neuropsychiatric symptoms as well as cognitive deterioration in an Alzheimer's disease model.

Keywords: Alzheimer's Disease, Neuropsychiatric symptoms, Mitophagy, NAD, Nicotinamide riboside

This study is supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit. Project Number: THD-2022-20013

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Alzheimer Hastalığı	3
2.2. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi	4
2.2.1 Kolinergik Hipotez	5
2.2.2 Amiloid Kaskad Hipotezi	6
2.2.3 Tau Hipotezi	7
2.2.4 İnflamasyon Hipotezi	8
2.2.5 Mitokondriyal Hipotez	9
2.3. Otofaji ve Mitofaji	14
2.4. Alzheimer Hastalığının Nöropsikiyatrik Belirtilerinin Patofizyolojisi	18
2.5. Alzheimer Hastalığının Tedavisi	19
2.5.1. Alzheimer Hastalığındaki Nöropsikiyatrik Belirtilerin Tedavisi	20
2.6. Alzheimer Tedavisinde Mitokondriyi Hedeflemek	20
2.6.1. Mitofaji Düzenleyicileri	21
2.7. Alzheimer Hastalığı Modelleri	24
2.7.1. Genetik Modeller	25
2.7.2. Genetik Olmayan Modeller	26

2.8. Amaç	28
2.8.1. Araştırmanın Amacı	28
2.8.2. Araştırmanın Hipotezleri	28
3. GEREÇLER VE YÖNTEM	29
3.1. Deney Hayvanları	29
3.2. Deney Protokolü	30
3.3. Amiloid β enjeksiyonu ile sıçanda Alzheimer modeli oluşturulması	31
3.4. Nikotinamid Ribozid Uygulaması	32
3.5. Uyku Yoksunluğu Oluşturulması	33
3.6. Davranışsal Testler	34
3.6.1. Tutma Testi	34
3.6.2. Açık Alan Arena Testi	35
3.6.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi	35
3.6.4. T Labirenti Spontan Alternasyon Testi	36
3.6.5. Porsolt Zorunlu Yüzme Testi	37
3.6.6. Edilgen Kaçınma Testi	38
3.6.7. Sükroz Tercih Testi	39
3.7. Sakrifikasyon ve Dokuların Çıkarılması	39
3.7.1. Protein İzolasyonu	40
3.8. İstatistiksel Analizler	40
4. BULGULAR	41
4.1. Deney Hayvanları	41
4.2. Davranış Deneyleri Bulguları	41
4.2.1. Edilgen Kaçınma Testi	41
4.2.2. T Labirenti Spontan Alternasyon Testi	42
4.2.3. Porsolt Zorunlu Yüzme Testi	43

4.2.4. Sükroz Tercih testi	43
4.2.5. Açık Alan Arena testi	44
4.2.6. Yü kseltilmiş Artı Labirent Testi	45
4.2.7. Tutma testi	46
4.3. Nikotinamid ribozid tedavisinin hayvanların ağırlıkları üzerine etkileri	48
5. TARTIŞMA	50
5.1. Alzheimer Hastalığı Hayvan Modellerinde Bilişsel Belirtiler ve Nikotinamid Ribozid Tedavisinin Etkisi	50
5.2. Alzheimer Hastalığı Hayvan Modellerinde Nöropsikiyatrik Belirtiler ve Nikotinamid Ribozid Tedavisinin Etkisi	51
5.3. Alzheimer Hastalığında Vücut Ağırlığı Değişimi ve Nikotinamid Ribozid Tedavisinin Etkisi	54
5.4. Çalışmanın Kısıtlılıkları	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
7. KAYNAKLAR	60

SİMGELER VE KISALTMALAR

Aβ	: Amiloid β proteini
Aβ1-42	: Amiloid β proteinin 1-42 fragmanı
Ach	: Asetilkolin
AD	: Alzheimer demansı
ADP	: Adenozin difosfat
AH	: Alzheimer hastalığı
AICD	: Amiloid β -prekürsör proteininin intraselüler alt birimi
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
ApoE	: Apolipoprotein E
APP	: Amiloid β -prekürsör protein
ATP	: Adenozin trifosfat
BACE1	: β -bölgesi APP-kesme enzimi 1
BDNF	: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
BNIP3	: BCL2 ve adenovirus E1B 19 kDa etkileşen protein 3
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
CypD	: Siklofilin D
ETZ	: Elektron transport zinciri
FTD	: Frontotemporal demans
GSK 3β	: Glikojen sentaz kinaz 3 β
ICV	: İntraserebroventriküler
LC3	: Mikrotübüle bağlı protein 1A/1B-hafif zincir 3
LTD	: Uzun süreli depresyon
LTP	: Uzun süreli güçlendirme
MSS	: Merkezi sinir sistemi
mPTP	: Mitokondriyal geçirgenlik geçiş poru
NAM	: Nikotinamid adenin mononükleotid

NAAD	: Nikotinik asit adenin dinükleotid
NADS	: NAD ⁺ sentetaz
NAMPT	: Nikotinamid fosforiboziltransferaz
NAPRT	: Nikotinik asit fosforiboziltransferaz
NFY	: Nörofibriler yumak
NIX	: NIP 3 benzeri protein X
NMDAR	: N-metil-D-aspartat reseptörü
NMN	: Nikotinamid mononükleotid
NMNAT	: NMN/NaMN adeniltransferazlar
NPS	: Nöropsikiyatrik semptomlar
NRK	: Nikotinamid ribozid kinaz
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
OXPHOS	: Oksidatif fosforilasyon
PSEN1,2	: Presenilin 1,2
pTAU	: Fosforile Tau
ROS	: Reaktif oksijen radikalleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
SMAC/DIABLO	: Second mitochondria-derived activator of caspase
SSGI	: Seçici serotonin geri alım inhibitörleri
STZ	: Streptozosin
VPS	: Vacuolar protein sorting

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Alzheimer hastalığında biyobelirteç modeli	5
2.2. Amiloidojenik ve amiloidojenik olmayan APP metabolizması	7
2.3. Mitokondriyal dinamiklerin şematik gösterimi	12
2.4. Otofaji sürecinin şematik gösterimi	15
2.5. Ubikutin aracılı ve ubikutin aracılı olmayan mitofaji	17
2.6. NAD ⁺ oluşum yolları	23
3.1. Deney Protokolü	33
3.2. Ventrikül içerisine amiloid enjeksiyonu ile sıçanda Alzheimer modeli oluşturulması	32
3.3. Orogastrik gavaj uygulanması	33
3.4. Uyku yoksunluğu aparatı	34
3.5. Açık alan arena testi	35
3.6. Yükseltilmiş artı labirent testi	36
3.7. T labirenti spontan alternasyon testi	37
3.8. Zorunlu yüzme testi	38
3.9. Edilgen kaçınma testi	39
4.1. Sıçanların edilgen kaçınma testinde karanlık bölmeye geçme süreleri	42
4.2. Sıçanlarda T labirenti testinin sonuçları	42
4.3. Sıçanlarda Porsolt zorunlu yüzme testinde hareketsizlik (immobilite) süreleri	43
4.4. Sıçanlarda sükröz tercih testinin sonuçları.	44
4.5. Sıçanlarda açık alan arena testinin sonuçları	45
4.6. Sıçanlarda yükseltilmiş artı testinin sonuçları	46
4.7. Sıçanlarda tutma testi sonuçları	47
4.8. 28 günlük değerlendirmede Aβ ve/veya NR'nin kilo alımına etkisi	49

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Alzheimer hastalığı modelleri	24
2.2. Transgenik Alzheimer hastalığı modelleri	25
3.1. Deney grupları	31



1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH), genellikle bellek şikayetleriyle başlar, kısa süre içinde diğer bilişsel, nöropsikolojik ve davranışsal belirtiler de tabloya eklenir. Nöropsikiyatrik belirtiler (NPS) demans hastalarındaki bilişsel olmayan belirti ve davranışları temsil eder ve Alzheimer demansı hastalarının %95'inde en az bir nöropsikiyatrik belirti görülür (1, 2). Ajitasyon, anksiyete, iritabilite, sanrı, illüzyon, apati, depresyon, disinhibisyon, belirgin motor ve obsesif kompulsif davranışlar ve uyku bozuklukları sık görülen nöropsikiyatrik belirtilerdir (3).

Dr. Alois Alzheimer, geçtiğimiz yüzyılın başında hastalarının beyin otopsilerinde nörofibriler yumak (NFY) ve amiloid plakların varlığını tanımlamış, bu patolojilerin hastalığa neden olabileceğini ileri sürmüştür (4). Dr. Alzheimer'ın 1907'de tanımladığı ilk vaka olan Auguste D.'den beri, nöropsikiyatrik belirtilerin demansa eşlik edebileceği bilinmektedir. Auguste D.'nin şikayetleri ilk olarak duygudurum değışiklikleri ve sadakatsizlik sanrıları ile başlamış, ilerleyici bellek kaybı ve dil problemlerinden oluşan bilişsel sorunlar klinik tabloya sonradan eklenmiştir (4). 2015 yılında yapılan Cache County Demansa İlerleme Çalışması hafif düzeyde belirtileri olan Alzheimer demansı hastalarında agresyon, psikotik belirtiler ve duygudurum semptomlarının (anksiyete ve depresyon) varlığının yaşam süresinde kısalma ile ilişkili olduğunu, agresyon ve psikotik belirtilerin ek olarak işlevsellikte hızlı kötüleşme ile ilişkili olduğunu göstermiştir (5). Ayrıca son yıllarda yaşlı bireylerde ilk kez görülen NPS'lerin nörobilişsel bozuklukların ve yeni başlayan bilişsel bozulmanın erken belirtileri olabileceği gösterilmiştir (6) prodromal demans dönemlerini yansıttığı düşünülen bu görünümler son yıllarda daha çok dikkat çekmiştir (7).

Alzheimer hastalığının patogenezini açıklamada kolinerjik hipotez, amiloid kaskad hipotezi, tau hipotezi, inflamasyon hipotezi ve mitokondriyal hipotez gibi hipotezler kullanılmakla (8,9) birlikte hastalığın patofizyolojisini açıklayabilecek kesin bir mekanizma bulunmamaktadır. Mitokondriyal hipotez hastalığın oluşumunda çeşitli mitokondriyal işlevlerde bozulma olduğunu, belki de bu bozulmanın hastalığın tetikleyicisi olduğunu öne sürer (9). AH'de bozulan mitokondriyal işlevlerden biri de hasarlı mitokondrilerin uzaklaştırılmasını sağlayarak sağlıklı mitokondri havuzunun oluşumunda rolü olan 'mitofaji'dir. Alzheimer hastalarında bozulmuş olan otofaji ve

mitofajinin nöronlarda hasarlı mitokondrilerin birikimine neden olabileceği düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar Alzheimer hastalarının beyinlerinde, insan kök hücrelerinde ve farklı AH hayvan modellerinde mitofajinin bozulduğunu göstermiş, mitofajiyi indüklemenin bilişsel bozulmayı ve AH patolojisini azaltabileceğine dair çalışmalar hız kazanmıştır. Mitofajiyi indüklemek amacıyla PINK1, Parkin gibi modülatörler, rapamisin, metformin gibi ilaçlar (mTOR inhibitörleri), bitki metabolitleri (ürolithin, spermidin) ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) öncülleri (nikotinamid mononükleotid, nikotinamid ribozid gibi) kullanılmaktadır (10).

Major depresyonun tedavisinde kullanılan antidepresan ilaçların Alzheimer hastalığına eşlik eden depresyonun tedavisinde yeterince etkili olmadığı bilinmektedir (11). Alzheimer hastalığına bağlı olduğu düşünülen depresyon benzeri bu belirtilerin yaşlı ve kırılgan olan demans hastalarında güvenli ve etkili tedavi seçenekleri azdır. Demansa eşlik eden bu belirtilerin depresyonu ne kadar yansıttığı tartışmalıdır. Bu nedenle demans hastalarında NPS'leri tanımaya ve tanımlamaya, patofizyolojik mekanizmalarını aydınlatmaya, etkili ve güvenli tedavi seçeneklerini geliştirmeye yönelik çalışmalar artmaktadır (12). Alzheimer hastalığına eşlik eden NPS'lerin nörotransmitter sistemlerinde değişiklikler, farklı beyin bölgelerinde görülen nörodejeneratif değişiklikler gibi mekanizmalar nedeniyle ortaya çıkıyor olabileceği ileri sürülmüştür (13,14), ancak NPS'lerin patofizyolojisinde mitofajinin rolünün değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu araştırmada bir mitofaji düzenleyicisi olan nikotinamid ribozid (NR) tedavisinin amiloid β ile indüklenmiş ve uykusuz bırakılmış sıçan Alzheimer hastalığı modelinde bilişsel işlevler, ve agresyon, anksiyete ve depresyon gibi nöropsikiyatrik belirtiler üzerindeki etkisinin araştırılması hedeflenmektedir. Tedavi ile depresyon benzeri davranışta iyileşme olması öngörülmektedir. Önceki çalışmalarda NAD⁺'yı artırmanın bilişsel işlevler üzerinde olumlu etkileri olduğu gösterilmiş olup bu çalışma ile literatürdeki bu bulgunun desteklenmesi öngörülmektedir. Ancak çalışmanın asıl amacı ve orijinal yanı, bu tedavi ile depresyon benzeri davranışta iyileşme olup olmayacağını göstermektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

En yaygın nörodejeneratif hastalıklardan biri olan AH, dünya genelinde yaşlılarda görülen demans vakalarının % 80'inden fazlasını oluşturur. Altmışbeş yaşın altında yaklaşık 200 bin kişinin erken başlangıçlı AH tanısı olduğu, 65 yaş üstünde ise bu sayının yaklaşık 5 milyon olduğu tahmin edilmektedir. 2050 yılına kadar prevalansın 13.8 milyona ulaşacağı düşünülmektedir (15). Gürvit ve arkadaşları tarafından yapılan 'Türkiye Alzheimer Hastalığı Prevalansı Çalışması'nda 70 yaş üstü kişilerde Alzheimer demansı (AD) prevalansı %11 olarak saptanmış, başka bir çalışmada Eskişehir'de 55 yaş üstü bireylerde AD prevalansı %4,6 bulunmuştur (16,17).

Alzheimer hastalığı genellikle bellek yakınmaları ile başlayan ve sonunda birden çok bilişsel, nöropsikolojik ve davranışsal alanı içerecek şekilde ilerleyen, bilişsel işlevlerde ilerleyici bir bozulma ile karakterize olan bir hastalıktır. Hastalık erken (<65 yaş) ve geç başlangıçlı (sporadik) AH olarak sınıflandırılır. Erken başlangıçlı vakaların pek çoğu tek gene bağlı otozomal dominant kalıtım biçimine sahiptir. Amiloid prekürsör protein (APP), presenilin (PSEN) 1 veya 2 genlerindeki patojenik varyantlardan kaynaklanır ve olguların %1'inden azında görülmektedir (18). Geç başlangıçlı AH'nin ise tek bir genin büyük katkısı yerine, birçok genin küçük oranlarda katkısının olduğu, çevresel faktörlerin de devreye girdiği kompleks bir kalıtım biçimine sahip olduğu düşünülmektedir. Bu vakaların çoğu sporadiktir, ailesel geçiş göstermez. Apolipoprotein E (APOE) geni risk faktörü olarak tanımlanmıştır (19).

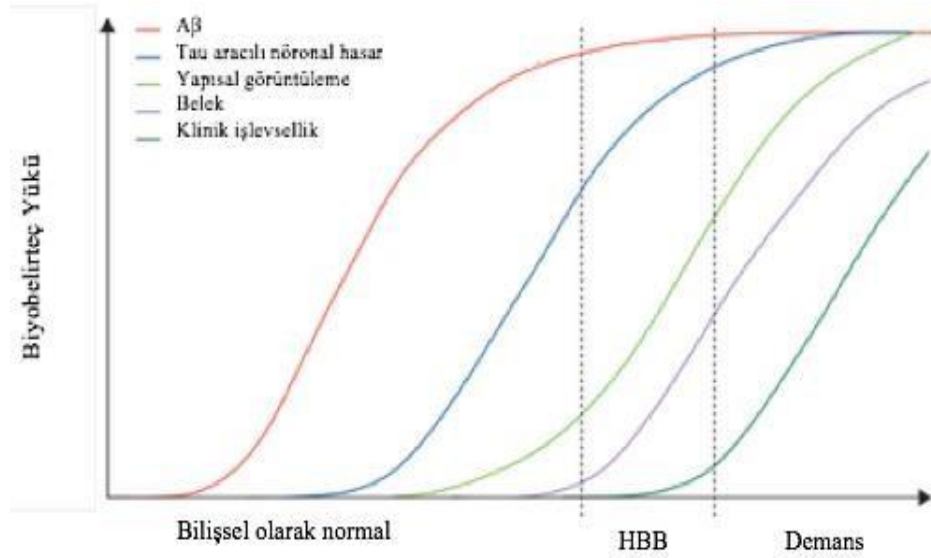
Alzheimer hastalığının kesin tanısı, beyindeki nöropatolojik değişikliklerin ölüm sonrası analizinden gelir. Hem klinik hem de patolojik özelliklerin analizleri, yani klinikopatolojik korelasyon çalışmaları, patolojinin bilişsel durumla nasıl ilişkili olduğuna dair önemli bilgiler sağlamıştır. Günümüzde ilerleyen teknoloji ile, erken evrelerde in vivo patolojinin gösterilmesi ve erken tanı konulması konusunda ilerleme kaydedilmiştir. İn vivo tekniklerin hastalığın çeşitli safhalarında kullanılması, canlı bireylerde klinik ve patolojik korelasyon çalışmalarının yapılmasına izin vermiştir. Ancak araştırma merkezleri ve özelleşmiş klinikler dışında, günlük klinik pratikte tanı

için halen anamnez ve çeşitli bilişsel işlevleri ölçen nöropsikolojik değerlendirmeden yararlanılmaktadır.

2.2. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi

Alzheimer hastalığı beyinde ekstraselüler A β kümelenmelerinden oluşan senil plaklar ve hücre içi hiperfosforile tau (p-tau) ve nöroflamanlardan oluşan NFY'ler ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. Bunların dışında gliyozis, inflamasyon, nöronal, sinaptik ve kolinergik kayıplar gibi farklı nöropatolojik değişiklikler de görülmektedir (20, 21, 22). Hastalığın erken dönemlerinde NFY'ler entorinal korteks ve hipokampuse lokalize olup (Braak evre I-II), daha sonra inferior temporal korteks ve asosiasyon kortekslerine yayılırlar (Braak evre III-IV) (23, 24). Bu evre AH'nin erken dönem bellek belirtileri ile ilişkilidir (25, 26). NFY'lerin yayılımı demansın derecesi ve hastalık süresi ile ilişkili bulunmuştur (27, 28). Öte yandan sağlıklı bilişsel işlevlere sahip kişilerin (29, 30, 31, 32), ve hafif bilişsel bozukluk ya da demans tanısı olan kişilerin (30, 33, 34) dahil edildiği çalışmalarda nöropsikiyatrik semptomlar ve A β birikimi arasında ilişki gösterilmiştir.

Alzheimer hastalığının nöropatolojik sınıflandırması için 2012 yılında üç parametreden oluşan (Amiloid, Braak, CERAD) yeni bir değerlendirme modeli (ABC) geliştirilmiştir: A β içeren amiloid plaklar (A), nörofibriler yumakların Braak Evrelemesi (B) ve nöritik amiloid plakların skorlanması (C). Bir önceki nöropatolojik sınıflandırma demans tanısı konmasını gerektirmesine rağmen (35) bu yeni sınıflandırma, AH'de görülen nöropatolojik değişikliklerin bilişsel bozulma ortaya çıkmadan görülmeye başladığının altını çizer (36, 37, 38) (**Şekil 2.1**). Çalışmalar özellikle erken dönemde amiloid plaklar ile bilişsel işlevler arasında bir korelasyon olduğunu, hastalık ilerleyip NFY'ler ve nörodejenerasyon arttıkça bu ilişkinin zayıfladığını göstermektedir (39, 40).



Şekil 2.1. Alzheimer Hastalığında Biyobelirteç Modeli (Jack ve ark.'nın 2010 makalesinden alınmıştır (41))

Alzheimer hastalığının patolojisi iyi bilinmekle beraber, patogenezi ve patofizyolojisi halen net olarak tanımlanamamıştır. Hastalığın patogenezinin açıklamada kolinerjik hipotez, amiloid kaskad hipotezi, tau hipotezi, inflamasyon hipotezi ve mitokondriyal hipotez gibi hipotezler kullanılmakla birlikte hastalığın patofizyolojisini açıklayabilecek kesin bir mekanizma bulunmamaktadır (8,9).

2.2.1 Kolinerjik Hipotez

Asetil kolin (ACh) postsinaptik membranda nikotinik reseptörlere bağlanarak hem doğrudan hem de G protein ilişkili muskarinik reseptörler aracılığıyla etkisini gösterir. Nikotinik etkilerin hücrenin uyarılabilirliğini artırdığı ve dikkat ile bağlantılı olduğu, muskarinik etkilerin ise kalıcı sinaptik değişikliklerle nöroplastisite üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (42). Kolinerjik kaybın Aβ kümelenmesi ve nörotoksitede artışa neden olduğu, Aβ'nın ise ACh sentezi, salıverilmesi ve postsinaptik etkisini azaltabileceği gösterilmiştir (42).

Alzheimer hastalığının kolinerjik hipotezi, hastalığa bağlı bilişsel bozulmanın, kolinerjik nöronların ilerleyici kaybı ve beyindeki asetilkolin düzeyinin azalmasından kaynaklandığı gözlemine dayanmaktadır (43). Asetilkolinin rolünü vurgulayan çalışmalar antikolinerjik tedavilerin belleği bozması, AD hastalarının otopsi incelemelerinde ACh üretiminde görevli enzimlerin azalmış olduğunun gösterilmesi,

Ach'yi "asetat" ve "kolin" e hidrolize ederek post-sinaptik aktivitesini durduran asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden ajanların bilişsel işlevlerde iyileşmeye neden olmasına dayanmaktadır (44). Ancak kolinesteraz inhibitörlerinin bilişsel işlevlerde iyileşmeye yol açarken hastalığın ilerlemesi üzerinde bir etkilerinin olmadığı gösterilmiştir. Daha yeni çalışmalar kolinerjik teorinin doğruluğunu sorgulamaktadır ve artık kolinerjik tükenmenin tek başına AH belirtilerinden sorumlu olduğuna inanılmamaktadır (45).

2.2.2 Amiloid Kaskad Hipotezi

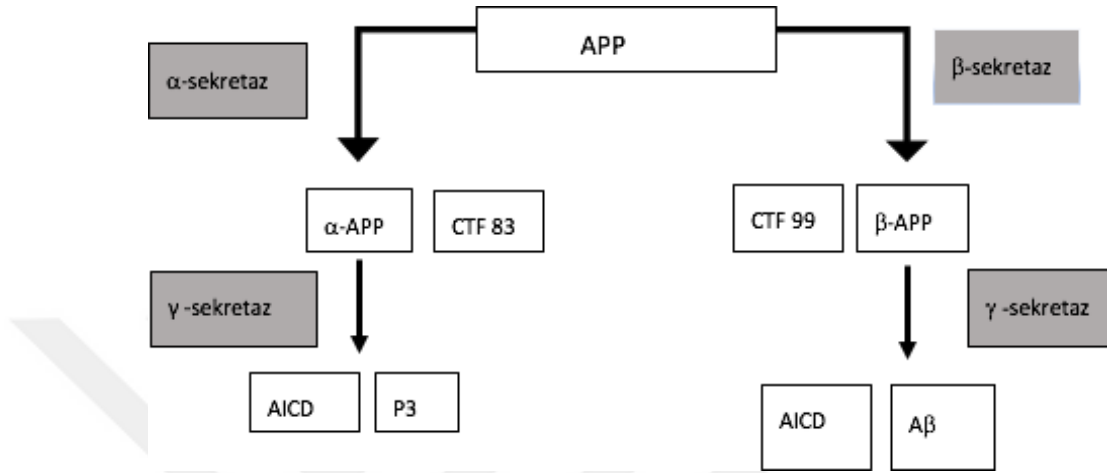
Amiloid kaskad hipotezi amiloid üretiminde artışa neden olan bazı genetik mutasyonların (Down sendromunda kromozom 21'deki fazladan apolipoprotein genetik kopyaları) ve ailesel Alzheimer hastalığı mutasyonlarının saptanmasına (APP geni (46), PSEN1 (47) ve PSEN2 (48) dayanmaktadır. Bu genlerdeki mutasyonların APP'den metabolize edilen A β proteininin atılamamasına veya amiloid plaklar içinde biriken A β üretiminin artışına yol açtığı düşünülmektedir. Alzheimer hastalarında A β peptidini oluşturan yolun etkinliği artmış ya da hücreler arası sıvıdan A β 'nin uzaklaştırılması azalmış olabilir (49, 50).

Amiloid prekürsör protein (APP), 695 aminoasitlik bir membran proteinidir. Asıl görevi bilinmese de, nöronal plastisite ve sinaps oluşumu için önemli olduğu bilinmektedir (51, 52). Yirmibirinci kromozomda bulunan APP geninin ürünü olan APP'nin proteolizi amiloidojenik ve non-amiloidojenik yolak olarak iki şekilde bir dizi sekretaz enzimi tarafından gerçekleştirilir (51) (**Şekil 2.2**). Her iki APP metabolik yolağı da normal fizyolojinin bir parçası olup, AH'de amiloidojenik yolağın etkinliği artmıştır. AH'de α -sekretaz yolu baskılanırken, dengenin β ve γ -sekretaz yollarına saptığı ileri sürülmektedir (53, 54, 55).

Amiloidojenik yolakta APP, β -sekretaz (BACE) ve γ -sekretaz ile parçalanır. BACE, APP'yi N terminal amino ucundan keser. PSEN1/2'yi içeren bir multiproteaz enzim kompleksi olan γ -sekretaz ise karboksi ucundan keser ve A β^{1-40} ve A β^{1-42} oluşur (**Şekil 2.2**). Kırkiki aminoasitlik form (A β^{1-42}) C terminalindeki iki ek hidrofobik kalıntı nedeniyle daha amiloidojeniktir ve agregasyona daha meyillidir. Bu durum amiloid fibrillerdeki sekonder yapılar olan β katlanmaların oluşumunu kolaylaştırır (56, 57, 58). A β^{1-42} 'nin AH ile ilişkili amiloid plak oluşumuna yol açan oligomerleri

ve fibrilleri oluşturduğu ileri sürülmektedir (59, 60). Diffüz plaklar halinde agrege olan A β yoğun nöritik plaklara dönüşür (61).

Bu bulgular, AH'deki nörotoksisitenin mediyatörlerinin amiloid plakları değil, küçük A β oligomerleri olduğu hipotezini desteklemektedir (62, 63).



Şekil 2.2. Amiloidojenik ve non amiloidojenik APP metabolizması. A β : Amiloid beta, AICD: APP'nin intraselüler alt birimi, APP: Amiloid prekürsör protein, CTF: APP'nin C terminali fragmanı. (Zhang ve ark.'nın 2019 makalesinden uyarlanmıştır (64))

Amiloid immünoterapisinin hastalığın tedavisinde etkisiz olduğunun gösterilmesi, monogenik AH formlarının hastaların %1'inden azını oluşturması, A β kümelenmesinin nöronal hücre kaybı ve bilişsel azalma ile orantılı olmadığına gösterilmesi, sağlıklı kişilerde de amiloid birikiminin gösterilmesi amiloid kaskad hipotezinin tüm patofizyolojiyi aydınlatmada yetersiz kaldığını göstermektedir (65, 66).

2.2.3 Tau Hipotezi

Mikrotübüllerin organizasyonu ve stabilizasyonunda rol alan tau proteini, hücre morfolojisinin korunması ve aksonal taşınmada rol almaktadır. Tau proteininin ayrıca nöronlarda ve diğer hücre nükleuslarında DNA ve RNA ile etkileşime girdiği ve nükleolar yapının oluşmasında da rolü olduğu düşünülmektedir (67, 68). Hiperfosforile tau (p-tau) AD, frontotemporal demans (FTD), Parkinson hastalığı, Down sendromu, Pick hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilidir (69, 70).

Alzheimer hastalığında p-tau proteini mikrotübüllere bağlanamamaktadır. Bu proteinler birbirlerine bağlanarak ikili helikal filamentler ve düz filamentler gibi AH'nin karakteristik patolojik özelliklerini oluşturmaktadırlar. P-tau'nun NFY'lerde kümелendiği, nöronal ölümü tetiklediği ve hipokampus, amigdala ve temporal bölgelerde atrofiye neden olduğu gösterilmiştir (71). P-tau kümelenmelerinin A β 'ya kıyasla Alzheimer hastalarında bilişsel bozulma ile ilişkili olduğunun gösterilmesi, AH ve ilişkili diğer nörodejeneratif hastalıklarda p-tau'yu hedeflemenin yeni bir tedavi müdahalesi olabileceğini düşündürmüştür. Klasik tau hipotezine göre A β ¹⁻⁴² oligomerleri anormal kinaz aktivasyonunu indükler, tau hiperfosforilasyonu artar, tau proteininin aksonlardan dentritlere translokasyonu uzun süreli güçlendirme (*long term potentiation*, LTP) blokajına neden olur, ilerleyici sinaptik bozulma, dentritik diken kaybı ve erken bağlantılarda bozulma gerçekleşir (72). Buna ek olarak A β ¹⁻⁴² oligomerlerinin sinapslardaki N-metil-D-aspartat reseptörü (NMDAR) sayısını azalttığı, ekstraselüler glutamat gerilimini azalttığı ve hastalığın erken evrelerinde dahi nörodejenerasyonu başlattığı bilinmektedir.

Somada ve aksonlarda olduğu bilinen tau proteininin postsinaptik bölgede de bulunduğu ortaya çıkması nöroplastisitede görevli olabileceğini düşündürmüştür. Bellek oluşumu için uzun süreli sinaptik plastisite, LTP ve uzun süreli depresyon (*long term depression*, LTD) gerekmektedir. Sinapslardaki NMDAR aktivasyonu LTD'yi tetikler. LTD oluşum yolağında aktiveleştirilen glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3 β), tau proteininin mikrotübül alt birimini fosforiller (73). Bu nedenle LTD oluşumunda p-tau görev alır (74). Öte yandan fosforile olmayan tau da LTP oluşumunda görevlidir (75). Yakın zamanda ayrıca postsinaptik bölgedeki p-tau'nun NMDAR aşırı uyarımını önlediği, mikrotübül alt biriminden fosforillenmiş olan p-tau proteininin klasik hipotezin aksine nöroprotektif olabileceği de gösterilmiştir (76).

2.2.4 İnflamasyon Hipotezi

Bu hipotez reaktif gliosis ve nöroinflamasyonun AH'nin önemli özellikleri olmasından yola çıkar. Alzheimer hastalarında mikrogliya ilişkili yollarda işlev bozukluğu olduğu düşünülmektedir (77). Reaktif mikrogliya ve astrositler amiloid plakların etrafını çevreler ve proinflamatuvar sitokinler salgılar (78). AH'de mikrogliyalardaki işlev bozukluğu sonucunda plakların fagositozu yapılamamakta,

nörotoksik inflamasyonun engellenememesi sonucunda nörodejenerasyon görülmektedir (79).

2.2.5 Mitokondriyal Hipotez

Mitokondri yaşam ve ölüm için kritik olan hücresel işlevlerin devamlılığı için önemli bir organeldir. Mitokondriler hücresel enerji üretiminin %90'ından fazlasını karşılarlar (80). Nöronların sınırlı glikolitik kapasitesi ve nöronal işlevlerin yüksek enerji gerektirmesi onları aerobik oksidatif fosforilasyona bağımlı hale getirir (81). Bu nedenle sağlıklı mitokondrilerin varlığı nöronlar gibi uzun yaşayan hücreler için kritik öneme sahiptir.

Mitokondriyal işlev bozuklukları AH'deki en erken ve belirgin değişikliklerdendir ve yakın zamandaki çalışmalar mitokondri aracılı mekanizmaların AH patogenezinde yer aldığı görüşünü desteklemektedir (9,82). AH patogenezinde mitokondriler pek çok aşamada rol alabilir. Mitokondriler hastalığın tetikleyicisi olabilir (82, 83), membranlarında APP (84) ve aynı zamanda aktif γ -sekretaz enzimatik kompleksi bulunması (85) nedeniyle A β üretim kaynağı olarak rol alabilirler. A β 'nın kendisi de mitokondriyal işlev bozukluğuna neden olabilir ve reaktif oksijen radikallerinin (ROS) üretimini artırabilir (86). Blass ve Gibson'ın oksidatif metabolizma ve mitokondrinin AH'de rolü olduğunu ileri sürmelerinden bu yana (87) AH'de mitokondriyal değişiklikler gösterilmiş ve olası mekanizmaları aydınlatmak ve mitokondriyal defektlerin hücresel sonuçlarını aydınlatmak için pek çok çalışma yapılmıştır (9). Swerdlow ve Khan sporadik geç başlangıçlı AH'de (çevresel ve genetik faktörlerle belirlenmiş) mitokondriyal işlev bozukluklarının birincil rolü olduğunu, mitokondrideki değişikliklerin A β plak ve NFY oluşumunu tetiklediğini ileri sürmüşlerdir (9).

Mitokondrinin en önemli fonksiyonu elektron transport zinciri (ETZ) ve oksidatif fosforilasyonla enerji üretmektir. Aerobik hücrelerde farklı substratlardan alınan elektronların yükseltgenme ve indirgenme olayları ile oksijene taşındığı yola "elektron transport zinciri" adı verilir. Substratların çoğu bu yolu kullanır. Elektronların, ETZ'de taşınması sırasında oluşan enerjinin adenosin difosfat (ADP) ve inorganik fosfor (Pi) ile birleşip ATP (adenosin trifosfat) oluşturması olayına "oksidatif fosforilasyon, OXPHOS" denir (88). OXPHOS toksik endojen hidrojen

peroksit (H_2O_2), hidroksil (OH^-) ve süperoksit (O_2^-) gibi serbest radikallerin temel kaynağıdır (89). Süperoksitler süperoksit dismutaz (SOD) ile H_2O_2 'ye, nitrik oksit varlığında ise peroksinitrite dönüşebilir. Az miktardaki reaktif oksijen radikalleri hücre içinde ikincil mesajcı olarak görev alır ancak fazlalığı hücreler için yıkıcı etkiyesahiptir ve pek çok patolojik süreçte rol alır (90). Merkezi sinir sistemi (MSS), yüksekoksijen mevcudiyeti ve tüketimi, oksidatif hasara duyarlı çoklu doymamış yağ asidi içeriğinin çok olması, antioksidan savunmalarındaki eksikliği ve yüksek redoks metalleri içermesi nedeniyle reaktif oksijen radikallerinden (ROS) kaynaklanan hasaraözellikle duyarlıdır (91). Alzheimer hastalarının lenfosit ve trombositlerinde ve postmortem beyin dokularında mitokondriyal kompleks I, III ve IV enzim aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (92, 93, 94).

Mitokondrilerin bir diğer işlevi de sitozolik Ca^{+2} 'yi esas olarak tek yönlü taşıyıcı (*uniporter*) yoluyla içeri almak, Na^+/Ca^{+2} veya H^+/Ca^{+2} değiştiricileri ile serbest bırakarak hücre içi Ca^{+2} 'yi tamponlamaktır (95). Anormal sitozolik Ca^{+2} yükselmeleri mitokondri içinde hızlı Ca^{+2} artışına neden olur. Ca^{+2} 'nin normal sinir iletimi, kısa ve uzun süreli plastisite ve gen transkripsiyonunun düzenlenmesindeki rolü göz önüne alındığında mitokondrinin bu işlevi önemlidir. Ca^{+2} homeostazındaki bir düzenleme bozukluğu eksitotoksisite aracılığıyla apoptoz ve nörodejenerasyon ile yakından ilişkilidir (95). Yaşla birlikte MSS'de Ca^{+2} tamponlama kapasitesinin azaldığı gösterilmiştir, mitokondrinin bu homeostaz bozulmasında rolü olduğu düşünülmektedir (96).

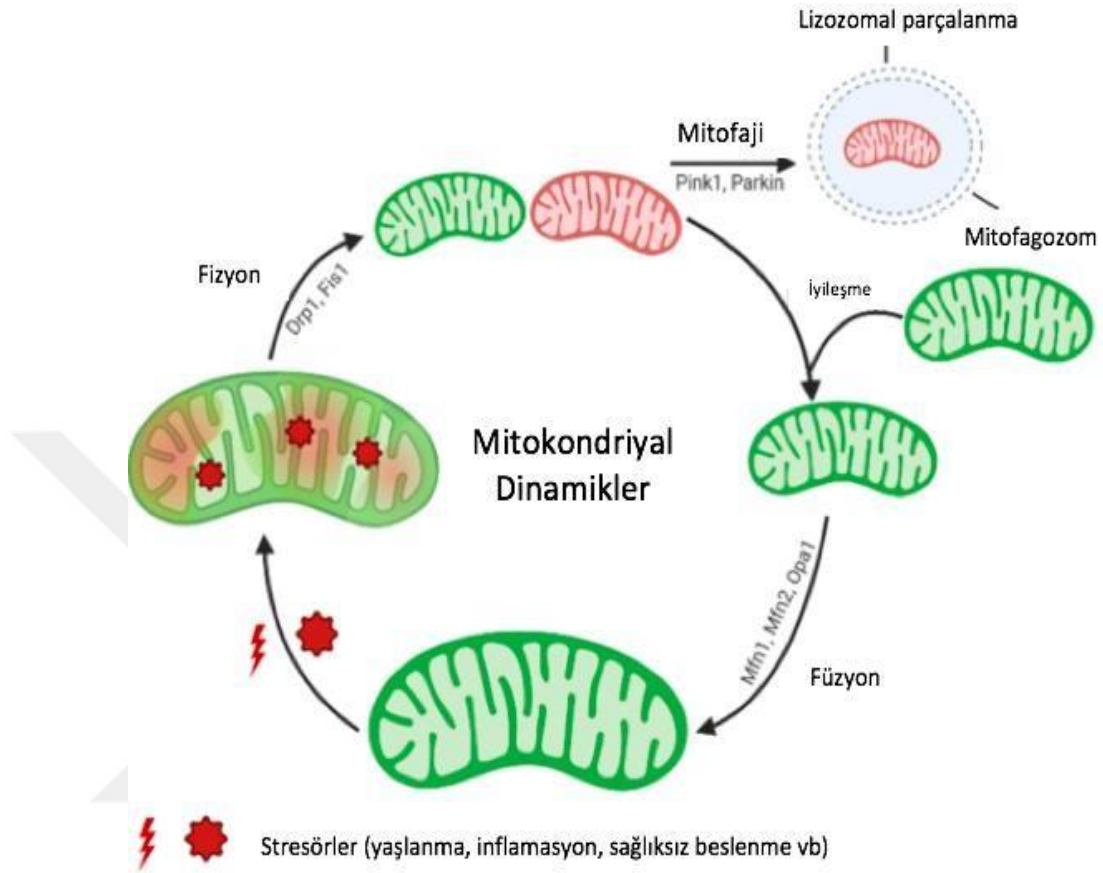
ROS üretiminde artış, mitokondriyal Ca^{+2} homeostazında bozulma ve apoptoz indüklenmesi arasındaki moleküler bağlantı mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneklerinin (*mitochondrial permeability transition pore*, mPTP)) açılması ile sitokrom C, apoptoz indükleyici faktör (AIF) gibi proapoptotik proteinlerin sitozole çıkışı ve kaspaz aktivasyonudur (. Mitokondriyal geçirgenlik mPTP'nin oluşumu ile aktifleştğinde mitokondri iç zarı bütünlüğünü kaybeder ve oksidatif fosforilasyon proton pompası ile eşleşemez (*uncoupling*). Böylece membranlar arasındaki proton farkı ve ATP üretimi azalır (98).

Mitokondriler benzer uyarılara (DNA hasarı, büyüme faktörü azalması, stres, hipoksi vb.) cevap olarak hem hücre ölümünü uyarabilir hem de mitofajiyi aktifleştirebilirler. Hasarlı mitokondrilerin mitofaji ile ortadan kaldırılması sağ kalımı

arttırırken, mitokondri diğ er yandan apoptoz ve nekrozu da indükleyebilir. Bu yüksek oranda korunmuş süreçler hücresinin sağı kalımı ve ölümü arasındaki dengede önemlidirler (99). H uce mitokondri dış zarrının ge irgenliğıni düzenleyen BAK ve/veya BAX ile ya da mitokondri iç zarrındaki mPTP'nin açılması ile ölüm s urucine girebilir. Dış zar geçirgenliğinin BAX/BAK ile artması sitokrom C, SMAC/DIABLO, AIF, endonükleaz G gibi proapoptotik proteinlerin salınımına yol açar (100). mPTP'nin açılması aynı zamanda su ve     nebilir maddelerin mitokondri matriksine akışına neden olarak proton gradientini bozar ve ATP sentezi bozulur. Bu akış i  membranın şişmesine ve sonunda dış zarın parçalanmasına neden olarak nekrotik h uce ölümüne yol açar. Bunu önlemek için hasarlı mitokondriler otofagozomlarda birikir ve apoptoz ya da nekroz tetiklenmeden önce yıkılır. Hem apoptoz hem de nekroz mitokondri tarafından sıkı biçimde denetlenir (99).

Mitokondrilerin tüm bu işlevleri yerine getirebilmesi için sağılıklı bir mitokondri havuzu gerekmektedir. Enerji ihtiya ı büyük oranda mitokondrilerden karşılanan nöronların akson ve dentritlerinin enerji ihtiya ının karşılanması için, mitokondrilerin nöron gövdesinden uzak kısımlara da taşınması gerekir. Bu nedenle mitokondriyal dinamiklerin uygun bir şekilde çalışıyor olması önemlidir (101). Sağılıklı mitokondri havuzunun sağılanması dinamik bir süreçtir. Bu mitokondriyal dinamikler sıkı denetlenen süreçlerle kontrol altında tutulur. Bunlar füzyon, fizyon, de-novo mitokondri oluşumu ve istenmeyen, hasarlı mitokondrilerin mitofaji ile yıkımını kapsar (101) (**şekil 2.3**). Bu sağılıklı mitokondri havuzunun sürdürülmesi özellikle nöronların canlılığı için önemlidir. Mitokondriyal füzyon iki mitokondrinin birleşip tek bir yapı oluşturması iken, mitokondriyal fizyon bir mitokondrinin b l  nerek iki ya da daha fazla yapı meydana getirmesi işlemidir. Füzyon ile defektif mitokondriler sağılıklı havuza dahil edilebilirler. Bu birbirinin tersi iki mekanizma hücredeki mitokondrilerin mimarisini ve her yönüyle mitokondri işlevlerini etkiler. Fizyon işlevsiz mitokondriyi diğ er mitokondrilerden uzaklaştırmada ve mutant mitokondriyal DNA'yı ayırmada rol alır. Uzamış (*elongated*) mitokondri fizyon ile enkaps lasyona uygun boyutlara parçalanır, aynı zamanda hasarlı mitokondriyal materyalin ayrışarak mitofaji ile ortadan kaldırılması sağılanır. Fizyon, kalite kontrolünün yanında değışen metabolik gereksinimlere uygun mitokondri sayısının

sağlanması, eritrositlerin farklılaşması gibi bazı özel gelişimsel basamaklarda da görev alır (102) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Mitokondriyal dinamiklerin şematik gösterimi. Stresle birlikte mitokondri hasarı birikir ve hasarlı mitokondri Drp1 aracılığıyla fizyona uğrar. Diğer proteinler de mitokondrinin parçalanmasına yardımcı olur. Hasarlı mitokondri makrotofaji sistemi tarafından tanınır ve mitofagozomu oluşturur. Mitofagozom lizozomla birleşerek mitofaji ile parçalanır. Fizyon sonrası sağlıklı mitokondri parçası Mfn1, Mfn2, Opa1 proteinleri aracılığıyla füzyona uğrayarak sağlıklı mitokondri havuzuna dahil edilebilir. (Guha ve ark.'nın 2020 makalesinden uyarlanmıştır (103))

Nöronlar post mitotik olmaları nedeniyle hücre içinde biriken fazla materyali bölünerek azaltamazlar, bu nedenle reaktif oksijen radikallerini üreten ve programlı hücre ölümünü uyaran hasarlı ve istenmeyen mitokondrilerin ortadan kaldırılması için temizleyici bir sistemin varlığı önemlidir. Nöronal canlılıktaki bu önemleri nedeniyle mitokondriyal işlevlerdeki herhangi bir bozukluk nöronal hücre ölümüne neden olabilir, bu da nörodejeneratif hastalıklar ile mitokondriyal işlev bozuklukları arasındaki bağlantıyı açıklar. Hücreler artmış mitokondrilere karşı seçici biriktirme

(*sequestration*) ve sonrasında hücre ölümünü uyardan bu hasarlı mitokondrilerin ortadan kaldırılmasını içeren savunma mekanizmalarına sahiptir. Bu süreç mitokondriyal otofaji, diğer adıyla ‘mitofaji’ aracılığıyla gerçekleştirilir (99). Otofaji ve mitofaji ile ilgilenen araştırmacılar bu mekanizmaların AH’de kısmen bozulmuş olduğunu ve bu durumun nöronlarda hasarlı mitokondrilerin birikimine neden oluyor olabileceğini ileri sürmüştür. Fang ve Bohr, 2017’de mitofajide bozulmanın AH’yi başlatmada ve hastalığın ilerlemesinde önemli bir risk etmeni olduğunu ileri sürmüşlerdir (10). Araştırmacılar insan beyni, insan kök hücrelerinde ve farklı AH hayvan modellerinde mitofajinin hasarlandığını göstermiş, mitofajiyi indüklemenin bilişsel bozulmayı ve AH patolojisini azalttığını göstermişlerdir (10).

Mitokondri işlevlerinde bozulmanın AH’nin başlatıcısı mı olduğu, yoksa A β ’nın mitokondri işlevlerinde bozulmaya neden olarak hastalığın gidişatını mı değiştirdiği tartışmalıdır. AH hayvan modellerinde, mitokondriyal hasarın A β üretimini artırdığı ve mitokondriyal hasarın A β kümelenmesinden önce gerçekleştiğine dair bulgular vardır (104, 105). Nöronal hücre kültürleri ile yapılan çalışmalarda da mitokondriyal işlev bozukluğunun oksidatif stres aracılığıyla amiloid üretimini artırdığı gösterilmiştir (106). Yine deneysel modellerle yapılan çalışmalar mitokondriyal işlev bozukluğunun p-tau, mikrotübül depolimerizasyonu ve nörofibriler yumak benzeri patoloji oluşturduğuna dair kanıtlar sunmuştur. Glutamat artışı ile ilişkili kronik Ca⁺² artışının hipokampal nöronlarda AH benzeri p-tau kümelenmesini tetiklediği gösterilmiştir (107). Ratlara ETZ kompleks I inhibitörü rotenon verildiğinde nöronlar, astroglialar ve oligodentrositlerde p-tau biriktiği gösterilmiştir (108). Genetik olarak mitokondriyal SOD2 eksikliğinin fare nöron hücrelerinde AH benzeri p-tau birikimine neden olduğu, ancak antioksidan uygulaması ile azaldığı gösterilmiştir (109).

Bunların yanında A β ve p-tau da mitokondri hasarına neden olabilir. Nöronların A β ’ya maruz bırakılmaları mitokondriyal ATP üretiminde azalmaya, mitokondriyal enzimlerin aktivitesinde azalmaya, ve ROS üretiminde artışa neden olur (105, 110). Sinaptik mitokondriler yüksek enerji ihtiyaçları ve sinaptik aktivasyon sırasındaki güçlü Ca⁺² girişi nedeniyle A β hasarına daha duyarlı olabilirler (111). Sinaptik terminallerin A β ’ya doğrudan maruz bırakılması mitokondriyal işlevlerde

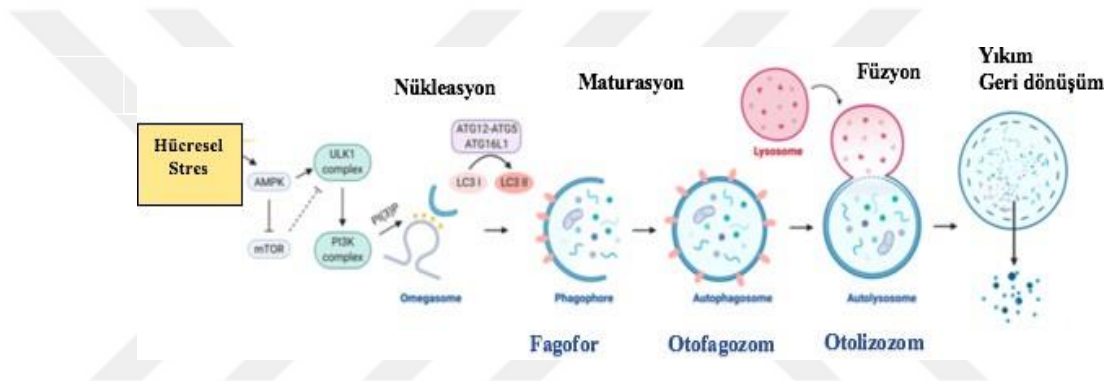
bozulmaya, oksidatif strese, bozulmuş glutamat ve glukoz taşınmasına neden olarak sinapsları eksitotoksik dejenerasyona duyarlı hale getirebilir (112).

Alzheimer hastalarından ve aynı hastalara AH tanısı konmadan 10 yıl önce alınmış kanlardan yapılan eksozom analizleri bu hastalarda katepsin D (lizozomlardaki primer proteaz), LAMP1 (lizozomal membran komponenti) ve ubikutinleşmiş proteinlerin düzeylerinin arttığını göstermiştir. Tüm bunlar lizozomal işlevlerde bozulma olduğunu ve nöronlarda bulunan lizozomlarda parçalanmamış kargo birikimleri olduğunu göstermektedir (113). Alzheimer hastalarının beyin örneklerinden elde edilen nöronlarda ve mutant APP ekspresyonunun arttığı kültür hücrelerinde mitokondriye parkin translokasyonunun, otofagozom kümelenmesinin ve sindirilmemiş mitokondri içeren lizozomların arttığı gösterilmiştir (114). Hasarlı mitokondrielerin nöronlarda birikmesi hücre ATP düzeylerinde azalmaya ve ROS üretiminde artışa, bu da APP ve p-tau işlenmesinde artışa ve AH'nin patoloji bulgularından olan A β plakları ve NFY'lerin oluşumuna neden olabilir (115, 116). Tüm bu bulgular birlikte AH'de nöronal dejenerasyonun patogenezinde hasarlı mitofajinin yeri olduğunu desteklemektedir (10).

2.3. Otofaji ve Mitofaji

Otofaji çift zarlı veziküllerin (otofagozomlar), organelleri ve proteinleri parçalanmaları için lizozomlara taşıma sürecidir (117). Otofajik aktivite yaşla birlikte azalır ve yaşamın devamı için gereklidir (118). Kanseri, nörodejenerasyon, mikrobiyal enfeksiyonlar ve yaşlanmada otofajik işlev bozuklukları gösterilmiştir (119). Bazal otofaji, zarar görmüş organeller, uzun ömürlü proteinler ve protein agregatlarını uzaklaştırmak için besin ve büyüme faktörü eksikliği gibi hücre stresine yol açan durumlarda hızla aktifleşmektedir (120). Otofaji sadece besin kaybında hücre ürünlerinin geri dönüşümünü sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hasarlı organellerin (mitokondri, peroksizom vb.) seçici olarak ortadan kaldırılmasıyla kalite kontrolü de yapar (102). Şimdiye kadar mikrootofaji, şaperon aracılı otofaji ve makrootofaji olmak üzere üç farklı otofaji türü tanımlanmıştır ve bunların hepsi lizozom aracılıdır. Mikro ve makrootofaji sitoplazmik içerikleri seçici olmadan ya da seçici olarak parçalayabilir. Mikrootofaji ve şaperon aracılı otofajide substratlar lizozoma veziküller taşıma olmadan taşınırlar (121).

Otofaji bir dizi otofaji ilişkili protein (ATG) ile düzenlenir. Hücre otofajiyi uyuracak bir sinyal aldığında fagofor (*phagophore*) denen bir membran oluşur. Bu olay, diğer adıyla nukleasyon BECLIN1, VPS15 ve VPS34'ten oluşan bir komplekse ihtiyaç duyar (122). Membran daha sonra iki ubikutin benzeri konjugasyon sistemi (mikrotübül ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3 (LC3) ve ATG12-ATG5) aracılığı ile ATG16L kompleksi ile bir araya gelir ve sitozolik LC3 (LC3-I), fosfatidiletanolamin ile konjuge edilerek otofagozomal membranı çağıran LC3-II'ye çevrilir (123, 124). Fagofor uçları hedefin etrafında birleşecek şekilde daha da genişler ve çift zarlı bir yapı olan otofagozom oluşur. Otofagozom lizozomla birleşir ve içeriği lizozomal enzimlerce parçalanır (99) (Şekil 2.4).



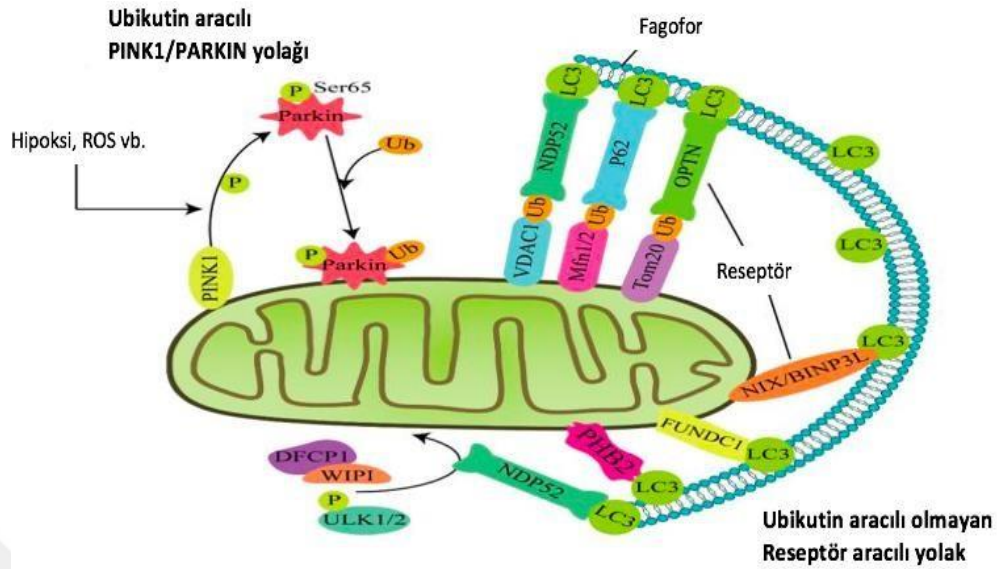
Şekil 2.4. Otofaji sürecinin şematik gösterimi. Otofaji mTOR ve AMPK tarafından düzenlenir. Otofajinin aktivasyonu, ULK1 ve PI3K protein komplekslerinin oluşumunu içerir. Hücre otofajiyi uyuracak bir sinyal aldığında fagofor oluşturur (nukleasyon). Otofagozom zarının olgunlaşır ve uzarken, iki ubikuitin benzeri konjugasyon aşamasını, ATG12'nin ATG5'e konjugasyonunu ve LC3 I'ın LC3 II'ye dönüşümünü içerir. Olgunlaşmış otofagozomlar, hücre içi içerikleri parçalamak ve makromolekül bileşenlerini geri dönüştürmek için lizozomlarla birleşir. (Chang NC ve ark. 2020 makalesinden uyarlanmıştır (125))

Bir selektif otofaji türü olan mitofaji ise hasarlı, yaşlanmış, gereksiz mitokondrilerin ortadan kaldırılmasıdır, otofaji ve ubikuitin proteozom sistemine ihtiyaç duyar (126). Christian de Duve ve Robert Wattiaux 1966'da ilk kez memeli hücrelerinde mitofajiyi görüntülemiş (127), John J. Lemasters ise 2005 yılında mitokondrilerin otofajisini 'mitofaji' olarak adlandırmayı önermiştir (128). Yüksek oranda korunmuş bir hücrel süreç olan mitofajinin moleküler mekanizmaları maya,

Caenorhabditis elegans, *Drosophila melanogaster*, zebra balığı ve memelilerde çalışılmıştır (129, 130).

Mitofaji ihtiyaç duyulmayan mitokondrilerin ortadan kaldırılmasını sağlayan bazal mitokondriyal dolaşım için gereklidir. Bununla birlikte eritrositlerin olgunlaşması, fertilize oositlerin gelişimi gibi bazı fizyolojik durumlarda da mitofaji indüklenebilir (131, 132). Bu fizyolojik durumların yanında mitokondriyal membranın depolarizasyonu, ya da hipoksi durumlarında strese yanıt olarak da mitofaji indüklenebilir (133, 134).

Bütün mitofaji tipleri genel olarak reseptör aracılı bir mekanizma kullanırlar. Bu reseptörlerin bazıları mitokondriyal membranda yerleşmiş olan protein ve lipidlerdir, bazıları ise mitokondriyal yüzeydeki ubikutinle işaretlenmiş yapılara ve olgunlaşmamış otofagozomların yapısındaki LC3-II'ye bağlanan mitokondriyal olmayan proteinlerdir (135). Mitofajiyi kabaca ubikutin aracılı ve ubikutin aracılı olmayan mitofaji olarak ikiye ayırabiliriz. Ubikutin aracılı mitofajide PTEN ile indüklenen kinaz 1 (PINK1), parkin, dış membran translokazı (TOM) ve iç membran translokazı (TIM) kompleksleri ve otofaji reseptörleri (OPTN, p62, NDP52, SQSTM1/p62) rol alır. Ubikutin aracılı olmayan mitofajide ise mitokondri dış membranındaki BCL2 ve adenovirus E1B 19 kDa etkileşen protein 3 (BNIP3), NIP 3 benzeri protein X (NIX), BCL2 ve FUNDI mitofaji reseptörü olarak çalışır ve olgunlaşmamış (*nascent*) otofagozoma ubikutine ihtiyaç duymadan doğrudan LC3 etkileşim motifi (LIR) ile bağlanır (136) (**Şekil 2.5**).



Şekil 2.5. Ubikutin aracılı ve ubikutin aracılı olmayan mitofaji. Ubikuitine bağımlı yolda PINK1, hasarlı mitokondriyal dış zar üzerinde stabilize edilir, sitoplazmik E3 ubikutin ligaz parkini çağırır ve fosforile eder. Fosforile Parkin, mitokondriyal dış zar proteinleri VDAC1, Mfn1/2 ve Tom20'yi ubikutinler. NDP52 ve OPTN gibi otofaji reseptörleri, ubikutinlenmiş bu mitokondriyal dış zar proteinlerini LC3'e bağlayarak mitofajiyi başlatır. Ubikuitine bağımlı olmayan yolda ise BNIP3L/NIX, FUNDC1 ve PHB2 gibi otofaji reseptörleri, dış mitokondriyal zar üzerinde kalır ve ubikutine ihtiyaç olmaksızın doğrudan LC3'e bağlanır ve mitofajiyi başlatır. (Li ve ark.'nın 2022 makalesinden uyarlanmıştır (137))

Tüm bu mitokondriyal reseptörlerin çeşitliliği yüksek kompensatuar mekanizmaların varlığını ve zaman zaman bir arada çalıştıklarını gösterir. Bu reseptörler aracılığıyla mitokondriyal işlevlerin sürekliliği, enerji metabolizması ve hücre homeostazı için elzemdir.

Sonuç olarak, yaşlanma ve nörodejeneratif hastalıklar gibi yaşlanma ile ilişkili hastalıklarda mitofajinin hasarlandığına dair kanıtlar her geçen gün artmaktadır. Bu nedenle mitofajinin indüklenmesini içeren terapötik müdahalelerin hastalığın yükünün azaltılmasında, belki önlenmesinde rolü olabileceği düşünülmektedir (138).

2.4. Alzheimer Hastalığının Nöropsikiyatrik Belirtilerinin Patofizyolojisi

Nöropsikiyatrik belirtilerin inflamasyon, anatomik değişiklikler, nörotransmitter sistemlerinde değişiklikler gibi farklı mekanizmalarla geliştiğini iddia eden çalışmalar vardır (139). Alzheimer hastalığına eşlik eden NPS'lerden beyin belli bölgelerinde (hipokampus, frontal lob, anterior ve posterior singulat, insula, amigdala gibi) görülen atrofinin sorumlu olabileceği de düşünülmektedir. Bu bölgelerin dürtü kontrolü, motivasyon, duygu dışavurumu ve duygu düzenlemesi ile ilişkili oldukları düşünüldüğünde bu ilişkinin NPS'lerle bağlantılı olduğu düşünülebilir (14). Yakın tarihli bir fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme (fMRI) çalışmasında AH ve depresyon hastaları karşılaştırıldığında hipokampal-prefrontal korteks bağlantısında küçük farklılıklar olsa da her iki grupta da hasar olduğu, her iki hasta grubunda da belirgin hipokampal hacim azalması olduğu gösterilmiştir. Bulgular hipokampusün bellek ve duygu düzenlemesindeki rolüne işaret etmiş (140) ve AH'nin erken dönemlerinde amiloid aracılı hipokampal hasarın gözlenmesinin sonucunda AH'nin bir sekeli olarak depresyonun gelişebileceği algısını güçlendirmiştir (141).

Beyindeki yapısal hasar ayrıca serotonin, noradrenalin, dopamin gibi monoaminlerin üretimini etkileyerek de NPS'lere neden olabilir. Alzheimer hastalığındaki monoamin eksikliğinin major depresyon ve anksiyete bozukluklarına benzer olduğuna dair kanıtlar vardır (13).

Major depresyonun nörobiyolojisinde de kronik stres ile ilişkili mitokondriyal değişikliklerin (oksidatif strese artış, ATP düzeylerinde azalma, otofajide değişiklikler gibi) rolü olabileceği düşünülmeye karşın (142), Alzheimer hastalarında görülen depresyon benzeri belirtilerin patofizyolojisinde mitokondrinin rolüne ilişkin az sayıda çalışma vardır. Alzheimer hastalığında olduğu gibi (143), major depresyonda da otofaji hasarlanmaktadır (144). Major depresyon tedavisinde kullanılan amitriptilin ve fluoksetinin monoaminerjik transmiseya etkisinin dışında proapoptotik etkisinin gösterilmesi (145, 146), lityumun da otofajiyi artırdığının gösterilmesi (147) antidepresan etkinliklerinde bu özelliklerinin rolü olabileceğini düşündürmüştür (144). Fluoksetinin ayrıca kronik hafif stres ile indüklenmiş fare modelinde otofaji ve mitofajiyi uyardığı gösterilmiştir (148).

Yaşlanma, nörodejenerasyon ve depresyon serotonerjik iletimde değişiklikler, hücrel enerji ve solunumda azalma ile ilişkilidir (149). Serotonin mitokondriyal biyogenezi ve mitokondriyal işlevleri artırır (150, 151). Bununla birlikte seçici serotonin geri alım inhibitörlerinin (SSGİ) otofajik süreçleri uyardığına ilişkin de kanıtlar vardır (152, 153, 154, 155). Bir çalışmada klinik pratikte Alzheimer hastalarında sık kullanılan sitalopramın mutant APP hücrelerde mitofaji ve otofajiyi uyardığı, A β ile indüklenmiş mitokondriyal toksisiteyi azalttığı gösterilmiştir (156). Bu nedenle mitofajinin SSGİ'lerin etki mekanizmasında ve nöroprotektif rolünde etkili olabileceği düşünülmektedir (156).

Song ve ark. intraserebroventriküler (ICV) A β uygulanmış sıçanlarda otofajinin arttığını, silibinin beyin kaynaklı nörotrofik faktörü (BDNF) artırarak, otofajiyi azaltarak antidepresan ve anksiyolitik etki gösterdiğini belirtmiştir (157).

2.5. Alzheimer Hastalığının Tedavisi

Günümüzde Alzheimer hastalığını tamamen iyileştiren ve hastalığın ilerlemesini durduran ya da geri çeviren bir tedavi bulunmamaktadır. Bu nedenle müdahaleler belirtileri tedavi etmeyi veya bilişsel işlevleri iyileştirmeyi hedefler (158). Şimdiye kadar FDA tarafından AH'deki bilişsel belirtiler için onaylanmış beş tane AH ilacı vardır. Bu tedavilerin bir kısmı asetil kolin estera inhibitörünü hedefler. Bunlar; rivastigmin, galantamin, takrin ve donepezildir (159). Bir Cochrane derlemesinde 6 aylık tedavi sonucunda rivastigmin kullanan hastaların plaseboyla karşılaştırıldığında bilişsel işlevler ve günlük yaşam aktivitelerindeki farkların çok küçük olduğu görülmüştür (160). Glutamat aracılı eksitotoksisiteyi azaltmayı hedefleyen NMDAR antagonisti memantin ise orta-ileri evre AD'nin tedavisinde kullanılmaktadır (161). Memantin etkilerinin değerlendirildiği bir metaanalizde memantin monoterapisinin bilişsel işlevlerde (etki büyüklüğü: -0.27), davranışsal belirtilerde (etki büyüklüğü: -0.12), günlük yaşam aktivitelerinde (etki büyüklüğü: -0.09) ve işlevselliğin global değerlendirmesinde (etki büyüklüğü: 0.18) iyileşme sağladığı bulunmuştur (161).

Bunların dışında kanıtların daha zayıf olduğu E vitamini, folik asit, omega 3, ginseng, dimebon, hirudin, huperzin A, serebrolizin, statinler, kakao, souvenaid, idalopirdin, antiinflamatuar ilaçlar (endometazin, naproksen, rofekoksib gibi) ve

AH'de etkili olmadığı gösterilen amiloidi hedefleyen monoklonal antikolar (solanezumab ve bapinezumab) da bulunmaktadır (162).

Son dönemde çalışmalar hastalığı modifiye edici ve hastalığın ilerlemesini durdurucu/yavaşlatıcı tedavilerin geliştirilmesine odaklanmaktadır. Bu nedenle hastalığın ortaya çıkmasındaki mekanizmaların aydınlatılması önemlidir.

2.5.1. Alzheimer Hastalığındaki Nöropsikiyatrik Belirtilerin Tedavisi

Alzheimer hastalarının %10-30'u major depresyon tanı kriterlerini karşılamaktadır (163, 164). Hastaların yaklaşık %50'si ise depresif duygudurum tariflemektedir. Bu hastalarda depresyon atipik belirtilerle seyrederek ve ayırt etmesi zor olabilir. Sıklıkla insomni, iştah azalması, anksiyete, irritabilite, disfori ve ajitasyon görülür (165). İleri evre AH'de ise agresyon ve duygudurum değişiklikleri en belirgin bulgulardandır (166). AH'de görülen kilo kaybı depresyon ile artabilir ve mortalite ile ilişkilidir (166, 167, 168).

Demans tanısı olan kişiler nöropsikiyatrik belirtiler için reçetelenen ilaçların kullanımına bağlı yan etki geliştirmeye daha yatkındır. SSGİ'ler AH'de görülen depresyon ve anksiyete belirtileri için en sık kullanılan ilaçlardır. Ancak SSGİ'lerin de bulantı, iştah kaybı, kilo kaybı ve uyku bozuklukları gibi yan etkileri olabilir (169, 170). Demansın bilişsel olmayan bu belirtilerinde ilk seçenek olarak farmakolojik olmayan müdahaleler tavsiye edilmektedir.

Demansın davranışsal ve psikolojik belirtileri için antipsikotik ilaçlar önceleri önerilmekteyken etki büyüklüğünün küçük olması (171, 172), bu hasta grubunda daha zor tolere edilmesi ve mortalite riskinde artış (173) ile ilişkili olmaları nedeniyle kullanımları tartışmalıdır (174). Alzheimer hastalarında eşlik eden depresyonun tedavisinde SSGİ grubu ilaçların plaseboya ılımlı bir üstünlüğü olduğu, mutlak etkisiz olmadığı, ancak faydalarını destekleyecek çok kanıtın da olmadığı ortaya konulmuştur (11). Bir randomize kontrollü çalışmada ise demans hastalarında plasebo, mirtazapin veya sertralin karşılaştırılmış, depresyon puanlarında fark saptanmamıştır (175).

2.6. Alzheimer Tedavisinde Mitokondriyi Hedeflemek

Yaşlanmada ve AH patogenezinde mitokondriyal işlev bozukluklarının rolü olduğunun gösterilmesi mitokondriyi hedefleyen tedavi seçeneklerinin etkinliğini

araştırma konusu haline getirmiştir. Böyle hayati bir organeli korumak için hücrenel sağ kalım mekanizmaları mitokondrileri strese karşı korur, mitokondriyal hasarı gözler ve işlevi bozulmuş olan mitokondrilerin seçici olarak ortadan kaldırılmasını sağlar (176). Bozukluğun görüldüğü pek çok mitokondriyal mekanizmayı hedef alan muhtemel tedavi seçenekleri çalışılmaktadır. Örneğin mitokondriyal bozuklukların ROS üretimini artırmasından ve AH'de reaktif oksijen radikallerinin yüksek olduğunun saptanmasından yola çıkarak antioksidanların tedavideki etkinliğine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla koenzim Q (177), vitamin C ve E (178) çalışılmış, kan beyin bariyerini geçememeleri ve mitokondriye lokalize olamamaları nedeniyle etkinlikleri gösterilememiştir. Mitokondriyal lokalizasyonu artırmak için mitoQ (179) ve mitoVitE (180) geliştirilmiş, ancak Alzheimer hastaları ile yapılan klinik çalışmalarda etkinlikleri gösterilememiştir (181).

mPTP'nin açılmasının mitokondriyal membran potansiyelinin kaybına neden olması, mPTP'nin önemli bir bileşeni olan siklofilin D (CypD)'nin patogeneizde etkili olabileceğini düşündürmüştür. Transgenik AH modellerinde kortikal mitokondrilerde siklofilin D ve A β -CypD kompleksi düzeylerinin arttığı, mPTP'nin açılmasını uyarmanın nöronal stresi ve mitokondriyal işlev bozukluklarını artırdığı gösterilmiştir (182). Bu nedenle siklofilin D'yi inhibe etmenin tedavide etkili olabileceği iddia edilmiş, bilinen bir siklofilin D inhibitörü olan siklosporinin AH'deki terapötik potansiyeline yönelik çalışmalar yapılmıştır. Ancak siklofilinin immunsupresif olması ve kan beyin bariyerini geçememesi klinik araştırmaları kısıtlamıştır (181).

Bölünme inhibitörleri, mitofaji aktivatörleri gibi mitokondriyal kalite kontrolü ile ilişkili maddeler son yıllarda çokça çalışılmakta olup, bu maddelerin mitokondriyal işlevleri iyileştirdiği ve AH hayvan modellerinde bilişsel iyileşmeyi sağladığı gösterilmiştir. Klinik etkinliği ile ilgili çalışmalara ihtiyaç duyulmakla birlikte bu moleküller hasarlı hücrelerde kritik mitokondriyal işlevleri uyarması nedeniyle ilgi çekicidir (182).

2.6.1. Mitofaji Düzenleyicileri

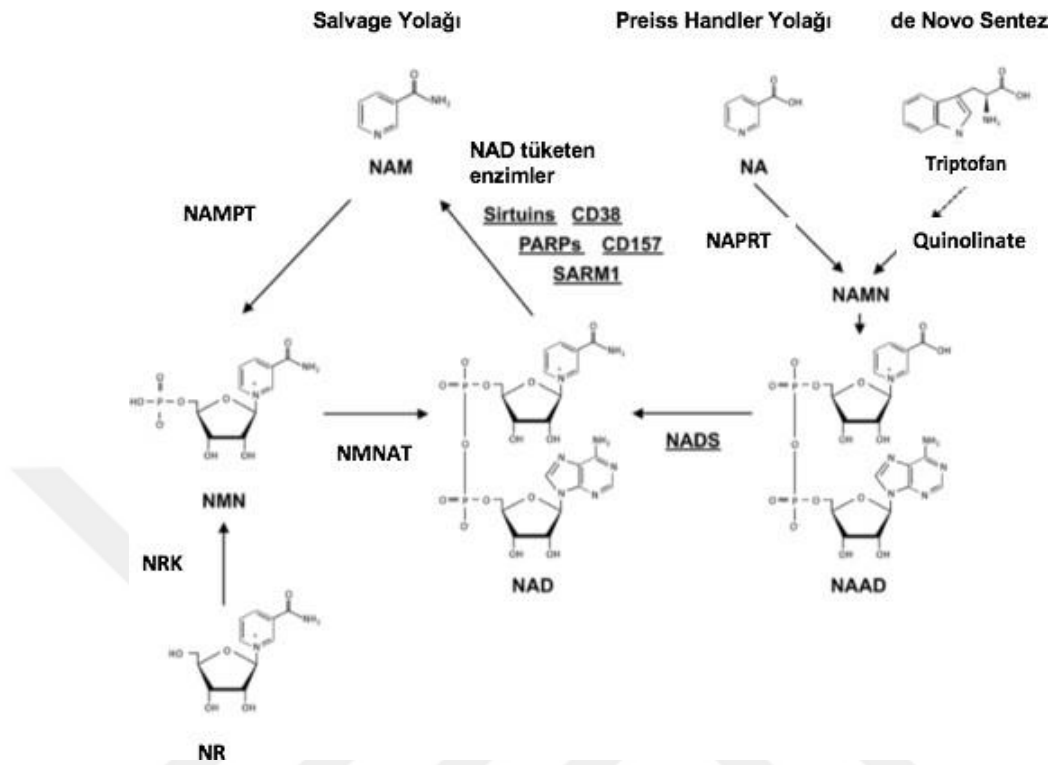
Alzheimer hastalığında mitofaji ve otofajinin hasarlı olduğunun gösterilmesi ve nöronal işlevlerde mitokondrinin önemli bir rolü olması AH'nin tedavisinde mitofaji düzenleyicilerine yönelik çalışmaların önünü açmıştır. Huntingtin, alfa-

sinüklein, tau gibi kümelenmeye yatkın ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili proteinlerin çoğunun otofaji substratı olduğu gösterilmiş (183, 184, 185, 186), otofajinin indüklenmesinin bu proteinlerin hem çözünebilir hem de kümelenmiş hallerini azalttığı, ve bunun faydalı etkileri olduğu gösterilmiştir (183, 184, 185).

Mitofajiyi hedefleyen terapötik müdahaleler PINK1, parkin gibi modülatörler, rapamisin, metformin gibi ilaçlar (mTOR inhibitörleri), bitki metabolitleri (ürolithin, spermidin) ve NAD⁺ öncüllerini (nikotinamid mononükleotid (NMN), nikotinamid ribozid (NR) gibi öncülleri aracılığı ile) içermektedir. Fang ve ark. ürolitin A ve aktinonin gibi kimyasal mitofaji uyarıcıları ile transgenik AH farelerde ve *C. elegans*'ta PINK1 ekspresyonunu artırarak bilişsel işlevleri artırdıklarını, PINK1 delesyonlu nematodlarda ise bu etkinin görülmediğini saptamışlardır. Ürolitin A tedavisi transgenik farelerde ve *C. elegans*'ta A β ve p-tau proteinini azaltmıştır. Ürolitin A'nın faz 1 çalışması mitokondriyal biyobelirteç genlerinde anlamlı artış ve uygun bir güvenlik profili göstermiştir (188).

NAD⁺'nin birçok canlı türünde kalori kısıtlamasının yaşamı uzatıcı etkisinde rol aldığı düşünülmektedir. Çalışmalar NAD⁺'nin kalsiyum homeostazı, mitokondri işlevleri, enerji metabolizması, yaşlanma ve hücre ölümü gibi katabolik ve anabolik hücresel reaksiyonlar için gerekli olduğunu göstermiştir (189). NAD⁺ hücre zarını geçemediği için NMN dışında nikotinik asit, nikotinamid adenin mononükleotid (NAM), NR ve triptofan gibi diyet öncülleri halinde hücre içine alınır, bu öncüller NAD⁺ sentezinde kullanılır. NMN ise hücre içine alınmadan önce NR'ye dönüştürülmek zorundadır, bu dönüşüm hız kısıtlayıcı enzim olan nikotinamid ribozid kinaz (NRK1) ile gerçekleştirilir (190).

NAD⁺ metabolizması dört kategoriye ayrılabilir, triptofandan de-novo sentezlenebilir, nikotinik asit gibi vitamin öncüllerinden Preiss-Handler yolağı ile, ya da NR, NAM ve NMN gibi öncüllerinden salvage yolağı ile ve nikotinamid temel geri dönüşüm yolağı (*core recycling pathway*) ile sentezlenir (191, 192). Memelilerde en yaygın öncül olan nikotinamid, hız kısıtlayıcı enzim olan nikotinamidfosforibozil transferaz (NAMPT) ile NMN'ye (193), ikinci basamak olan NMN de NMN/NAMN adeniltransferazlar (NMNAT) ile NAD⁺'ya çevrilir (*core recycling pathway*) (190). Nikotinamid ribozid de NRK1 ve NRK2 ile NMN'ye çevrilir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. NAD⁺ oluşum yolları. NAAD: Nikotinik asit adenin dinükleotid. NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid, NADS: NAD⁺ sentetaz, NAMPT: Nikotinamid fosforiboziltransferaz, NAPRT: Nikotinik asit fosforiboziltransferaz, NAT: Nikotinamid mononükleotid adenil transferaz, NR: Nikotinamid ribozid; NRK: Nikotinamid ribozid kinaz (Okabe ve ark.'nın 2019 makalesinden uyarlanmıştır (195))

Nikotinamid ribozid kinazların keşfinden sonra (2004) pek çok alandan araştırmacı NAD⁺ metabolizmasını anlamaya ve klinik etkilerine yoğunlaşmıştır. Nikotinik asit tedavisinin terapötik dozun altında ciltte kızarma (*flushing*) gibi yan etkilere neden olması yaygın klinik kullanımını sınırlandırmaktadır (194). Çalışmaların NR'nin oral alımının insanda ve hayvan modellerinde kanda ve dokularda NAD⁺ konsantrasyonunu artırdığı, biyoyararlanımının NAM ve nikotinik asitten daha fazla olup, iyi tolere edildiğini göstermesi araştırmacıları NR'nin terapötik etkilerini araştırmaya yöneltmiştir (195). NR'nin metabolik sendrom, mitokondriyal hastalıklar, DNA tamir sendromları, AH, yağlı karaciğer, hepatik karsinom,

inflamasyon, kardiyomyopati, yaşlanma, ve yaşlanma ile ilişkili hastalıklarda etkili olduğu görülmüştür (191). Orta yaş ve yaşlı kişilerin dahil edildiği randomize kontrollü bir çalışmada 6 hafta boyunca günde 1000 mg'a kadar NR kullanımının iyi tolere edildiği ve NAD⁺ oluşumunu artırdığı gösterilmiştir (196). NR'nin oral alımı insanda hücre içi ve tam kan NAD⁺ konsantrasyonunu artırmaktadır. 52 yaşında sağlıklı bir erkeğe 1000 mg tek doz NR verilmesinin tam kan NAD⁺ düzeyini 2,7 kat artırdığı bildirilmiştir (197). Obezite dışında metabolik hastalığı olmayan kişilerin katıldığı randomize kontrollü çift kör bir çalışmada 100, 300 ve 1000 mg NR uygulandığında tam kanda NAD⁺ miktarının sırasıyla yüzde 22, 51 ve 142 oranında arttığı gösterilmiş, ciltte kızarma ya da başka bir ciddi yan etki bildirilmemiştir (198).

2.7. Alzheimer Hastalığı Modelleri

İdeal bir hayvan modelinde kullanılan bilişsel testlerin, insandaki AH'de kullanılan nöropsikolojik testlerin değerlendirdiği bilişsel alanları değerlendirmesi beklenmektedir. AH modellerinde referans bellek, çalışma belleği, tanıma belleği, asosiyatif öğrenmede bozukluklar görülebilmektedir. Referans belleğin insandaki bilişsel işlevleri tanımlamak için kullanılsa da hayvanda öğrenilmiş bir bilginin davranışsal görev boyunca değerlendirilmesini ölçtüğü için insandaki semantik belleğe yakın bir değerlendirme sağladığı düşünülür. Çalışma belleği, bir bilginin geçici bir süre zihinde tutularak davranışı yönlendirdiği bir zihinsel sürece işaret eder. Tanıma (*recognition*) belleği ise daha önce karşılaşılan nesneleri, olayları ya da kişiler tanıma yeteneğini ifade eder ve uzun süreli deklaratif belleğin bir parçasına karşılık gelir. Dil işlevlerini içeren sözel akıcılık ve sözel geri çağırma görevleri gibi AH'de bozulan bazı alanlar ise rodentlerde modellenemez (26).

Alzheimer hastalığı hayvan modellerini genetik ve genetik olmayan modeller olarak iki grupta inceleyebiliriz (199) (**Tablo 2.1**).

Tablo 2.1. Alzheimer hastalığı hayvan modelleri

A. Genetik modeller
Transgenik modeller
Homolog rekombinasyon ile oluşturulmuş modeller
B. Genetik olmayan modeller
Spontan modeller
Metabolik hastalıkların hayvan modelleri
Lezyon oluşturma modelleri
Kimyasalla indüklenmiş modeller
A β temelli modeller

2.7.1. Genetik Modeller

Transgenik modeller genetik olarak kendi genomlarının yanı sıra farklı bir türden genleri taşımak üzere tasarlanmaktadır. İlgili gen ve promotörü pronükleer enjeksiyonla zigota transfer edilir. Transgen, organizmanın genlerinden birinin farklı bir versiyonu ya da genomlarında bulunmayan bir gen olabilir. APP, tau, PSEN1 gibi yabancı bir gen farenin genomuna yerleştirilir, ve o genin ürününün ekspresyonu artırılır (200) (**Tablo 2.2**).

Homolog rekombinasyon ile oluşturulan modellerde (knock-out, knock-in modeller) ise hedef genin yerine dışarıdan eklenen gen gelir ya da silinir. CRISPR, TALEN gibi genom düzenleme teknolojileri kullanılır. APOE4 eklenmesi ya da APP, PSEN1 ve PSEN2, BACE1 genlerinin silinmesi ile oluşturulan modeller mevcuttur (201).

Tablo 2.2 Transgenik Alzheimer hastalığı modelleri

APP Transgenik	Amiloid plak birikimi görülmekte ancak nöron kaybı ve nörofibriller yumaklar gelişmemektedir. Tg2576 fareler mutant APP taşıyan ve en çok kullanılan farelerdir (202).
Tau Transgenik	AH'de görülen nörofibriller yumak patolojisinin taklidini sağlar (203).
APP/Tau İkili Transgenik	NFY patolojisinin sadece tau transgenik farelere göre daha yoğun olduğu görülmüştür. Bu bulgular A β patolojisinin tau patolosini tetiklediği lehine

	yorumlanmaktadır. APP/PS1 en sık kullanılan ikili transgenik modellerdendir (204).
APP/Tau/Presenilin Üçlü Transgenik (3XFAD)	Patolojinin gelişim sırasını göstermeye yardımcı olmuştur. Amiloid plakları takiben tau patolojisinin geliştiğini ve yoğun tau patolojisi gelişmeden kognitif bozukluğun ortaya çıkmadığını göstermiştir (205).
5XFAD	Toplam 5 farklı mutasyon oluşturulur ve daha hızlı plak oluşumu görülür (206).

2.7.2. Genetik Olmayan Modeller

Spontan Modeller

Transgenik modeller erken başlangıçlı AH'yi taklit etmektedir, ancak bu da hastaların <5'inden azını kapsamaktadır. Sürecin APP fazla üretimi ile tetiklenmediği spontan bir model hastalığın sebebini anlamada daha yol gösterici olacaktır. Özel olarak üretilen hızlandırılmış yaşlanma suşlarından biri SAMP8 (*Senescence Accelerated Prone Mouse*), erken yaşlanan, yaşam süresi kısa bir fare türünün fenotipik seçimi ve üretilmesi ile elde edilmektedir. Bu farelerde oksidatif hasar ve fazla APP üretimi, 8 ve 10. aylar arasında erken öğrenme ve bellek bozuklukları, sirkadyen ritim, immun sistem bozuklukları, nöron kaybı, sinaptik bozulma gibi diğer bulgular da görülmektedir (207).

Metabolik Hastalıkların Hayvan Modelleri

Sporadik AH'de A β birikiminin mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. Obezite, diyabet, hiperkolesterolemi gibi metabolik hastalıklar sporadik AH riskini artırmaktadır. Bu metabolik hastalıklarda A β kümelenmesi, anormal tau ve alfa sinüklein artışı görülmektedir. Bu nedenle diyetle indüklenmiş hiperkolesterolemi, insulin direnci ve tip 2 diyabetes mellitus modelleri, obezite modelleri AH'deki bazı nöropatolojik bulguları ve bilişsel işlevlerdeki değişiklikleri modellemede kullanılmaktadır (208).

Lezyon Oluşturma Modelleri

Mediyal temporal lob hasarlarının bellek sorunlarına yol açığının görülmesi üzerine geliştirilmiştir. Bilateral hipokampal veya radyofrekansla lateral internal meduller talamus hasarı yapıldığında hasarlı bölgenin uzağında nörodejenerasyon gösterilmiştir (209). Ön beynin kolinerjik bölgelerinde (nukleus bazalis) ve hipokampus gibi farklı bölgelerde lezyon oluşturulabilir (210).

Kimyasalla İndüklenmiş Modeller

Streptozosin (STZ), okadaik asit, skopolamin gibi kimyasalların farklı beyin bölgelerine enjeksiyonu ile oluşturulmaktadır. Streptozotisin, pankreastaki beta hücrelerine toksiktir. STZ ile oluşturulan diyabet modeli, insülin eksikliğinin etkilerini test etmede kullanılmaktadır. Alzheimer hastalarının beyinlerinde insulin reseptörlerinin azaldığının gösterilmesi AH'de nöronal insulin direncinin rolü olabileceğini düşündürmüştür. Ventrikül içerisine uygulanan STZ beyindeki insülin sinyalini önleyerek bilişsel işlevlerde ve LTP'de bozulmaya neden olmaktadır. ICV streptozosin uygulaması mitokondriyal işlevlerde, enerji metabolizmasında hasara, oksidatif stres ve nöroinflamasyonda artışa, insülin sinyal proteini olan GLUT1 ve GLUT3'ün aktivitesi ve ekspresyonunda azalmaya, tau fosforilasyonunda ve NFY oluşumunda artışa, kolinerjik bozukluklara neden olmaktadır (211). Bu modelden elde edilen veriler, beyindeki glukoz metabolizması ve hipokampustaki insülin sinyal anormalliklerinin, AH'de bilişsel değişikliklerden önce meydana geldiği göstermektedir (212).

A β Temelli Modeller

A β peptidlerinin farklı dozları, ICV veya intrahipokampal enjeksiyon yoluyla uygulanabilir. AH'nin tipik bulgularından olan A β birikimi taklit edilir. A β nörotoksiteyi doğrudan uyarır, bazal ön beyinde kolinerjik yıkıma, bellek ve davranış bozukluklarına neden olmaktadır. Daha hızlı modelleme imkanı olması, daha ekonomik olması, sadece A β 'nin etkisini değerlendirebilme imkanı sağlaması modelin avantajlarıdır. Stereotaksik cerrahinin hasarı ise modelin dezavantajıdır (213).

2.8. Amaç

2.8.1. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı $A\beta$ ile indüklenmiş AH modelinde nikotinamid ribozid (NR) tedavisinin bilişsel ve nöropsikiyatrik belirtilere etkisini değerlendirmektir. Bunun için bilateral lateral ventriküllerine $A\beta^{1-42}$ veya salin enjekte edilmiş sıçanlar 96 saat uykusuz bırakılarak, ilk aşamada $A\beta^{1-42}$ 'nin bilişsel ve nöropsikiyatrik belirtileri modelleyen davranış deneylerinde yol açtığı değişiklikler değerlendirilecektir. İkinci aşamada nikotinamid ribozid tedavisinin bilişsel ve davranışsal belirtilerde ne düzeyde iyileşme sağlayacağı araştırılacaktır.

2.8.2. Araştırmanın Hipotezleri

NR tedavisi, β -amiloid ile indüklenmiş ve uykusuz bırakılmış sıçan Alzheimer hastalığı modelinde bilişsel işlevlerde iyileşme sağlayacaktır.

NR tedavisi β -amiloid ile ortaya çıkarılan duygudurum değişimlerini geri döndürecektir.

Literatürde mitofajiyi indüklemenin etkileri ile ilgili çalışmalar son yıllarda artmaktadır. Ancak nikotinamid ribozid ile yapılan çalışmalar daha çok transgenik fareler üzerinde ve bilişsel işlevlere odaklanmış olup, NR'nin β -amiloid ile indüklenmiş sıçan modelindeki etkileri ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Bunun yanı sıra NR'nin, Alzheimer hastalığı modelinde ortaya çıkan depresyon, anksiyete gibi nöropsikiyatrik belirtiler üzerindeki etkisi ve bu etkilerin mekanizmaları ile ilgiliveri de bulunmamaktadır. Çalışma bu açıdan öncü çalışmalardan biri olacaktır. Bu çalışmadan elde edilen bilgiler, AH'de NPS'lerinin önlenmesi, yeni tedavi hedeflerinin bulunmasına ve tedavisine yardımcı olacaktır.

3. GEREÇLER VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Deneylerde yaklaşık 250 gram ağırlığında 8-10 haftalık erkek Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır. Sıçan seçilmesinin sebebi β -amiloid enjeksiyonu ile oluşturulmuş Alzheimer modelinin bu türde daha yaygın ve laboratuvarın tecrübesi dahilinde olmasıdır. Ek olarak çalışılması planlanan moleküler teknikler için doku miktarının fazlalığı da bir avantaj sağlamaktadır.

Uykudaki bozulmanın bilişsel işlevler ve amiloid yükü ile ilişkili olduğunun gösterilmesi (214, 215), amiloid hipotezinin beyin hücrelerinin etrafındaki interstisyel alanda yer alan $A\beta$ 'nin üretimi ve klirensi arasındaki dengesizliğin $A\beta$ kümelenmesine neden olduğunu ileri sürmesi, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve interstisyel sıvının değişiminin (glimfatik sistem) AH patogenezinde rolü olabileceğini düşündürmektedir (216). Bulgular uykusuzluğun lenfatik dolaşımı olmayan beyinde $A\beta$ 'nin interstisyel aralık aracılığı ile klirensini etkiliyor olabileceğine işaret etmekte ve bu alana ilgiyi artırmaktadır (217). Bu nedenle çalışmamızda uykusuzluğun tek doz ICV $A\beta^{1-42}$ enjeksiyonu ile indüklenen sıçan AH modelinde $A\beta$ klirensini azaltacağı öngörülerek sıçanlar ICV enjeksiyonun ertesi gününden itibaren 96 saat boyunca uykusuz bırakılmıştır.

Uyku yoksunluğu aparatından çıkarılan hayvanlara ertesi günden (6. gün) itibaren sakrifiye edilene kadar orogastrik gavaj ile 700 mg/kg NR veya %0.9'luk NaCl (salin) verilmiştir.

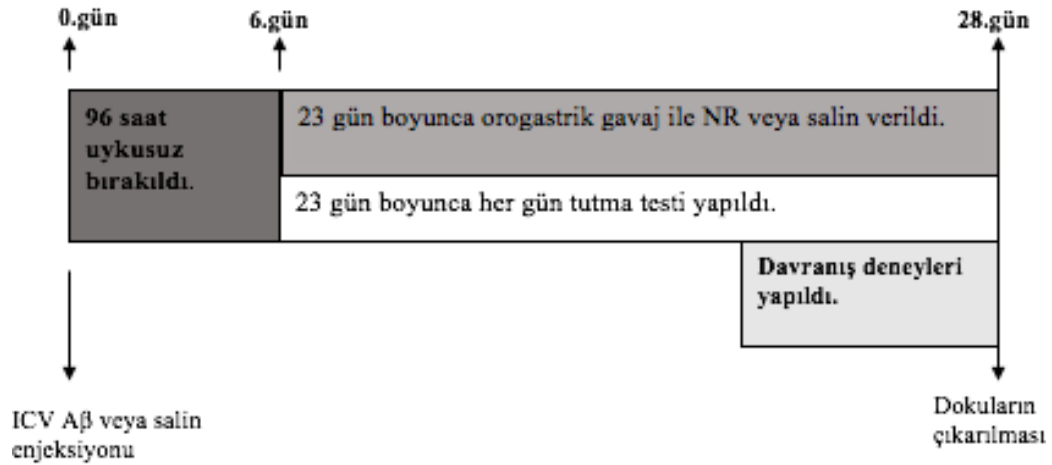
Sıçanlar, 21°C oda sıcaklığı ında 12 saat gece 12 saat gündüz (ışıklar sabah 08:00'de açılmak üzere) döngüsünde tutulan odalarda barındırılmış olup bütün sıçanların deney süresince yem ve suya erişimleri ad libitum (serbest) olarak sağ lanmıştır.

Bu çalışma için Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 30.03.2021 tarihinde 52338575-39 sayılı kararı ile onay alınmış,

deneyler Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapılmıştır (EK).

3.2. Deney Protokolü

Sıçanlar, barınağa geldikten sonra 7 gün klimatizasyon için bekletilmiş, deneye başlanan gün 0. gün olarak kaydedilmiştir. Bilateral lateral ventrikül içine amiloid β^{1-42} uygulanan (0.gün) sıçanlar enjeksiyonun ertesi günü (1. gün) uyku yoksunluğu aparatına yerleştirilerek 96 saat boyunca uykusuz bırakılmıştır. Sıçanlara uyku yoksunluğu aparatından alındıktan sonraki günden (6. gün) başlayarak orogastrik gavaj ile nikotinamid ribozid ya da %0.9'luk NaCl (salin) verilmiş ve her gün tutma testi yapılarak kaydedilmiştir, bu işlemler sıçanlar kurbanı edilene kadar 23 gün boyunca (28. günün sonuna kadar) her gün tekrarlanmıştır. Orogastrik gavajla NR ve salin verme işlemi, deneyler başlamadan önce 17 gün boyunca sürdürülmüş, davranış deneyleri sırasında da devam edilmiştir. Bu süre ilaç etkisinin görülmesi amaçlanarak, literature bakılarak saptanmıştır. Bu sürenin sonunda (23. günde) rastgele olarak gruplara davranış deneyleri yapılmaya başlanmıştır. Bir sıçan için toplam davranış deneyleri süreci 6 günde, sükröz tercih testi dışında tarif edilen şekilde en az stresliden en çok stresli olan teste doğru yapılarak tamamlanmıştır. Test sıralaması, açık alan arena testi, yükseltilmiş artı testi, T labirenti spontan alternasyon testi, Porsolt zorunlu yüzme testi, edilgen kaçınma testi ve son olarak sükröz tercih testi şeklinde yapılmıştır (**Şekil 3.1**). Yüksek fruktoz tüketiminin bipolar bozukluk benzeri davranışsal değişikliklere neden olabildiğinin gösterilmesi (218) nedeniyle, sükröz tüketiminin depresyon benzeri davranış testlerini etkileme olasılığını ortadan kaldırmak için bu test az stresli bir test olmasına karşın en sonda uygulanmıştır.



Şekil 3.1. Deney protokolü

Sıçanlar rastgele 3 gruba ayrılarak protokole dahil edilmiştir (**Tablo 3.1**).

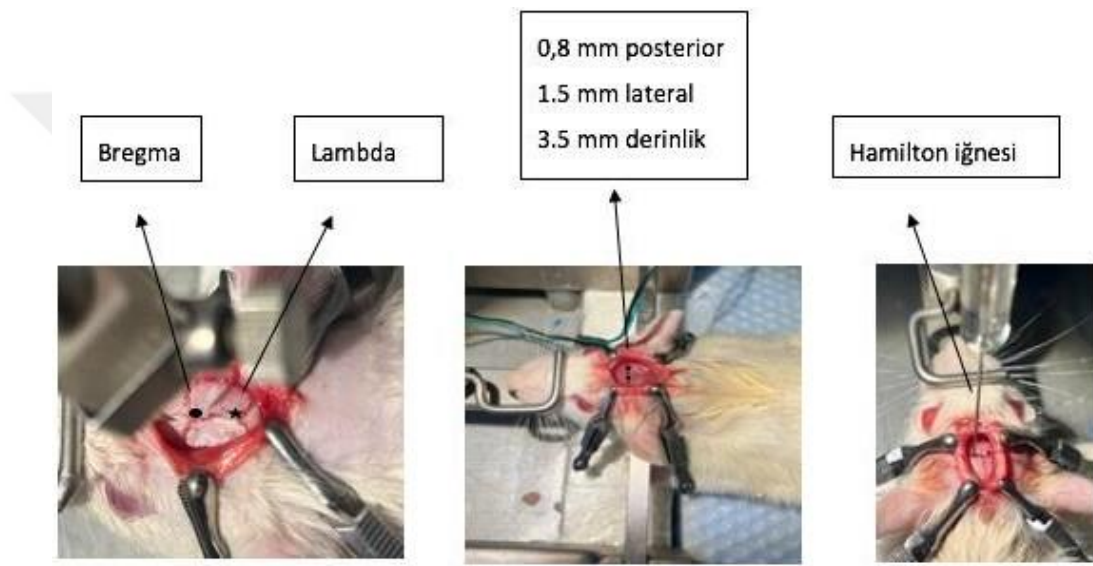
Tablo 3.1. Deney grupları

Gruplar	Uyku Yoksunluğu	ICV A β	ICV salin	NR (gavaj)	Salin (gavaj)
1.Kontrol	+	-	+	-	+
2.A β	+	+	-	-	+
3.A β +NR	+	+	-	+	-

3.3. Amiloid β enjeksiyonu ile sıçanda Alzheimer modeli oluşturulması

Deneye alınmalarının 0. gününde sıçanlar ketamin (90 mg/kg) ve ksilazin (10mg/kg) ile anesteziye edilerek stereotaksik çerçeveye yerleştirilmiştir. A β^{1-42} (Sigma-Aldrich), % 0.9 NaCl içerisinde 100 μ g/100 μ l olacak şekilde çözündürülerek -20°C’de saklanmıştır (219). ICV A β^{1-42} enjeksiyonu için anestezi altındaki sıçanın kafası cerrahi prosedür için tıraş edilmiş ve asepsi prosedürlerine tabi tutulmuştur, ardından orta hattın bir cilt kesisi açılmıştır. Sonrasında Paxinos atlasına göre bregmanın 0,8 mm gerisine, sagittal sütürün 1,5 mm laterale ve beyin yüzeyinin 4

mm derinine bilateral olarak her iki lateral ventriküle A β 1-42 enjekte edilmiştir (**Şekil 3.2**). Enjeksiyonlar 10 μ l'lik bir Hamilton iğnesi ile dakikada 1 μ l olacak şekilde 5 dakika boyunca 5 μ l A β 1-42 veya aynı miktarda % 0.09 NaCl olarak yapılmıştır (220). Mikroenjeksiyon iğnesi sıvının geri kaçışını önlemek için 5 dakika daha çıkarılmayarak beklenmiştir. Bu sürenin sonunda iğne yavaşça çıkarılmış ve karşı tarafın enjeksiyonu da aynı şekilde yapılmıştır. Kesi 4.0 cerrahi suture atılarak kapatılmış, 10. günde dikişler alınmıştır. Dikişlerin alınmasının ardından hayvanların kafesleri birleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Ventrikül içerisine amiloid enjeksiyonu ile model oluşturulması

3.4. Nikotinamid Ribozid Uygulaması

NR Chloride (part: ASB-00014339-100, lot: 40C910-21203-62) ChromaDex firmasından hediye olarak temin edilmiştir. NR Chloride %0,9'luk NaCl içerisinde 1 gr NR/2ml saline olacak şekilde çözündürülerek +4 °C'de saklanmış, her gün tartılan deney grubundaki sıçanlara 23 gün boyunca 700 mg/kg/gün dozda orogastrik gavaj yoluyla uygulanmıştır (**Şekil 3.3**). Bu doz literatürde sıçanlarda 1200 mg/gün doza kadar NR kullanımının güvenli olduğunun gösterilmesi nedeniyle seçilmiştir (221).

Kontrol ve A β gruplarına 700 mg/kg/gün dozda % 0.9 NaCl orogastrik gavaj ile 23 gün boyunca uygulanmıştır.



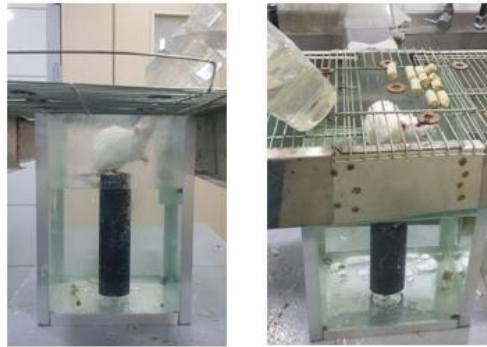
Şekil 3.3. Orogastrik gavaj uygulanması

3.5. Uyku Yoksunluğu Oluşturulması

Sıçanlar 0. günde yapılan ICV A β^{1-42} enjeksiyonunun ertesi günü uyku yoksunluğu aparatına yerleştirilerek 96. saatin sonunda her biri ayrı kafeste olacak şekilde kafeslere alınmışlardır.

Tabanı kare şeklindeki, bir kenarı 26.5 cm olan, yüksekliği 36.5 cm olan kare prizma şeklinde cam kabın içerisine yarı çapı 3 cm ve yüksekliği 25 cm olan bir silindir oturtulmuştur. Kare prizma şeklindeki cam kap 23 cm yüksekliğe kadar 34°C sıcaklığındaki su ile doldurularak sıçan silindirin üst kısmına konulmuştur (**Şekil 3.4**). Sıçanın kaçmaması için aparatın üstü bir tel kafes ile kapatılmıştır. Sıçanlara uyku yoksunluğu aparatında oldukları süre boyunca *ad libitum* su ve yemek sağlanmıştır .

Bu yöntemle temel olarak REM uyku yoksunluğunun modellenmesi hedeflenmektedir. REM uykusu sırasında kas tonusu kaybı olan sıçanlar suya düşecekleri için silindir üzerinde uyusalar dahi REM uyku fazına geçemeyecekleri düşünülmektedir (222).



Şekil 3.4. Uyku yoksunluğu aparatı

3.6. Davranışsal Testler

Sıçanlar (ICV A β^{1-42} veya salin enjekte edilmiş), 96 saat uyku deprivasyonu aparatında kaldıktan sonra 18 gün boyunca her gün orogastrik gavaj yoluyla NR veya salin uygulamasını takiben davranış deneylerine tabi tutulmuşlardır. Davranış deneylerinin uygulanması sırasında da sıçanlara gavaj uygulaması devam ederek toplam 23 güne tamamlanmıştır. Sıçanların 0. günde ve orogastrik gavaj uygulanan günler boyunca ağırlıkları tartılarak kaydedilmiş ve tutma testi uygulanmıştır.

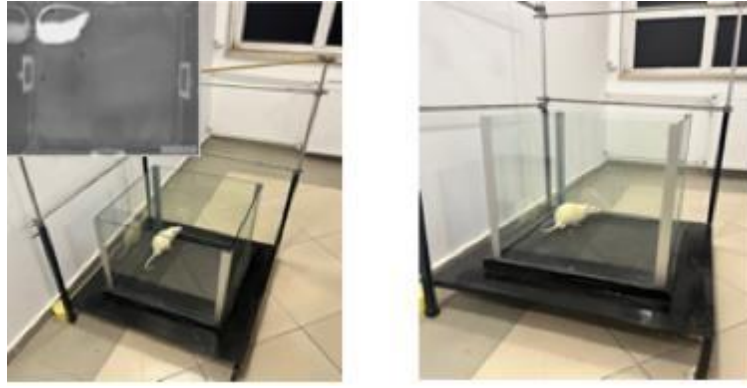
3.6.1. Tutma Testi

Alzheimer hastalarında görülen agresyon hem hastalar hem de bakımverenler açısından zorlayıcıdır (223). Birçok AH modelinde agresyon davranışı modellenenilmektedir (224, 225, 226) . Agresyonu değerlendirmek için kullanılan bu testte her seferinde aynı eldivenle tutulan sıçanların agresyon düzeyleri günlük olarak kaydedilmiştir (227). Sıçanların tutmaya verdiği yanıtlar 0 ile 4 arasında bir değer alacak şekilde aşağıdaki gibi puanlanmıştır.

- 0 – Sıçan tutmaya izin verir ve kaçmak için herhangi bir çabası olmaz.
- 1 – Tutmaya izin verir fakat kaçmaya çalışır.
- 2 – Elden uzağa kaçar ve yakalanmaktan kurtulmaya çalışır
- 3– Ellenmekten aktif olarak kaçar ve tutulduğu zaman çığlık atar, ağzını açar veya ısırır.
- 4– Ellenmeye izin vermez ve yüksek sesle çığlıklar atarak ele saldırır.

3.6.2. Açık Alan Arena Testi

Test sıçanların genel lokomotor aktiviteleri ve anksiyete ile ilişkili davranışlarının değerlendirilmesini amaçlar (228). Bir kenarı 45 cm olan kare camlardan oluşan üstü açık bir küp deney düzeneği olarak kullanılmıştır (**Şekil 3.5**). Yüzü hep aynı tarafa dönük olacak şekilde bırakılan sıçan siyah zemin üzerinde 60 dakika boyunca ANY-Maze video takip sistemi ile kaydedilmiştir. Sıçanın bu sürede aldığı toplam yol, ortalama hızı, alttaki kare platforma göre alanın merkezinde ve periferinde geçirdiği süreler ve rotasyon parametreleri değerlendirilmiştir. Testte değerlendirilen asıl parametre merkezde geçirilen süredir, merkezde geçirilen sürenin uzunluğu anksiyete benzeri davranışın düşük olduğuna işaret etmektedir.



Şekil 3.5. Açık alan arena testi

3.6.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Bu test sıçanların anksiyete ile ilişkili davranışlarını değerlendirmeyi amaçlamaktadır (229). Karşılıklı iki kolu açık ve karşılıklı iki kolu kapalı, artı şeklinde birbirlerine dik dört koldan oluşan siyah renkli platform kullanılmıştır. Kolların eni 15 cm, boyu 45 cm, kapalı kolların yukarı doğru duvar yüksekliği ise 40 cm'dir (**Şekil 3.6**). Platform yerden bir metre yüksekliğe konumlandırılmıştır. Sıçanlar yüzleri açık kollardan birine dönük olacak şekilde platforma bırakılmış ve 5 dakika süreyle ANY-Maze video takip sistemi ile hareketleri kaydedilmiştir. Açık kollarda bulunduğu süre, bu kollarda aldığı 1 yol ve açık olan kollara geçme sayısı kaydedilerek anksiyete ile ilişkili duygudurum değerlendirilmiştir. Anksiyete benzeri davranış arttıkça açık kolda geçirilen sürenin kısaldığı düşünülmektedir.



Şekil 3.6. Yükseltilmiş artı labirent testi

3.6.4. T Labirenti Spontan Alternasyon Testi

Mekansal öğrenme ve belleği, keşfetme davranışını test eder. Sıçanlar doğaları gereği bulundukları yerden yeni bir yeri keşfetmeye meyillidirler. Hipokampus, bazal ön beyin ve prefrontal korteks gibi beyin bölgeleri bu görevde yer alır. T şeklindeki labirentin her bir kolunun başında dikey sürgülü geçit bulunmaktadır. Başlangıçta

sadece sıçanın konulacağı kolun ucuna dikey sürgülü geçit kapatılır, diğer geçitler açık bırakılır. Sıçan kola yerleştirildikten sonra geçit açılır ve sıçanın sağ ya da sol koldan hangisini tercih edeceği not edilir. Sağlıklı hayvanların daha önce tercih ettikleri tarafı bir sonraki denemede daha az tercih etmeleri beklenir. Buna ‘spontan alternasyon’ denir. Alternasyon çalışma belleği işlevleri ile ilişkilidir (230). Testin hipokampal işlev bozukluğunu Morris su tankı testinden daha iyi yordadığı düşünülmektedir (231,232, 233, 234). Yerden 50 cm yükseklikte T şeklinde bir platformdan oluşur. Platformdaki kapalı labirentlerin yüksekliği 30 cm, eni 15 cm, boyu 40 cm’dir (**Şekil 3.7**).

Sıçan 90 sn içerisinde kollardan birini seçmezse yönlendirici olmayacak şekilde dokunulur, eğer hayvan hala bir tarafı tercih etmemişse kafesine alınır, daha sonra tekrar başlangıç noktasına konur. Sıçan bir kolu tercih ederse, o kolu keşfetmesi için kolun girişindeki dikey kapı kapatılarak sıçanın 30 sn süre ile kolu keşfetmesi beklenir. Daha sonra alınarak kafesine konur ve orada da 30 sn bekletilir. Sıçanın hangi kolu kaç kez ziyaret ettiği not edilir. Tüm bu seçim işlemi hayvan toplam 14 seçim yapana kadar devam ettirilir ve alterne ettiği seçimlerin tüm seçimlere oranı hesaplanır.

Hipokampal lezyonu olan hayvanların bir tarafı daha çok tercih ettikleri ve skorun % 50’nin altında olduğu görülmüştür (230).

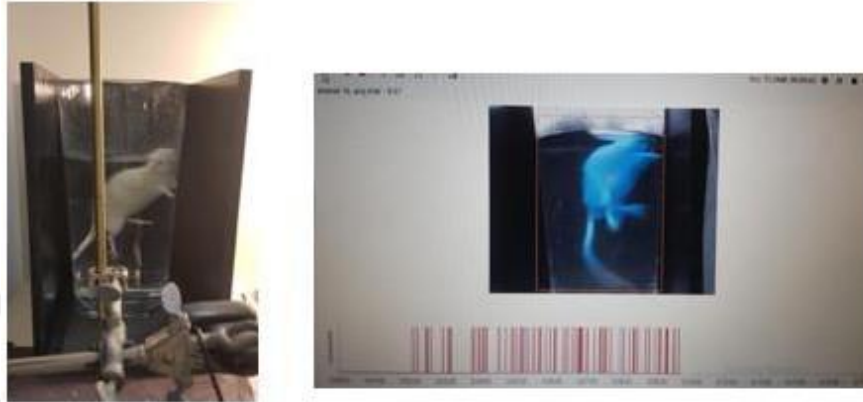


Şekil 3.7. T labirenti spontan alternasyon testi

3.6.5. Porsolt Zorunlu Yüzme Testi

Bu test sıçanların depresyon benzeri duygudurumlarını değerlendirmek için kullanılmıştır (235). Test aparatı üstü açık cam bir silindir şeklinde olup yarıçapı 10 cm, yüksekliği 60 cm’dir. İçi 40 cm yüksekliğe kadar 21⁰C sıcaklıkta su ile doldurulmuştur (**Şekil 3.8**). Test iki aşamadan oluşmakta olup, ilk aşamanın amacı sıçanların silindir şeklindeki aparattan kaçamayacaklarını öğrenmeleridir. Bu ilk aşamada sıçan 15 dakika boyunca silindirde yüzdürülmüştür. Bu aşamadan 24 saat sonra uygulanacak ikinci aşamada ise sıçan 5 dakika yüzdürülmüştür. Bir öğrenilmiş

çaresizlik modeli olan bu testte stres ile tetiklenen depresyon benzeri duygudurumun göstergesi olarak toplam hareketsiz (immobil) kalma süreleri ve immobilité epizod sayıları ölçülmüştür. Depresif duygudurum arttıkça immobil kalma süreleri uzamaktadır. Sıçan görüntüleri ANY-Maze video-takip sistemi ile kaydedilmiştir.



Şekil 3.8. Zorunlu yüzme testi

3.6.6. Edilgen Kaçınma Testi

Bu test sıçanların öğrenme ve bellek işlevlerinin değerlendirilmesi için kullanılmaktadır (236). Test için birbirlerine 9 cm genişliğinde dikey sürgülü bir kapı ile bağlanan aydınlık (26x30 cm) ve karanlık (26x30 cm) iki farklı kompartmandan oluşan platform (52x30 cm) kullanılmıştır. Sıçanlar doğaları gereği karanlık kompartmana geçmek isteyeceklerdir. Platformun tabanı 15 mm aralıklarla yerleştirilmiş paslanmaz çelik çubuklardan oluşur. Karanlık alana geçen sıçana tabandaki çelik çubuklar aracılığıyla 3 saniye boyunca, 1 mA amplitüdünde, 50 Hz frekansında elektrik şoku verilmiştir. Test üç fazdan oluşmaktadır. İlk fazda sıçan aydınlık kompartmana konularak kompartmanlar arasındaki kapı açılıp sıçanın platformu keşfetmesi beklenmiştir. Sıçan karanlık kompartmana geçer geçmez aradaki dikey sürgülü kapı kapatılarak sıçanın karanlık kompartmana geçene kadar geçirdiği süre kaydedilmiştir. Sıçan karanlık kompartmandan alınarak ilk faz tamamlanmıştır. İlk fazdan 5 dakika sonra ikinci faz gerçekleştirilmiştir. İkinci fazda ilk fazdan farklı olarak sıçan karanlık kompartmana geçince tabandaki çelik çubuklar aracılığıyla elektrik şoku verilmiştir. Şokun ardından ikinci aşama sonlandırılarak sıçan kafesine götürülmüştür. İkinci fazdan 24 saat sonra hayvanın belleğini test etmek için üçüncü ve son faz gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada aydınlık kompartmana bırakılan sıçanın karanlık kompartmana ne kadar sürede geçtiği kaydedilmiş, ancak sıçan 300 saniye

sonunda karanlık kompartmana geçmemişse test tamamlanmıştır (**Şekil 3.9**). Uzun süreli belleği daha kötü olan sıçanların karanlık platforma geçiş süreleri kısalmaktadır.



Şekil 3.9. Edilgen kaçınma testi

3.6.7. Sukroz Tercih Testi

Test ile sıçanlardaki anhedoni davranışını değerlendirmek amaçlanmıştır. Test iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada sıçanlar 2 saat süreyle %2 (ağırlık/hacim)'lik sukroz çözeltisi ile tanıştırılırlar. Kafesin sağ tarafına musluk suyu, sol tarafına sükroz çözeltisi konur. Tüm sıçanların sükroz çözeltisinin tadına baktığından emin olunur. Tanıştırma aşamasından 1 hafta sonra sıçanların su kaplarına 12 saat süre ile (20:00-08:00) %2'lik sükroz çözeltisi ve musluk suyu konur. Su ve sükroz çözeltisi içeren şişeler deney öncesi tartılarak ağırlıkları kaydedilir. Deney sonunda şişelerin ağırlıkları tekrar tartılır ve aradaki fark her bir sıçan için 'tüketilen su miktarı' ve 'tüketilen sükroz çözeltisi miktarı' olarak kaydedilir. Depresyon benzeri davranışı olansıçanlar, sükroz çözeltisini daha az tercih etmektedir. Her bir hayvan için sükroz tercih yüzdeleri aşağıdaki formülle hesaplanır (237).

$$\text{Sükroz Tercih Yüzdesi (\%)} = \frac{\text{Tüketilen sükroz çözeltisi miktarı}}{\text{Tüketilen su miktarı} + \text{Tüketilen sükroz çözeltisi miktarı}} \times 100$$

3.7. Sakrifikasyon ve Dokuların Çıkarılması

Sıçanlar periton içine uygulanan % 25 (ağırlık/hacim)'lik 1.4 gr/kg sıçan dozunda ürethan anestezisi altında hızlıca dekapite edilerek sakrifiye edilmiştir. Tüm beyin izole edilerek soğuk %0,9 NaCl çözeltisine konulmuştur. Soğuk NaCl

çözeltisinde bekleyen beyinler ileri diseksiyon için buz üzerindeki plakaya konulmuştur. İlk olarak, serebellum nazikçe çıkarılmıştır. Daha sonra iki serebral hemisferi birbirinden ayırmak için orta hat kesi yapılmıştır. Korpus kallozumun önünden yapılan kesi ile frontal korteks ayrılmıştır. Frontal korteks kesitlerinden prefrontal korteks izole edilmiştir (238). Ardından hipokampus rostral kısmından bağlanarak tek parça olarak izole edilmiş ve ventral ve rostral olarak ikiye bölünmüştür. Amigdala diseksiyonu için ise hipokampusu çıkarılan doku kesiti lateral yüzeyine yatırılarak 80 mg'lık doku izolasyonu olarak yapılmıştır (239). Dokuların hasarlanmadan diseksiyonu için iki adet kör plastik alet kullanılmıştır. Diğer hemisfer için de aynı yöntemler izlenmiştir. Dekapitasyondan tüm dokuların çıkarılmasına kadar olan tüm diseksiyon hızlıca yapılmaya çalışarak 2 dakikayı geçmemesi sağlanmıştır. Hipokampus (ventral ve dorsal), amigdala, prefrontal korteks dokularının ağırlıkları protein izolasyonu protokolü için tartılmıştır.

3.7.1. Protein İzolasyonu

Dokular ticari olarak satın alınan, proteaz inhibitörü ve fosfataz inhibitörü içeren RIPA tamponuna (Santa Cruz Biotechnology, sc-24948A, lot: A2822) bir gram doku için 3 ml RIPA olacak şekilde eklenmiştir. Homojenizatör (Sonoplus mini 20, Bandelin, Almanya) ile homojenizasyon sağlanmıştır. Daha sonra 30 dk boyuncabuzda inkübe edilen homojenatlar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de $10.000\times g$ de 20 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında pelet atılarak süpernatant sonraki deneylerde total protein olarak kullanılmak üzere alikotlanarak -80°C 'ye kaldırılmıştır.

3.8. İstatistiksel Analizler

Verilerin analizinde GraphPad Prism (GraphPad Software, ABD) yazılımı kullanılmıştır. Bulgular aritmetik ortalama $\pm$ standart hata (SEM) ile belirtilmiştir. Grupların normallik analizi Kolmogorov-Smirnov testi ile yapılmıştır. Gruplar arasındaki farkları araştırmak için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* analiz için *Tukey* testi kullanılmıştır. Vücut ağırlığı ve tutma testinin analizinde tekrarlayan ölçümler için iki yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak *Tukey* testi kullanılmıştır. Hesaplanan p değerleri 0,05'den küçük olduğunda farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Deney Hayvanları

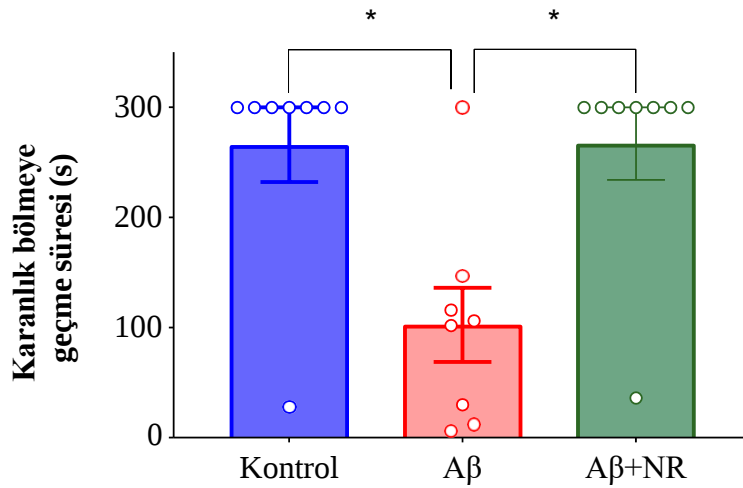
Her ü ç gruptaki hayvanların çalışmanın başlangıcında benzer ağırlıkta ve aynı yaşta olmasına dikkat edildi. Deneyleri tamamlayarak analize dahil edilen tüm hayvanlar hareketli ve sağlıklıydı. A β grubundan bir hayvanda intraperitoneal anestezi madde enjeksiyonu sonrasında enjeksiyon bölgesinde lokal cilt enfeksiyonu saptandı, antibiyoterapi verilmedi. İzleminin 12. gününde yaranın kapandığı görüldü. Kontrol ve A β +NR gruplarından birer hayvanda orogastrik gavaj uygulaması sırasında akciğer hasarı gelişti, sakrifiye edildi. İzlem süresince tedavi ile ilişkili olabilecek bir yan etki gözlenmedi.

Hayvanlar sakrifikasyon sırasında gözle görülebilecek patolojiler (kitle vb.) açısından incelendi, kaba değerlendirmede bir anomali saptanmadı.

4.2. Davranış Deneyleri Bulguları

4.2.1. Edilgen Kaçınma Testi

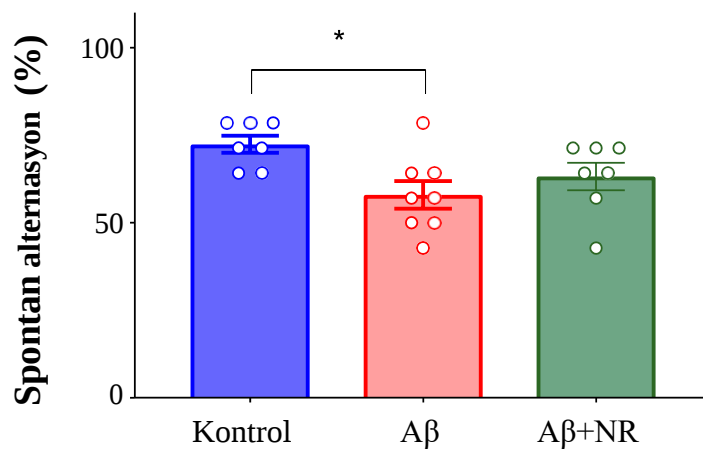
Test asosiyatif bellek performansının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Test fazında karanlık bölmeye geçme süresi kontrol grubunda 266 ± 34 s (n=8), A β grubunda $102,4 \pm 33,8$ s (n=8) ve A β +NR grubunda ise 267 ± 33 s (n=8)'ydi. Karanlık bölmeye geçme süresi hem kontrol grubunda hem de A β +NR grubunda A β grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede uzun bulundu ($F(2,21)=7.9$; $p=0,003$). Kontrol ve A β +NR gruplarında sadece 1 hayvan karanlık bölmeye geçti, A β grubunda ise sadece 1 hayvan karanlık bölmeye geçmedi (**Şekil 4.1**).



Şekil 4.1. Sıçanların edilgen kaçınma testinde karanlık bölmeye geçme süreleri. Hem kontrol grubunda hem de Aβ+NR grubunda karanlık bölmeye geçme süresi Aβ grubuna göre daha uzundu (n=7-8/grup). *p<0,05, tek yönlü ANOVA, post hoc Tukey testi. Kontrol ICV salin, gavajla salin. Aβ ICV Aβ, gavajla salin. Aβ+NR ICV Aβ, gavajla NR.

4.2.2. T Labirenti Spontan Alternasyon Testi

Test mekansal öğrenme ve belleğin, keşfetme davranışının değerlendirilmesinde kullanılan, çalışma belleği işlevleri ile ilişkili bir testtir. Kontrol grubunda spontan alternasyon yüzdesi $72,4 \pm 2,4$ (n=7) iken, Aβ grubunda $58 \pm 3,9$ (n=8), Aβ+NR grubunda ise $63,2 \pm 3,9$ (n=7)'du. Aβ grubunda kontrol grubuna göre spontan alternasyon yüzdesi istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($F(2,19) = 4.2$, $p = 0,03$) (Şekil 4.2). Diğer gruplar arasında fark saptanmadı.

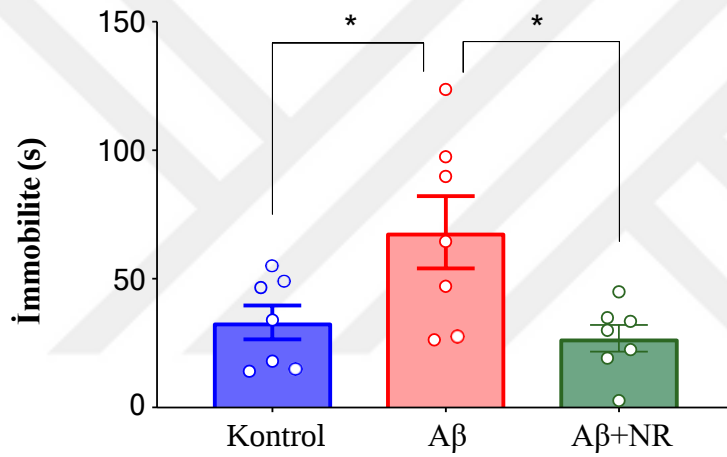


Şekil 4.2. Sıçanlarda T labirenti testinin sonuçları. Aβ grubunun alternasyonu (%) kontrol grubuna göre daha düşük saptandı. (n=7-8/grup). *p<0,05, tek yönlü

ANOVA, post hoc Tukey testi. Kontrol:ICV salin, gavajla salin. A β :ICV A β , gavajla salin. A β +NR:ICV A β , gavajla NR.

4.2.3. Porsolt Zorunlu Yüzme Testi

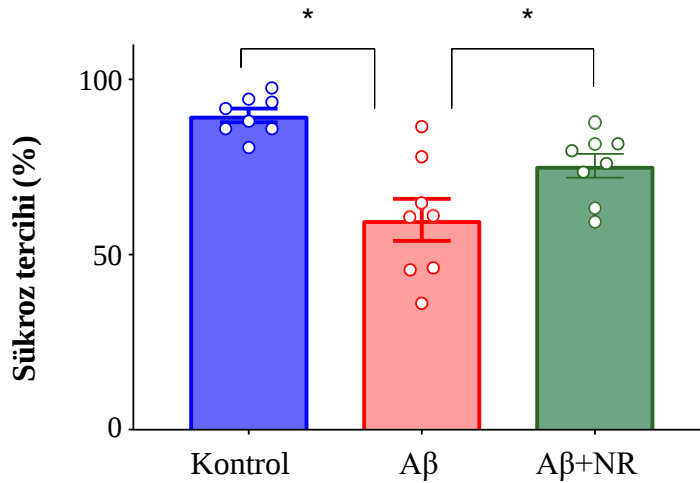
Test sıçanların depresyon benzeri duygudurumunun değ erlendirilmesinde kullanılmaktadır. Test aş amasında, kontrol grubunun ortalama immobilité sü resi 33,1±6,6 s (n=7)'ydi. A β grubunda ortalama immobilité süresi 68,1±14 s (n=7), A β +NR grubunda ise ortalama immobilité süresi 26,9±5,1 s (n=7)'ydi. A β grubunda immobilité süresi kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı derecede yüksektir. A β +NR grubunda ise immobilité süresi A β grubundan istatistiki olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (F (2,18) =5.54; p=0,01) (**Ş ekil 4.3**).



Ş ekil 4.3. Sıçanlarda Porsolt zorunlu yüzme testinde hareketsizlik (immobilité) süreleri. A β grubunda immobilité süresi kontrol grubuna göre yüksekti. A β +NR grubunda ise immobilité süresi A β grubuna göre düşüktü. (n=7/grup). *p<0,05, tek yö nlü ANOVA, post hoc Tukey testi. Kontrol: ICV salin, gavajla salin. A β ICV A β , gavajla salin. A β +NR: ICV A β , gavajla NR.

4.2.4. Sükroz Tercih testi

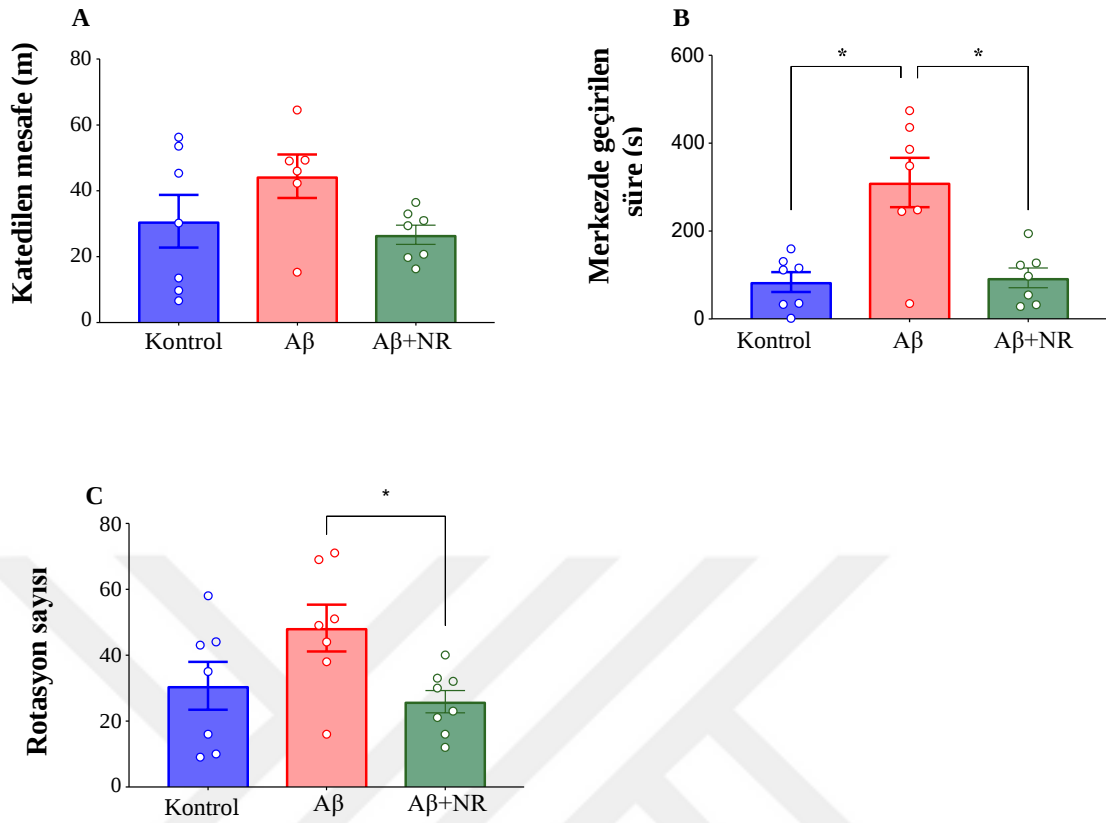
Test anhedoni değ erlendirmesinde kullanılmaktadır. Kontrol grubunda sükroz tercih yüzdesi 89,7±2 (n=8), A β grubunda 59,9±6 (n=8), A β +NR grubunda ise 75,4±3,4 (n=8)'tü. A β grubunda sükroz tercihi hem kontrol grubuna hem de A β +NR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu (F(2,2)=12.9; p=0,0002) (**Ş ekil 4.4**).



Şekil 4.4. Sıçanlarda sükroz tercih testinin sonuçları. Aβ grubunda sükroz tercihi hem kontrol grubundan hem de Aβ+NR grubundan daha düşüktü (n=8/grup). *p<0,05, tek yönlü ANOVA, post hoc Tukey testi. Kontrol: ICV salin, gavajla salin. Aβ: ICV Aβ, gavajla salin. Aβ+NR: ICV Aβ, gavajla NR.

4.2.5. Açık Alan Arena testi

Test sıçanların spontan lokomasyonlarının ve anksiyete benzeri davranışlarının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Testte katedilen toplam mesafe kontrol grubunda $30,8 \pm 8,0$ m (n=7), Aβ grubunda $44,4 \pm 6,6$ m (n=7), Aβ+NR grubunda $26,7 \pm 2,9$ m (n=7) idi (F (2,17) = 2.13; p=0,15) (**Şekil 4.5. A**). Merkezde geçirilen süre kontrol grubunda $84,1 \pm 22,5$ s, Aβ grubunda $310,5 \pm 56,4$ s, Aβ+NR grubunda $93,7 \pm 22,7$ saniyeydi. Kontrol grubunda ve NR tedavisi verilen Aβ grubunda (Aβ+NR) merkezde geçirilen süre Aβ grubuna göre istatistiki olarak anlamlı derecede düşüktü (F (2,2) = 11.7; p=0.0006) (**Şekil 4.5. B**). Kontrol grubunda rotasyon sayısı $30,7 \pm 7,2$, Aβ grubunda $48,3 \pm 7,1$, Aβ+NR grubunda $25,9 \pm 3,3$ 'tü. Aβ+NR grubunda toplam rotasyon sayısı Aβ grubuna göre istatistiki olarak anlamlı derecede düşüktü (F (2,2) = 3,9; p = 0,04) (**Şekil 4.5. C**).

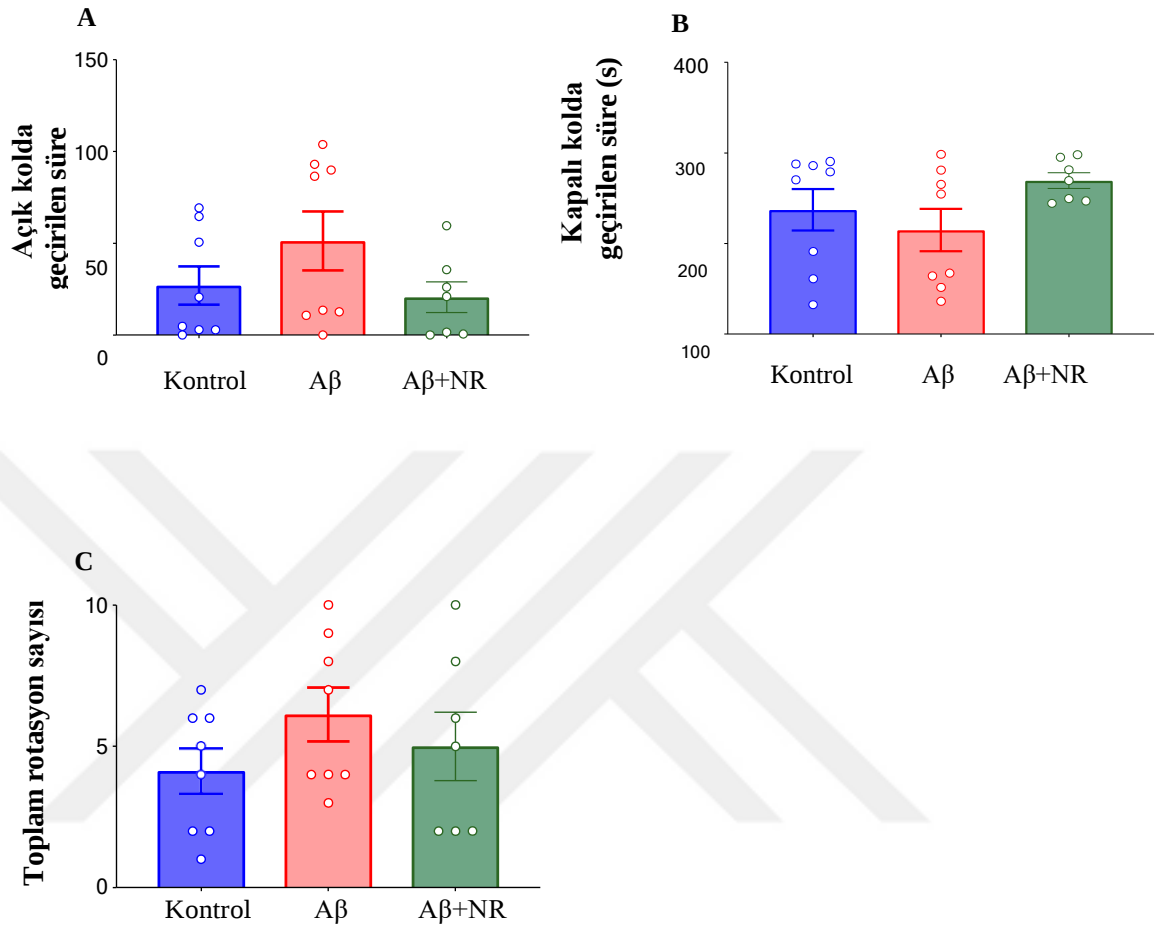


Şekil 4.5. Sıçanlarda açık alan arena testinin sonuçları **A.** Grupların toplam katettikleri mesafe benzerdi. **B.** Aβ grubunda merkezde geçirilen süre (s) kontrol ve Aβ+NR grubuna göre daha fazlaydı. **C.** NR verilen Aβ grubunda (Aβ+NR) rotasyon sayısı Aβ grubuna göre daha düşüktü. (n=7). *p<0,05, tek yönlü ANOVA, post hoc Tukey testi. Kontrol: ICV salin, gavajla salin. Aβ: ICV Aβ, gavajla salin. Aβ+NR: ICV Aβ, gavajla NR.

4.2.6. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Test sıçanların anksiyete benzeri davranışlarının değ erlendirilmesinde kullanılmaktadır. Açık kolda geçirilen sü re kontrol grubunda 26.9 ± 10.5 s (n=8), Aβ grubunda 51.3 ± 16 s (n=8), Aβ+NR grubunda ise 20.6 ± 8.4 s (n=8) idi, gruplar arasında fark saptanmadı ($F(2,20)=1.71$; $p=0.2$) (**Şekil 4.6. A**). Kontrol grubunda kapalı kolda geçirilen sü re 237.3 ± 22.9 s, Aβ grubunda bu sü re 214.8 ± 23.3 s, Aβ+NR grubunda 269.3 ± 8.7 s idi, gruplar arasında fark saptanmadı ($F(2,20)=1.6$; $p=0.23$). Toplam rotasyon sayısı (saat yönünde ve saat yönünün tersi yönde) kontrol grubunda 4.1 ± 0.8 , Aβ grubunda 6.1 ± 0.9 , Aβ+NR grubunda ise 5 ± 1.2 idi, gruplar arasında fark saptanmadı ($F(2,20)=1.1$; $p=0.35$). Gruplar arasında yükseltilmiş artı testi ile değ erlendirilen anksiyete benzeri davranışlar açısından istatistiksel olarak anlamlı fark

saptanmamıştır ($F(2,20)=1.77;p=0,35$).



Şekil 4.6. Sıçanlarda yü kseltilmiş artı testinin sonuçları. **A.** Sıçanların açık kolda geçirdikleri süre (s) benzerdi. **B.** Sıçanların kapalı kolda geçirdikleri süre benzerdi. **C.** Gruplar arasında toplam rotasyon sayısı benzerdi. (n=7-8/grup). Kontrol: ICV salin, gavajla salin. Aβ: ICV Aβ, gavajla salin. Aβ+NR: ICV Aβ, gavajla NR.

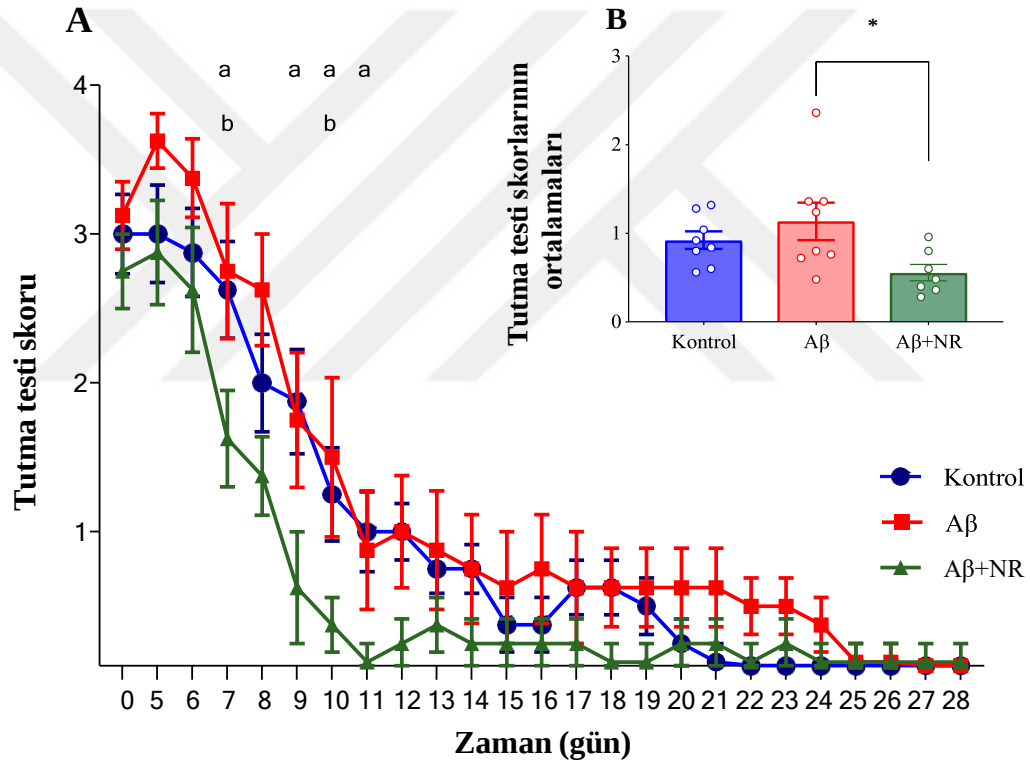
4.2.7. Tutma testi

Test sıçanların agresyon benzeri davranışlarını değerlendirmek için kullanılmıştır. Sıfırıncı günde kontrol grubunda ortalama tutma testi skoru $3 \pm 0,3$ (n=7), Aβ grubunda $3,1 \pm 0,2$ (n=8), Aβ+NR grubunda ise $2,8 \pm 0,3$ (n=7)'tü. Gruplar başlangıçtaki ortalama tutma testi skorları açısından benzerdir ($F(2,21) = 0.6, p=0.56$).

Grupların ICV enjeksiyon uygulamasının ertesi gününden itibaren 96 saat uykusuz bırakılmaları sonrası 28 gün boyunca her gün değerlendirilen tutma testi skorlarının değişim eğrileri gösterilmiştir (**Şekil 4.7. A**). Sıçanlar 0 ve 5. günler arasındaki günlerde uykusuz bırakma aparatında olduğu için tutma testi yapılmamıştır. ICV enjeksiyonun yapıldığı gün (0. gün) başlanan tutma testine sıçanların aparattan alındıkları günden (5. gün) itibaren devam edilmiştir. NR tedavisi verilen Aβ grubunda

(A β +NR) tutma testi skoru kontrol grubuna ve A β grubuna göre daha hızlı azalmıştır. Bu azalma kontrol grubuna göre 7., 9., 10. ve 11. günlerde, A β grubuna göre ise 7. ve 10. günler arasında istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmıştır ($F(48,5) = 1.54$, $p = 0.01$). Sıçanlara her gün aynı araştırmacı tarafından, aynı saatte dokunulması nedeniyle 28 günün sonunda tüm gruplarda tutma testi skorunun 0 olduğu gözlenmiştir.

Her bir grup için tutma testi skorlarının ortalaması kontrol grubunda $0,92 \pm 0,1$, A β grubunda $1,13 \pm 0,2$ ve A β +NR grubunda ise $0,55 \pm 0,1$ bulunmuştur. A β +NR grubunda ortalama tutma testi skoru A β grubuna göre daha düşüktür ($F(2,20) = 3.76$; $p = 0,004$) (Şekil 4.7. B).



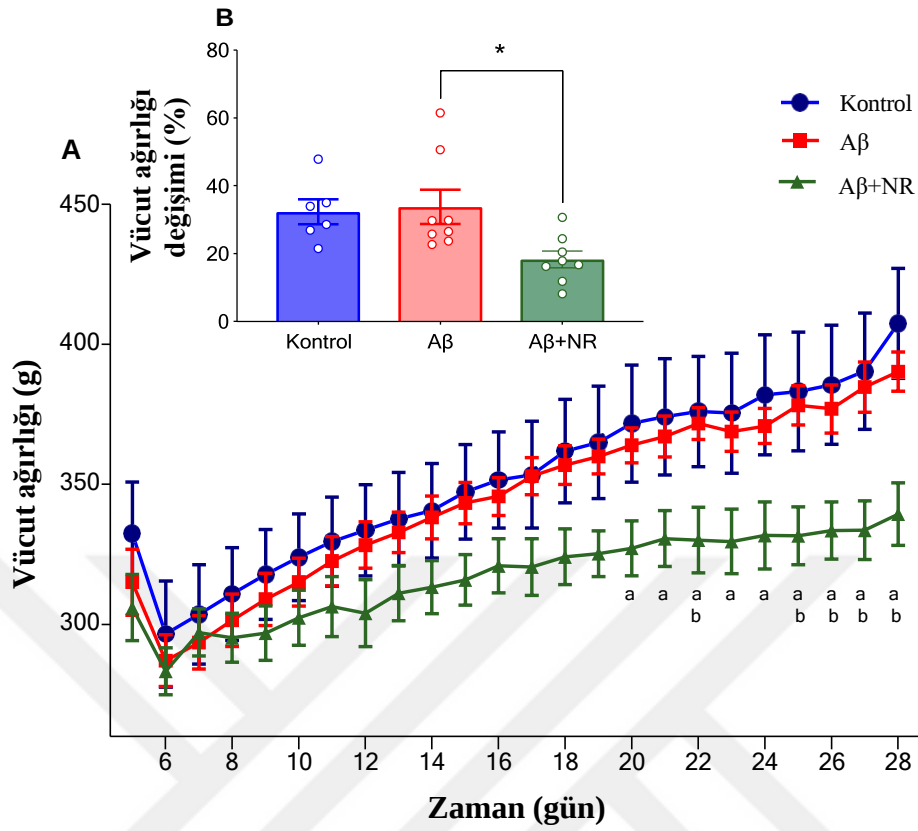
Şekil 4.7. Sıçanlarda tutma testi sonuçları. **A.** 28 gün boyunca tutma testi skorlarının takibinde A β +NR grubundaki sıçanların agresyon düzeyleri daha hızlı azaldı. **B.** A β +NR grubunda ortalama tutma testi skoru A β grubuna göre daha düşüktü ($n=7-8$ /grup). * $p < 0,05$, tek yönlü ANOVA, post hoc Tukey testi. ^a $p < 0,05$ Kontrole göre, ^b $p < 0,05$ A β grubuna göre, iki yönlü ANOVA, post hoc Tukey testi. Kontrol: ICV salin, gavajla salin. A β : ICV A β , gavajla salin. A β +NR: ICV A β , gavajla NR.

4.3. Nikotinamid ribozid tedavisinin hayvanların ağırlıkları üzerine etkileri

Sıfırıncı günde kontrol grubundaki hayvanların ortalama ağırlığı $318,1 \pm 21,3$ g ($n=7$), A β grubunda $315,1 \pm 11,8$ g ($n=8$), A β +NR grubunda $306 \pm 11,8$ g ($n=8$)'ydi. Gruplar başlangıç kiloları açısından benzerdi ($F(2,21)=0.16$, $p=0.85$). ICV enjeksiyonun ertesi gününden itibaren 96 saat uykusuz bırakılan hayvanlar 6. günden 28. güne kadar 23 gün boyunca her gün tartıldı. 6. günde kontrol grubundaki hayvanların ortalama ağırlığı kontrol grubunda $295,3 \pm 23,6$ ($n=7$), A β grubunda $287,1 \pm 9,2$ g ($n=8$), A β +NR grubunda $283,3 \pm 8,4$ g ($n=8$)'ydi. 6. günde gruplar kiloları açısından benzerdi ($F(2,21)=0.16$, $p=0.85$). Yirmisekizinci günde kontrol grubundaki hayvanların ortalama ağırlığı $353,2 \pm 6,5$ g ($n=6$), A β grubunda $344,8 \pm 6,2$ g ($n=8$), A β +NR grubunda ise $317,1 \pm 3,1$ g ($n=8$)'ydi; 28. günde A β +NR grubundaki hayvanların vücut ağırlığı kontrol ve A β grubundan daha düşüktü, bu sonuç istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($F(2,21)=6.71$, $p=0.005$).

Grupların ICV enjeksiyonu ve 96 saatlik uykusuzluk sonrası 28 gün boyunca vücut ağırlık artışı eğrileri gösterilmiştir (**Şekil 4.8. A**). A β grubunun kilo alım eğrisi kontrol grubuna benzerdi. NR tedavisi verilen A β grubunda (A β +NR) kilo alımının daha yavaş olduğu görüldü. Bu fark 20. günden itibaren kontrole göre, 22. günde ve 25. günden itibaren ise A β grubuna göre istatistiksel anlamlılığa ulaşmıştır ($F=46,44$; $p<0,0001$).

Kontrol grubunda ağırlık değişimlerinin başlangıç ağırlıklarına oranı $\%32,3 \pm 3,7$, A β grubunda $\%33,8 \pm 5,1$ ve A β +NR grubunda $\%18,3 \pm 2,5$ 'tir. A β +NR grubundaki hayvanların vücut ağırlık değişimlerinin başlangıç ağırlıklarına oranı A β grubuna kıyasla daha az artmıştır ($F(2,19)=4,95$; $p=0,02$) (**Şekil 4.8. B**).



Şekil 4.8. 28 günlük değerlendirmede Aβ ve/veya NR'nin kilo alımına etkisi. **A.** Grupların 28 gün boyunca vücut ağırlığı takibinde Aβ+NR grubundaki sıçanların kilo alımı Aβ ve kontrol grubuna göre daha yavaştı. **B.** 28 günün sonunda Aβ+NR grubunda Aβ grubuna kıyasla başlangıca göre vücut ağırlık değişimi (%) daha azdı. (n=7-8/grup). * p<0,05, tek yönlü ANOVA, post hoc Tukey testi. ^ap<0,05 Kontrole göre, ^bp<0,05 Aβ grubuna göre, iki yönlü ANOVA, post hoc Tukey testi. Kontrol: ICV salin, gavajla salin. Aβ: ICV Aβ, gavajla salin. Aβ+NR: ICV Aβ, gavajla NR.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada $A\beta^{1-42}$ ile indüklenen ve uyku yoksunluğu uygulanan sıçan AH modelinde nikotinamid ribozid (NR) tedavisinin bilişsel işlevler ve nöropsikiyatrik belirtilere etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 3 grup oluşturulmuş, bir grup kontrol grubu olarak alınmış, 2. gruptaki sıçanlara sadece AH modeli oluşturulmuş ve tedavi uygulanmamış, 3. grupta ise AH modeli oluşturulan sıçanlara NR tedavisi uygulanmış; tüm gruplara bellek işlevlerini değerlendiren testlerin yanı sıra, depresyon, anksiyete ve agresyonu değerlendiren deneyler uygulanmış ve aralarındaki farklılıklar araştırılmıştır. Bellek işlevleri edilgen kaçınma testi ve T labirenti spontan alternasyon testi ile, depresyon benzeri davranış Porsolt zorunlu yüzme testi ve sükroz tercih testi ile, anksiyete benzeri davranış ve lokomotor aktivite açık alan arena testi ve yükseltilmiş artı labirent testi ile, agresyon tutma testi ile değerlendirilmiştir.

Hayvan modellerinde daha önce yapılan çalışmalar tek doz intraserebroventriküler (ICV) $A\beta^{1-42}$ enjeksiyonunun bellek işlevlerinde bozulmaya (240, 241) ve depresyon benzeri davranışa neden olduğunu (241, 242) göstermiştir. Uyku yoksunluğunun $A\beta$ klirensini azalttığı (243, 217) interstisyel sıvı $A\beta$ düzeyini ve $A\beta$ plak oluşumunu artırdığı (244) bilinmektedir. Önceki çalışmalarda uyku yoksunluğuna maruz bırakılan sıçanlar tek doz ICV enjeksiyonundan 21 gün sonra değerlendirildiğinde depresyon benzeri davranışın gözlenmeye devam ettiği gösterilmiştir (241, 245). Bizim çalışmamızda da tek doz ICV enjeksiyonunun 28. gününde depresyon benzeri davranışın değerlendirilmesi planlandığı için bu 28 günlük süreçte $A\beta^{1-42}$ 'nin klirensini azaltmak ve modelin gücünü artırmak amacıyla sıçanlara 96 saat süreyle uyku yoksunluğu uygulanmıştır.

5.1. Alzheimer Hastalığı Hayvan Modellerinde Bilişsel Belirtiler ve Nikotinamid Ribozid Tedavisinin Etkisi

Nörobilişsel bozukluklarla seyreden hastalıklarda modelin geçerliliği için öğrenme ve bellek testlerinde bozukluğun gösterilmesi önemlidir (246). Tek doz ICV $A\beta^{1-42}$ enjeksiyonu ile oluşturulan modellerde uzaysal olmayan uzun süreli belleğin değerlendirildiği edilgen kaçınma testi ve uzaysal çalışma belleğinin değerlendirildiği

Y labirenti testinde bozulma olduğu gösterilmiştir (247, 248). Bizim çalışmamızda da tek doz ICV A β^{1-42} enjeksiyonu yapılan sıçanlarda 28. günde edilgen kaçınma testinde ve T labirenti spontan alternasyon testi ile değerlendirilen bellek işlevlerinde bozulma saptanmıştır.

Literatürde AH modellerinde NAD⁺ öncüllerinin ve NAD⁺'nın kendisinin bilişsel işlevlerde iyileşme sağladığına dair bulgular vardır. NMN'nin, tek doz ICV A β^{1-42} enjeksiyonu yapılan sıçanlarda A β ile indüklenmiş bilişsel bozulmayı azalttığı gösterilmiştir (249). TG2576 transgenik AH modeli farelere 3 ay süreyle 250 mg/kg/gün dozda NR uygulandığında yeni nesne tanıma testi ile değerlendirilen bilişsel iyileşmenin beyindeki NAD⁺ konsantrasyonunda artış ile uyumlu olduğu, NR tedavisinin A β oluşumunu önlediği gösterilmiştir (250). Hou ve arkadaşları 3xTgAD/PolB +/- transgenik AH modeli farelerde NR tedavisinin (12 mM NR içme suyuna eklenerek) Morris su tankı, Y labirenti ve yeni nesne tanıma testi ile değerlendirilen öğrenme ve bellek işlevlerini iyileştirdiği, nörojenezi artırdığı, tau fosforilasyonunu azalttığı ancak A β kümelenmesini azaltmadığını göstermiştir (251). APP/PS1 transgenik AH modeli farelerde ise NR tedavisinin (12 mM NR içme suyuna eklenerek) Morris su tankı ve Y labirenti ile değerlendirilen bilişsel işlevleri iyileştirdiği ve mitofajiye uyardığı gösterilmiştir (252). Üç ay boyunca verilen NR tedavisinin (2.5 g/kg/yiyecek) 18 aylık APP/PS1 transgenik AH modelinde A β birikimini azalttığı, kısa süreli uzaysal bellek ve bağlamsal korku belleğindeki bozulmayı iyileştirdiği saptanmış, anksiyete üzerinde etkisinin olmadığı gösterilmiştir (253). Bizim çalışmamızda da NR tedavisi tek doz ICV A β^{1-42} enjeksiyonu ile bozulan uzun süreli bellek performansını iyileştirmiş, ancak T labirenti spontan alternasyon testi ile değerlendirilen uzaysal işlem belleğinde böyle bir etki görülmemiştir.

5.2. Alzheimer Hastalığı Hayvan Modellerinde Nöropsikiyatrik Belirtiler ve Nikotinamid Ribozid Tedavisinin Etkisi

Alzheimer hastalığı hayvan modellerinde nöropsikiyatrik belirtilere olan ilgi bilişsel belirtilerden daha azdır. Yine de yaygın kullanılan modellerin bazıları bu belirtileri göstermektedir. Hayvan modellerinde görülen nöropsikiyatrik belirtiler lokomotor aktivite artışı, anksiyete, depresyon, agresyon ve sirkadyen değişikliklerdir (254). Bizim çalışmamızın alanyazına katkı sağlamasını hedeflediğimiz kısmı da, AH

modelinde ortaya çıkan nöropsikiyatrik belirtilerin NR tedavisine verdiği yanıtın değerlendirilmesidir.

Alzheimer hastalığında depresyon en sık görülen nöropsikiyatrik belirtilerdendir (255, 256). ICV $A\beta^{1-42}$ enjeksiyonunun farede (257, 258) ve sıçanda (241, 242) depresyon benzeri davranışa neden olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da tek doz ICV $A\beta^{1-42}$ enjeksiyonundan sonra yapılan zorunlu yüzme testi ve sükroz tercih testinde depresyon benzeri davranış değişiklikleri görülmüştür.

NAD^{+} 'yı indüklemenin AH'ye eşlik eden depresyonun ve preklinik modellerde $A\beta$ aracılı gelişen depresyon benzeri davranışların tedavisinde etkinliğininösterildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak major depresyon modellerinde etkili olabileceğine dair az sayıda preklinik çalışma yayınlanmıştır. Jiang ve arkadaşları iki hafta süreyle 400 mg/kg/gün oral NR tedavisinin C57BL/6J farelerde alkolle indüklenmiş depresyon benzeri davranışı azalttığını göstermiştir. Aynı zamanda bu farelerin hipokampuslarında BDNF düzeyinin anlamlı ölçüde yükseldiği, AKT/GSK3 β / β -katenin yolağının inhibisyonunun azaldığı gösterilmiştir (259). Başka bir çalışmada NMN'nin kortikosteroid ile indüklenmiş fare depresyon modelinde mitokondriyal enerji işlevlerindeki bozulmayı azaltarak antidepresan etki gösterdiği saptanmıştır (260). Bizim çalışmamızda ilk kez bir Alzheimer modelinde NR tedavisi ile NAD^{+} 'yı indüklemenin zorunlu yüzme testi ve sükroz tercih testi ile değerlendirilen depresyon benzeri davranışı iyileştirdiği gösterilmiştir.

Alzheimer hastalarına eşlik eden bir diğer nöropsikiyatrik belirti ise anksiyetedir (254). Transgenik AH modellerinde anksiyetenin arttığı (261, 262, 263), azaldığı (264, 265, 266) veya değişmediğine (267, 268, 269, 270) dair bulgular vardır. Birbirinden farklı bu bulguların nedenlerinden biri anksiyete benzeri davranışın genellikle tek bir test ile değerlendirilmesi ve bunun yetersiz yorumlamaya yol açması olabilir. Bir diğer neden ise özellikle transgenik modellerde patolojinin farklı dönemlerinde yapılan değerlendirmelerin tutarsız sonuçlara neden olabileceğidir (271). Son olarak, lokomotor aktivitede artış gibi davranışsal disinhibisyon kaynaklanan fenotipik görünümle anksiyete benzeri davranışta azalma olarak yorumlanıyor olabilir (270, 272). Literatürde AH'de en çok biriken ve preklinik modellerde en çok kullanılan $A\beta^{1-42}$ fragmanının tek doz ICV enjeksiyonu ile oluşturulan modellerde, anksiyete benzeri davranışlar gösterilemediğine ilişkin

bulgular mevcuttur (259, 260 241, 242). Bu çalışmamızda da tek doz ICV A β^{1-42} enjeksiyonu yükseltilmiş artı labirent testinde anksiyete benzeri davranışa neden olmamıştır. Ancak A β grubunda anksiyete benzeri davranışın değerlendirilmesinde kullanılan başka bir parametre olan merkezde geçirilen süre daha yüksek saptanmıştır. Bununla birlikte istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmasa da genel aktivitenin göstergesi olarak kabul edilen toplam katedilen mesafe ve rotasyon sayısı A β grubunda daha yüksek saptanmıştır. Bu durum açık alan testinde merkezde geçirilen süredeki bu artışın anksiyetede azalma yerine davranışsal disinhibisyonun bir göstergesi olabileceğini düşündürmüştür. Bu sonuçlar bazı hastalarda görülen engelleyici kontrolün kaybına (*loss of inhibitory control*) benziyor olabilir (272).

Literatürde NAD⁺'yı indüklemenin otizm spektrum bozukluğu fare modelinde (Gerasimenko) ve anksiyete bozukluğu tanısı olan üç hastanın sunulduğu bir vaka serisinde (Prousky) anksiyeteyi azalttığı bildirilmiştir. Bir çalışmada Xie ve arkadaşları APP/PS1 transgenik AH modelinde NR'nin anksiyete üzerinde etkisinin olmadığını göstermiştir (253). Bizim çalışmamızda da NR tedavisi anksiyete benzeri davranışta değişikliğe neden olmamıştır. Ancak çalışmamızda A β enjeksiyonunun anksiyetede artışa neden olmadığı da unutulmamalıdır.

Transgenik AH modellerinde sıklıkla agresyonun arttığı (254) gösterilmekle birlikte, değişmediğinin (273, 274) gösterildiği çalışmalar da vardır. Intrasebroventriküler A β enjeksiyonunun farelerde 28 günün sonunda sosyal etkileşim testi ile değerlendirilen agresyonu artırdığı gösterilmiştir (275). Tamano ve arkadaşları da 11 haftalık farelerde tek doz ICV A β^{1-42} enjeksiyonunun agresyonu artırdığını göstermiştir (276). Yeşiltepe ve ark. Wistar sıçanlara A β^{1-42} enjeksiyonu ile oluşturulan AH modelinde 21. günün sonunda tutma testi ile değerlendirilen agresyon davranışının kontrollere göre azaldığını saptamıştır (241). Bizim çalışmamızda agresyon davranışı tutma testi ile değerlendirilmiş, A β grubunda kontrollere göre fark saptanmamıştır.

Alzheimer hastalarında sık görülen NPS'lerden biri olan agresyonun kısa süreli tedavisinde FDA tarafından onaylanmış tek tedavi risperidondur (277). Ancak risperidonun agresyon üzerine etkilerinin incelendiği bir meta-analizde risperidonun etkilerinin diğer antipsikotiklerden farklı olmadığı ve agresyon üzerine zayıf etkili olduğu gösterilmiştir (278). Literatürde NR'nin agresyon üzerine etkilerinin

incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bir çalışmada CD157KO otizm spektrum bozukluğu modelinde farelere 12 gün boyunca uygulanan NR tedavisinin erkek nakavt farelerde üç odacıklı kutu (*three-chambered box*) testi ile değerlendirilen sosyal davranışla ilişkili bozuklukları azalttığı, yabanıl tip ve dişi nakavt farelerde bir etki gözlenmediği, ancak zaten yabanıl tip ile dişi nakavt arasında davranışsal bozulma açısından net bir fark olmadığı belirtilmiştir. Ancak özel olarak agresyon davranışı değerlendirilmemiştir (279). Bizim çalışmamızda tek doz ICV A β^{1-42} enjeksiyonu ile oluşturulmuş ve uykusuz bırakılmış sıçan AH modelinde NR tedavisinin A β grubuna kıyasla tutma testi ile değerlendirilen agresyon benzeri davranışı azalttığı gösterilmiştir.

Lokomotor hiperaktivite hayvanlarda huzursuzluk ve ajitasyonu temsil eder. Literatürde transgenik AH modellerinin çoğunda lokomotor aktivite artışı görülmekle birlikte (269, 264, 279) değişiklik saptanmadığını (269, 280) ve lokomotor aktivitenin azaldığını (281) bildiren çalışmalar da vardır. Ozmotik minipompa ile kronik A β^{1-40} infüzyonunun Sprague-Dawley sıçanlarda lokomotor aktiviteyi değiştirmediği gösterilmiştir (282). Tek doz ICV A β^{1-42} enjeksiyonunun sıçanlarda açık alan arena testinde lokomotor aktiviteyi değiştirmediği gösterilmiştir (241,283). Bizim çalışmamızda da tek doz ICV A β^{1-42} enjeksiyonu yapılan sıçanlarda açık alan arena testinde lokomotor aktivite açısından farklılık görülmemiş, NR tedavisinin de lokomotor aktivite üzerinde etkisi olmamıştır.

5.3. Alzheimer Hastalığında Vücut Ağırlığı Değişimi ve Nikotinamid Ribozid Tedavisinin Etkisi

Alzheimer hastalarında vücut ağırlığında azalma sık görülmekle birlikte bu durum hastalığın ilerlemesi ve ciddiyeti ile ilişkilidir. Uzun süreli, uzunlamasına çalışmalardan elde edilen kanıtlar kilo kaybının demans başlangıcından 10 yıl kadar önce başladığı ve demans tanısı ile birlikte hızlandığını göstermektedir (284, 285, 286). Demans tanısı olmayan yaşlıların ölüm ardı otopsi incelemeleri ile yapılan bir çalışmada düşük vücut kitle indeksi Alzheimer hastalığının nöropatolojik değişiklikleri ile ilişkili bulunmuş, ancak Lewy cisimcik patolojisi ve serebral enfarkt oranı ile böyle bir ilişki saptanmamıştır (287). Bu ilişkinin AH'de görülen hipotalamik ve olfaktör işlev bozukluğu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (288).

Bazı çalışmalar PET ile değerlendirilen A β birikiminde artışın ve beyin omurilik sıvısında (BOS) tau/A β ⁴² oranındaki yüksekliğin, izlemde vücut ağırlığında azalma ile ilişkili olduğunu göstermiştir (289, 290). Preklinik AH'ye yönelik biyobelirteçlerin araştırılması için tasarlanmış ALFA+ çalışmasında ise 450 bilişsel olarak sağlıklı katılımcının BOS belirteçleri ve (18F) flutemetamol (FTM-PET) görüntülemeleri değerlendirilmiş, BOS ve PET A β düzeyleri ile kilo kaybı arasında ilişki saptanmamıştır (291). Xu ve ark. ise ATN sınıflandırmasına göre amiloid (A), tau (T) ve nörodejenerasyon (N) (292) mevcudiyetine göre gruplandırıdıkları katılımcıların değerlendirildiği çalışmalarında, amiloid kümelenmesinin (A+) kilo kaybı ile ilişkili bulunduğunu, ancak nedensellik ilişkisi kurulamayacağını belirtmişlerdir (293). Sonuç olarak klinik örneklemelerde kilo kaybı ile BOS A β düzeyi ve A β birikimi arasında nedensellik ilişkisi kurulamamıştır. Klinik çalışmalarda preklinik çalışmalardan farklı olarak pek çok değişkenin sonuçlar üzerinde etkili olduğu unutulmamalıdır. Örneğin erken dönemde Alzheimer hastalarında A β birikiminin yanı sıra gliyozis, inflamasyon, nöronal, sinaptik ve kolinerjik kayıplar gibi farklı nöropatolojik değişiklikler de görülür (41). Bu nedenle klinik çalışmalarda kilo kaybı ile A β düzeyi arasında ilişki bulunması, sadece A β 'nin etkisinden ziyade eşlik eden nöropatolojik değişikliklerin de sürece katkısıyla ortaya çıkıyor olabilir. Bu konuda sadece amiloid betanın etkisinin değerlendirildiği hayvan modeli çalışmaları yol gösterici olabilir.

Bu amaçla literatür A β enjeksiyonu ile indüklenen AH modellerinde kilo değişimi açısından taranmıştır. Kang ve ark. ICV A β ²⁵⁻³⁵ enjeksiyonu ile oluşturulan AH modelinde 3. haftadaki değerlendirmelerinde sıçanların başlangıç ve son ağırlıkları arasında fark olmadığını, ancak vücut ağırlığı değişimine (g) göre karşılaştırdıklarında A β grubunun daha az kilo aldığını bildirmişlerdir (294). Hashimoto ve arkadaşları A β ¹⁻⁴⁰ enjeksiyonunun, Kwak ve ark. ise A β ¹⁻⁴²'nin vücut ağırlığında kontrollere kıyasla değişikliğe yol açmadığını belirtmişlerdir (295, 296). Bizim çalışmamızda da tek doz ICV A β ¹⁻⁴² enjeksiyonu yapılan sıçanlarda zaman içindeki vücut ağırlığı ve % ağırlık değişimi açısından fark saptanmamıştır.

Araştırmamızda kullandığımız nikotinamid ribozidin insanda yaşam süresini uzattığı bilinen tek yöntem olan kalori kısıtlamasını taklit ettiği öne sürülmüştür (297). Bazı çalışmalarda nikotinamid ribozidin tamamlayıcı ürün olarak eklenmesinin

yüksek yağlı diyet ile indüklenmiş obeziteye karşı koruyucu olduğu (298) ve hepatik işlevleri iyileştirdiği gösterilmiştir (197). NR'nin streptozosin ile oluşturulan diyabet modelinde (oral gavaj ile 6 hafta boyunca 400 mg/kg/gün dozda) amiloidojenez ve inflamasyon üzerinde olumlu etkileri olduğu gösterilmiş, ancak kilo alımı üzerinde etkili bulunmamıştır (299). De Castro ve arkadaşları ise kafeterya diyeti (enerjiden yoğun, sağlıksız, iştahı artırıcı diyet) veya standart diyet uyguladıkları Wistar sıçanlarda 6 hafta süreyle 400 mg/kg NR tedavisinin kilo alımını azalttığını göstermişlerdir. Bu etkinin NR'nin hipotalamusta inflamasyonu baskılayıcı etkisi ile ortaya çıkıyor olabileceği belirtilmiştir (300). Xie ve arkadaşları da üç ay süre ile NR tedavisinin (2.5 g/kg/yem) yaşlı (14 aylık) C57BL/6J farelerde ve APP/PS1 AH modelinde kilo alımını baskıladığını göstermiştir (253).

Çalışmalar kalori kısıtlamasının yaşam süresini uzatmadaki etkisinin sirtuinlerin aktivitesinin uyarılması (301), mitofaji ve otofaji artışı aracılığı ile olabileceğini düşündürmektedir (302, 303). NR'nin AH modellerindeki inflamasyonu baskılayıcı etkisinin NAD⁺ bağımlı bir deasetilaz olan sirtuin 1 aracılığı ile olduğu gösterilmiştir (153, 252). Sirtuin 1'in karaciğerde glikoneojenez, yağ dokuda yağ mobilizasyonunu artırıcı, pankreastan insülin salınımı artırıcı, hipotalamusta tokluk hissini uyarıcı, makrofajlarda obezite ile artmış inflamasyonu azaltıcı etkileri olduğu bilinmektedir (304). Bizim çalışmamızda da NR tedavisinin kilo alımını yavaşlatıcı etkisi gösterilmiştir. Bu etkinin gelecekteki çalışmalarda yeniden incelenmesi yol gösterici olacaktır.

5.4. Çalışmanın Kısıtlılıkları

Alzheimer hastalığı modeli oluşturulduğunun sadece davranış testleri ile gösterilmesi, A β kümelenmesinin patolojik olarak gösterilmemesi bir kısıtlılıktır. Çalışmamızda ICV salın ve gavajla salın uygulanarak oluşturulmuş kontrol grubu, ICV A β ve gavajla salın ile oluşturulmuş A β grubu, ICV A β enjekte edilmiş hayvanlarda NR'nin etkisinin değerlendirildiği A β +NR grubu olmak üzere üç farklı grup oluşturulmuştur. ICV salın enjekte edilmiş sıçanlarda NR'nin etkisinin değerlendirilmemesi çalışmanın kısıtlılığıdır. Bu tez çalışması kapsamında yer almamasına rağmen projenin kalan kısmında bu dördüncü grup çalışmaya dahil edilecektir.

Tez çalışmasına başlarken mitofaji ve otofaji ile ilişkili proteinlerin Western blotting tekniği ile değerlendirilmesi amaçlanmış, ancak süre kısıtlaması nedeniyle protein analizlerinin sonuçları tez çalışmasının kapsamı dışında bırakılmış, devam eden projeye eklenmesi planlanmıştır. Bu tez çalışması kapsamında protein analizi sonuçlarının sunulmaması bir kısıtlılıktır. Ancak devam eden proje için mitofaji ve otofaji belirteçlerinin değerlendirilmesi amacıyla protein izolasyonu yapılmıştır.

ICV A β ile oluşturulmuş bu modelde anksiyete benzeri davranışın görülmemesi NR'nin bu davranış üzerindeki etkisinin değerlendirilmesinde bir kısıtlılık oluşturmaktadır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Nikotinamid ribozid tedavisinin sıçanlarda $A\beta^{1-42}$ ile indüklenen ve uyku yoksunluğu uygulanan AH modelinde bilişsel işlevler ve nöropsikiyatrik belirtilere etkisinin değerlendirilmesini amaçlayan bu çalışmada bellek işlevlerinin yanısıra depresyon, anksiyete ve agresyon ile ilişkili parametreler de araştırılmıştır. Alzheimer hastalığı modeli oluşturulan iki grupta 28 günün sonunda AH'nin temel belirtilerinden olan uzun süreli bellekte ve işlem belleğinde bozulma görülmesi modelin $A\beta^{1-42}$ 'nin bellek üzerindeki etkilerini değerlendirmede uygun bir hayvan modeli olduğunu göstermiştir. Nikotinamid ribozid tedavisi AH modeli gruplarından birindeki hayvanlara uygulanmış ve $A\beta^{1-42}$ 'nin neden olduğu uzun süreli bellek bozukluğunu düzelttiği gösterilmiştir, bu bulgu literatürdeki çalışmalarla uyumludur.

Araştırma sonunda sıçanlarda $A\beta^{1-42}$ ile indüklenen AH modelinde depresyon benzeri davranış değişikliği görülmüş, ancak anksiyete benzeri davranışlarda ve agresyon davranışında artış görülmemiştir. Bu çalışmanın en önemli bulgusu, nikotinamid ribozidin $A\beta^{1-42}$ 'nin neden olduğu uzun süreli bellek bozukluğunu düzeltmenin yanısıra, depresyon benzeri davranışları da düzelterek antidepresan etkisinin gösterilmesi olmuştur. Sıçanlarda $A\beta^{1-42}$ ile indüklenen AH modelinde kontrollere göre agresyon skorunda değişiklik saptanmadığı halde, NR uygulamasının $A\beta$ grubunda agresyon skorunu daha hızlı bir şekilde azalttığı da gözlenmiştir. Çalışmamızda NR uygulamasının AH modelinde hem bellek işlevlerini hem de nöropsikiyatrik belirtileri düzelttiğinin gösterilmesi, AH'nin patofizyolojisinin aydınlatılması hakkında literatüre önemli katkı sağlayacaktır, ayrıca gelecekte Alzheimer hastalığı tedavisinde mitofajiyi hedefleyen ajanların kullanımının daha fazla araştırılmasını da sağlayacaktır.

Araştırmanın temel hipotezlerine yönelik sonuçların yanı sıra NR tedavisi kontrol grubunda ve $A\beta^{1-42}$ ile indüklenen AH modelinde kilo alımını yavaşlatmıştır. Literatürde farklı hastalık modellerinde NR'nin bu etkisi gösterilmiştir. Bu bulgunun NAD^+ 'yı uyarmanın kalori kısıtlaması ile ortak patofizyolojik mekanizmaları uyarması nedeniyle olabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak, Alzheimer hastalığının tedavisini hedefleyen gelecekteki çalışmalarda NAD^+ 'yı artırmak ve dolayısıyla mitofajiyi uyarmak yeni bir tedavi seçeneği olarak değerlendirilmelidir. Nikotinamid ribozidin kronik uygulamasının

etkileri, NR'nin antidepresan etkisinin ve bellek üzerindeki iyileştirici etkisinin altında yatan mekanizmalar da araştırılmalıdır.



7. KAYNAKLAR

1. Zhao QF, Tan L, Wang HF, Jiang T, Tan MS, Tan L, ve ark. The prevalence of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: Systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord.* 2016;190:264-271.
2. Steinberg M, Shao H, Zandi P, Lyketsos CG, Welsh-Bohmer KA, Norton MC, ve ark. Point and 5-year period prevalence of neuro- psychiatric symptoms in dementia: the Cache County study. *Int J of Geriatr Psychiatry.* 2008;23(2):170–7.
3. Finkel SI, Costa e Silva J, Cohen G, Miller S, Sartorius N. Behavioral and psychological signs and symptoms of dementia: a consensus statement on current knowledge and implications for research and treatment. *Int Psychogeriatr.* 1996;8 Suppl 3:497-500.
4. Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat.* 1995;8(6):429-31.
5. Peters ME, Schwartz S, Han D, Rabins PV, Steinberg M, Tschanz JT, ve ark. Neuropsychiatric symptoms as predictors of progression to severe Alzheimer's dementia and death: the Cache County Dementia Progression Study. *Am J Psychiatry.* 2015;172(5): 460–5
6. Geda YE, Roberts RO, Mielke MM, Knopman DS, Christianson TJ, Pankratz VS, ve ark. Baseline neuropsychiatric symptoms and the risk of incident mild cognitive impairment: a population-based study. *Am J Psychiatry.* 2014 May;171(5):572-81.
7. Creese B, Brooker H, Ismail Z ve ark. (2019) Mild Behavioral Impairment as a Marker of Cognitive Decline in Cognitively Normal Older Adults. *Am J Geriatr Psychiatry* 27:823–34.
8. Kurz A, Perneczky R. Novel insights for the treatment of Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011;35(2):373–9.
9. Swerdlow RH, Khan SM. A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Med Hypotheses.* 2004;63(1):8-20.
10. Kerr JS, Adriaanse BA, Greig NH, Mattson MP, Cader MZ, Bohr VA, ve ark. Mitophagy and Alzheimer's Disease: Cellular and Molecular Mechanisms. *Trends Neurosci.* 2017;40(3):151-66.
11. Bains J, Birks J, Denning T. Antidepressants for treating depression in dementia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002;(4):CD003944.
12. Wolinsky D, Drake K, Bostwick J. Diagnosis and Management of Neuropsychiatric Symptoms in Alzheimer's Disease. *Curr Psychiatry Rep.* 2018;20(12):117.
13. Šimić G, Babić Leko M, Wray S, Harrington CR, Delalle I, Jovanov-Milošević N, ve ark. Monoaminergic neuropathology in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 2017 Apr; 151:101-138.

14. Nowrangi MA, Lyketsos CG, Rosenberg PB. Principles and management of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's dementia. *Alzheimers Res Ther.* 2015;7(1):12.
15. GBD 2019 Dementia Forecasting Collaborators. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Public Health.* 2022;7(2):105-25.
16. Gurvit H, Emre M, Tinaz S, Bilgic B, Hanagasi H, Sahin H, ve ark. The prevalence of dementia in an urban turkish population. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2008; 23(1): 67-76.
17. Arslantaş D, Ozbabalik D, Metintaş S, Ozkan S, Kalyoncu C, Ozdemir G, ve ark., Prevalence of dementia and associated risk factors in middle anatolia, Turkey. *J Clin Neurosci.* 2009; 16(11): 1455-9.
18. Balasa M, Gelpi E, Antonell A, Rey MJ, Sánchez-Valle R, Molinuevo JL, ve ark. Clinical features and APOE genotype of pathologically proven early-onset Alzheimer disease. *Neurology.* 2011;76(20):1720-1725.
19. Wang XP, Ding HL. Alzheimer's disease: epidemiology, genetics, and beyond. *Neurosci Bull* 2008;24(2):105- 9.
20. Geula C, Mesulam MM, Saroff DM, Wu CK. Relationship between plaques, tangles, and loss of cortical cholinergic fibers in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998;57(1):63-75.
21. Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24:1121-59.
22. McGeer PL, McGeer EG. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiol Aging.* 2001 Nov-Dec;22(6):799-809.
23. Braak H, Del Tredici K. Alzheimer's pathogenesis: is there neuron-to-neuron propagation? *Acta Neuropathol.* 2011;121(5):589-95.
24. Braak H, Thal DR, Ghebremedhin E, Del Tredici K. Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2011;70(11):960-9.
25. Schmitt FA, Davis DG, Wekstein DR, Smith CD, Ashford JW, Markesbery WR. "Preclinical" AD revisited: neuropathology of cognitively normal older adults. *Neurology.* 2000;55(3):370-6.
26. Riley KP, Jicha GA, Davis D, Abner EL, Cooper GE, Stiles N, ve ark. Prediction of preclinical Alzheimer's disease: longitudinal rates of change in cognition. *J Alzheimers Dis.* 2011;25(4):707-17.
27. Bierer LM, Hof PR, Purohit DP, Carlin L, Schmeidler J, Davis KL, ve ark. Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch Neurol.* 1995;52(1):81-8.
28. Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology.* 1992;42(3 Pt 1):631-9.

29. Bensamoun D, Guignard R, Furst AJ, Derreumaux A, Manera V, Darcourt J, ve ark. Associations between Neuropsychiatric Symptoms and Cerebral Amyloid Deposition in Cognitively Impaired Elderly People. *J Alzheimers Dis.* 2016;49(2):387-398.
30. Johansson M, Stomrud E, Lindberg O, Westman E, Johansson PM, van Westen D, ve ark. Apathy and anxiety are early markers of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2020; 85:74-82.
31. Lavretsky H, Siddarth P, Kepe V, Ercoli LM, Miller KJ, Burggren AC, ve ark. Depression and anxiety symptoms are associated with cerebral FDDNP-PET binding in middle-aged and older nondemented adults. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2009;17(6):493-502.
32. Krell-Roesch J, Lowe VJ, Neureiter J, Pink A, Roberts RO, Mielke MM, ve ark. Depressive and anxiety symptoms and cortical amyloid deposition among cognitively normal elderly persons: the Mayo Clinic Study of Aging. *Int Psychogeriatr.* 2018;30(2):245-251.
33. Chung JK, Plitman E, Nakajima S, Chakravarty MM, Caravaggio F, Gerretsen P, ve ark. Cortical Amyloid β Deposition and Current Depressive Symptoms in Alzheimer Disease and Mild Cognitive Impairment. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2016;29(3):149-159.
34. Chung JK, Plitman E, Nakajima S, Chow TW, Chakravarty MM, Caravaggio F, ve ark. Lifetime History of Depression Predicts Increased Amyloid- β Accumulation in Patients with Mild Cognitive Impairment. *J Alzheimers Dis.* 2016;49(4):1189-1190.
35. Hyman BT, Trojanowski JQ. Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer disease from the National Institute on Aging and the Reagan Institute Working Group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56(10):1095-7.
36. Rosén C, Hansson O, Blennow K, Zetterberg H. Fluid biomarkers in Alzheimer's disease - current concepts. *Mol Neurodegener.* 2013 Jun 21;8:20. doi: 10.1186/1750-1326-8-20. PMID: 23800368; PMCID: PMC3691925.
37. Rosén C, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid biomarkers for pathological processes in Alzheimer's disease. *Curr Opin Psychiatry.* 2013 May;26(3):276-82. doi: 10.1097/YCO.0b013e32835f6747. PMID: 23493130.
38. Blennow K, Zetterberg H. Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future. *J Intern Med.* 2018;284(6):643-663.
39. Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology.* 2002;58(12):1791-800.
40. Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, ve ark. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012;71(5):362-81.

41. Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol*. 2010;9(1):119-28.
42. Öztürk GB, Karan MA. Alzheimer Hastalığı'nın Fizyopatolojisi. *Klinik Gelişim*. 2009; 22(3): 36-45.
43. Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999;66(2):137-47.
44. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, ve ark. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*. 2018;141(7):1917-1933.
45. Craig LA, Hong NS, McDonald RJ. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011;35(6):1397-409.
46. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, ve ark. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1991;349(6311):704-6.
47. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, ve ark. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1995;375(6534):754-60.
48. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, ve ark. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 1995;269(5226):973-7.
49. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(2):101-12.
50. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2009 Aug 13;63(3):287-303.
51. Nhan HS, Chiang K, Koo EH. The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes. *Acta Neuropathol*. 2015;129(1):1-19.
52. Zheng H, Koo EH. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener*. 2006;1:5.
53. Sambamurti K, Greig NH, Lahiri DK. Advances in the cellular and molecular biology of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*. 2002;1(1):1-31.
54. Sinha, S. The metabolism of the amyloid precursor protein and its relevance to Alzheimer's disease. *Perspect. drug discov*. 1995; 2, 363–369.
55. Epis R, Marcello E, Gardoni F, Di Luca M. Alpha, beta-and gamma-secretases in Alzheimer's disease. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2012;4(3):1126-50.
56. Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta

- monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*. 1994;13(1):45-53.
57. Olofsson A, Lindhagen-Persson M, Sauer-Eriksson AE, Ohman A. Amide solvent protection analysis demonstrates that amyloid-beta (1-40) and amyloid-beta(1-42) form different fibrillar structures under identical conditions. *Biochem J* 2007;404(1):63-70.
 58. Olofsson A, Sauer-Eriksson AE, Ohman A. The solvent protection of Alzheimer amyloid-beta-(1-42) fibrils as determined by solution NMR spectroscopy. *J Biol Chem*. 2006;281(1):477-83.
 59. Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 1993;32(18):4693-7.
 60. Jan A, Gokce O, Luthi-Carter R, Lashuel HA. The ratio of monomeric to aggregated forms of Abeta40 and Abeta42 is an important determinant of amyloid-beta aggregation, fibrillogenesis, and toxicity. *J Biol Chem* 2008;283(42):28176-89.
 61. Cummings JL. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2004;351(1):56-67.
 62. Klein WL, Krafft GA, Finch CE. Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci*. 2001;24(4):219-24.
 63. Gandy S. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1121-9.
 64. Zhang T, Chen D, Lee TH. Phosphorylation Signaling in APP Processing in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2019;21(1):209.
 65. Dourlen P, Kilinc D, Malmanche N, Chapuis J, Lambert JC. The new genetic landscape of Alzheimer's disease: from amyloid cascade to genetically driven synaptic failure hypothesis? *Acta Neuropathol*. 2019;138(2):221-236.
 66. Ricciarelli R, Fedele E. The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Curr Neuropharmacol*. 2017;15(6):926-935.
 67. Meraz-Ríos MA, Lira-De León KI, Campos-Peña V, De Anda-Hernández MA, Mena-López R. Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2010;112(6):1353-67.
 68. Sjöberg MK, Shestakova E, Mansuroglu Z, Maccioni RB, Bonnefoy E. Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 10):2025-34.
 69. Mondragón-Rodríguez S, Mena R, Binder LI, Smith MA, Perry G, García-Sierra F. Conformational changes and cleavage of tau in Pick bodies parallel the early processing of tau found in Alzheimer pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2008;34(1):62-75.
 70. Mondragón-Rodríguez S, Perry G, Luna-Muñoz J, Acevedo-Aquino MC, Williams S. Phosphorylation of tau protein at sites Ser (396-404) is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2014;40(2):121-35.

71. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82(4):239-59.
72. Lain E, Penke B, Delacourte A, Gündisch D, Schröder H, Witter B. Effects of Abeta1-42 fibrils and of the tetrapeptide Pr-IIIGL on the phosphorylation state of the tau-protein and on the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in vitro. *Eur J Neurosci.* 2005;21(4):879-88.
73. Sperber BR, Leight S, Goedert M, Lee VM. Glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylates tau protein at multiple sites in intact cells. *Neurosci Lett.* 1995;197(2):149-53.
74. Regan P, Piers T, Yi JH, Kim DH, Huh S, Park SJ, ve ark. Tau phosphorylation at serine 396 residue is required for hippocampal LTD. *J Neurosci.* 2015;35(12):4804-12.
75. Shipton OA, Leitz JR, Dworzak J, Acton CE, Tunbridge EM, Denk F, ve ark. Tau protein is required for amyloid {beta}-induced impairment of hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci.* 2011;31(5):1688-92.
76. Mondragón-Rodríguez S, Salgado-Burgos H, Peña-Ortega F. Circuitry and Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease: A New Tau Hypothesis. *Neural Plast.* 2020; 2020:2960343.
77. Du X, Wang X, Geng M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl Neurodegener.* 2018; 7:2.
78. Hong S, Dissing-Olesen L, Stevens B. New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease. *Curr Opin Neurobiol.* 2016; 36:128–134.
79. Krstic D, Knuesel I. Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(1):25-34.
80. B Chance HS, A Boveris. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews.* 59(3):527-605.
81. Moreira PI, Zhu X, Wang X, Lee HG, Nunomura A, Petersen RB, ve ark. Mitochondria: a therapeutic target in neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802(1):212-20.
82. Swerdlow RH, Khan SM. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: an update. *Exp Neurol.* 2009;218(2):308-15.
83. Nunomura A PG, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, ve ark. Oxidative Damage Is the Earliest Event in Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001;60(8):759-67.
84. Keil U, Bonert A, Marques CA, Scherping I, Weyermann J, Strosznajder JB, ve ark. Amyloid beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *J Biol Chem.* 2004;279(48):50310-20.
85. Hansson CA, Frykman S, Farmery MR, Tjernberg LO, Nilsberth C, Pursglove SE, ve ark. Nicastrin, presenilin, APH-1, and PEN-2 form active gamma-secretase complexes in mitochondria. *J Biol Chem.* 2004;279(49):51654-60.
86. LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(7):499-509.

87. Blass JP GG. The role of oxidative abnormalities in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Rev Neurol (Paris)*. 1991;147(6-7):513-25.
88. Guyton AC. Textbook of Physiology WB. 5 th ed. (vol 1); Phl, USA: Saunders Company; 1976.
89. Santos RX, Correia SC, Wang X, Perry G, Smith MA, Moreira PI, ve ark. A synergistic dysfunction of mitochondrial fission/fusion dynamics and mitophagy in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2010;20 Suppl 2:S401-12.
90. Addabbo F, Montagnani M, Goligorsky MS. Mitochondria and reactive oxygen species. *Hypertension*. 2009;53(6):885-92.
91. Moreira PI, Carvalho C, Zhu X, Smith MA, Perry G. Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1802(1):2-10.
92. Bosetti F, Brizzi F, Barogi S, Mancuso M, Siciliano G, Tendi EA, ve ark. Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2002;23(3):371-6.
93. Parker WD Jr, Mahr NJ, Filley CM, Parks JK, Hughes D, Young DA, ve ark. Reduced platelet cytochrome c oxidase activity in Alzheimer's disease. *Neurology*. 1994;44(6):1086-90.
94. Valla J, Schneider L, Niedzielko T, Coon KD, Caselli R, Sabbagh MN, ve ark. Impaired platelet mitochondrial activity in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Mitochondrion*. 2006;6(6):323-30.
95. Wojda U, Salinska E, Kuznicki J. Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life*. 2008;60(9):575-90.
96. Celsi F, Pizzo P, Brini M, Leo S, Fotino C, Pinton P, ve ark. Mitochondria, calcium and cell death: a deadly triad in neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1787(5):335-44.
97. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(3):231-41.
98. van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003;304(3):487-97.
99. Kubli DA, Gustafsson AB. Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ Res*. 2012;111(9):1208-21.
100. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Mechanisms of apoptosis in the heart. *J Clin Immunol*. 2003;23(6):447-59.
101. Ploumi C, Daskalaki I, Tavernarakis N. Mitochondrial biogenesis and clearance: a balancing act. *FEBS J*. 2017;284(2):183-95.
102. Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(1):9-14.

103. Guha S, Johnson GVW, Nehrke K. The Crosstalk Between Pathological Tau Phosphorylation and Mitochondrial Dysfunction as a Key to Understanding and Treating Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*. 2020;57(12):5103-5120.
104. Mao P, Manczak M, Calkins MJ, Truong Q, Reddy TP, Reddy AP, ve ark. Mitochondria-targeted catalase reduces abnormal APP processing, amyloid beta production and BACE1 in a mouse model of Alzheimer's disease: implications for neuroprotection and lifespan extension. *Hum Mol Genet*. 2012;21(13):2973-90.
105. Yao J, Irwin RW, Zhao L, Nilsen J, Hamilton RT, Brinton RD. Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(34):14670-5.
106. Gwon AR, Park JS, Arumugam TV, Kwon YK, Chan SL, Kim SH, ve ark. Oxidative lipid modification of nicastrin enhances amyloidogenic gamma-secretase activity in Alzheimer's disease. *Aging Cell*. 2012;11(4):559-68.
107. Mattson MP FW, Waeg G, Uchida K. 4-Hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, inhibits dephosphorylation of the microtubule-associated protein tau. *Neuroreport*. 1997;8(9—10):2275-81.
108. Hoglinger GU, Lannuzel A, Khondiker ME, Michel PP, Duyckaerts C, Feger J, ve ark. The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy. *J Neurochem*. 2005;95(4):930-9.
109. Melov S, Adlard PA, Morten K, Johnson F, Golden TR, Hinerfeld D, ve ark. Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau. *PLoS One*. 2007;2(6):e536.
110. Hou Y, Ghosh P, Wan R, Ouyang X, Cheng H, Mattson MP, ve ark. Permeability transition pore-mediated mitochondrial superoxide flashes mediate an early inhibitory effect of amyloid beta1-42 on neural progenitor cell proliferation. *Neurobiol Aging*. 2014;35(5):975-89.
111. Du H, Guo L, Yan S, Sosunov AA, McKhann GM, Yan SS. Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(43):18670-5.
112. Keller JN, Pang Z, Geddes JW, Begley JG, Germeyer A, Waeg G, Mattson MP. Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid beta-peptide: role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *J Neurochem*. 1997;69(1):273-84.
113. Goetzl EJ, Boxer A, Schwartz JB, Abner EL, Petersen RC, Miller BL, Kapogiannis D. Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease. *Neurology*. 2015 Jul 7;85(1):40-7.
114. Ye X, Sun X, Starovoytov V, Cai Q. Parkin-mediated mitophagy in mutant hAPP neurons and Alzheimer's disease patient brains. *Hum Mol Genet*. 2015;24(10):2938-51.
115. Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*. 2004;430(7000):631-9.

116. Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron*. 2008;60(5):748-66.
117. Menzies FM, Fleming A, Caricasole A, Bento CF, Andrews SP, Ashkenazi A, ve ark. Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron*. 2017;93(5):1015-34.
118. Rubinsztein DC, Mariño G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell*. 2011 Sep 2;146(5):682-95.
119. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008;451(7182):1069-75.
120. Anding AL, Baehrecke EH. Autophagy in Cell Life and Cell Death. *Curr Top Dev Biol*. 2015; 114:67-91.
121. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, ve ark. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J*. 2017;36(13):1811-36.
122. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*. 2011;18(4):571-80.
123. Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 13):2805-12.
124. Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J*. 1999 Jul 15;18(14):3888-96.
125. Chang NC. Autophagy and Stem Cells: Self-Eating for Self-Renewal. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8:138.
127. Song WH, Yi YJ, Sutovsky M, Meyers S, Sutovsky P. Autophagy and ubiquitin-proteasome system contribute to sperm mitophagy after mammalian fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(36): E5261-70.
128. De Duve C WR. Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol*. 1966; 28:435-92.
129. Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res*. 2005;8(1):3-5.
130. Geisler S, Holmstrom KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, ve ark. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol*. 2010;12(2):119-31.
131. Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, ve ark. The ubiquitin kinase PINK1 recruits' autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*. 2015;524(7565):309-14.
132. Sandoval H, Thiagarajan P, Dasgupta SK, Schumacher A, Prchal JT, Chen M, ve ark. Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature*. 2008;454(7201):232-5.

133. Sato M, Sato K. Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science*. 2011;334(6059):1141-4.
134. Elmore SP, Qian T, Grissom SF, Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB J*. 2001 Oct;15(12):2286-7.
135. Priault M, Salin B, Schaeffer J, Vallette FM, di Rago JP, Martinou JC. Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast. *Cell Death Differ*. 2005;12(12):1613-21.
136. Wild P, McEwan DG, Dikic I. The LC3 interactome at a glance. *J Cell Sci*. 2014;127(Pt 1):3-9.
137. Martinez-Vicente M. Neuronal Mitophagy in Neurodegenerative Diseases. *Front Mol Neurosci*. 2017; 10:64.
138. Li Y, Wu K, Zeng S, Zou L, Li X, Xu C, ve ark. The Role of Mitophagy in Viral Infection. *Cells*. 2022; 11(4):711.
139. Chen G, Kroemer G, Kepp O. Mitophagy: An Emerging Role in Aging and Age-Associated Diseases. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8:200.
140. Deane R, Singh I, Sagare AP, Bell RD, Ross NT, LaRue B, ve ark. A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid β -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest*. 2012;122(4):1377–92.
141. Sampath D, Sathyanesan M, Newton SS. Cognitive dysfunction in major depression and Alzheimer's disease is associated with hippocampal-prefrontal cortex dysconnectivity. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2017; 13:1509-1519.
142. Braak H, Braak E, Bohl J. Staging of Alzheimer-related cortical destruction. *Eur Neurol*. 1993;33(6):403–8.
143. Rezin GT, Cardoso MR, Gonçalves CL, Scaini G, Fraga DB, Riegel RE, ve ark. Inhibition of mitochondrial respiratory chain in brain of rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem Int*. 2008; 53(6-8):395-400.
144. Bordi M, Berg MJ, Mohan PS, Peterhoff CM, Alldred MJ, Che S, ve ark. Autophagy flux in CA1 neurons of Alzheimer hippocampus: Increased induction overburdens failing lysosomes to propel neuritic dystrophy. *Autophagy*. 2016;12(12):2467-2483.
145. Kornhuber J, Gulbins E. New Molecular Targets for Antidepressant Drugs. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(9):894.
146. Zschocke J, Zimmermann N, Berning B, Ganai V, Holsboer F, Rein T. Antidepressant drugs diversely affect autophagy pathways in astrocytes and neurons--dissociation from cholesterol homeostasis. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36(8):1754-1768.
147. Gassen NC, Rein T. Is there a role of autophagy in depression and antidepressant action? *Front. Psychiatry* 2019; 10, 337.
148. Heiseke A, Aguib Y, Riemer C, Baier M, Schätzl HM. Lithium induces clearance of protease resistant prion protein in prion-infected cells by induction of autophagy. *J Neurochem*. 2009;109(1):25-34.

149. Shu X, Sun Y, Sun X, Zhou Y, Bian Y, Shu Z, ve ark. The effect of fluoxetine on astrocyte autophagy flux and injured mitochondria clearance in a mouse model of depression. *Cell Death Dis.* 2019;10(8):577.
150. Wong KY, Roy J, Fung ML, Heng BC, Zhang C, Lim LW. Relationships between Mitochondrial Dysfunction and Neurotransmission Failure in Alzheimer's Disease. *Aging Dis.* 2020;11(5):1291-1316.
151. de Oliveira MR. Fluoxetine and the mitochondria: A review of the toxicological aspects. *Toxicol Lett.* 2016; 258:185-191.
152. Fanibunda SE, Deb S, Maniyadath B, Tiwari P, Ghai U, Gupta S, ve ark. Serotonin regulates mitochondrial biogenesis and function in rodent cortical neurons via the 5-HT_{2A} receptor and SIRT1-PGC-1 α axis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(22):11028-11037.
153. Yang Y, Hu Z, Du X, Davies H, Huo X, Fang M. miR-16 and Fluoxetine Both Reverse Autophagic and Apoptotic Change in Chronic Unpredictable Mild Stress Model Rats. *Front Neurosci.* 2017; 11:428.
154. Chen VC, Hsieh YH, Chen LJ, Hsu TC, Tzang BS. Escitalopram oxalate induces apoptosis in U-87MG cells and autophagy in GBM8401 cells. *J Cell Mol Med.* 2018;22(2):1167-1178.
155. Gassen NC, Rein T. Is There a Role of Autophagy in Depression and Antidepressant Action? *Front Psychiatry.* 2019; 10:337.
156. Hwang HY, Shim JS, Kim D, Kwon HJ. Antidepressant drug sertraline modulates AMPK-MTOR signaling-mediated autophagy via targeting mitochondrial VDAC1 protein. *Autophagy.* 2021;17(10):2783-2799.
157. Reddy AP, Yin X, Sawant N, Reddy PH. Protective effects of antidepressant citalopram against abnormal APP processing and amyloid β -induced mitochondrial dynamics, biogenesis, mitophagy and synaptic toxicities in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 2021; 30(10):847-864.
158. Song X, Liu B, Cui L, Zhou B, Liu W, Xu F, ve ark. Silibinin ameliorates anxiety/depression-like behaviors in amyloid β -treated rats by upregulating BDNF/TrkB pathway and attenuating autophagy in hippocampus. *Physiol Behav.* 2017; 179:487-493.
159. Buckley JS, Salpeter SR. A Risk-Benefit Assessment of Dementia Medications: Systematic Review of the Evidence. *Drugs Aging.* 2015;32(6):453-67.
160. Birks JS, Grimley Evans J. Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;(4):CD001191.
161. Matsunaga S, Kishi T, Iwata N. Memantine monotherapy for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2015;10(4): e0123289.
162. Fink HA, Linskens EJ, MacDonald R, Silverman PC, McCarten JR, Talley KMC, ve ark. Benefits and Harms of Prescription Drugs and Supplements for Treatment of Clinical Alzheimer-Type Dementia. *Ann Intern Med.* 2020;172(10):656-668.

163. Shi M, Chu F, Zhu F, Zhu J. Impact of Anti-amyloid- β Monoclonal Antibodies on the Pathology and Clinical Profile of Alzheimer's Disease: A Focus on Aducanumab and Lecanemab. *Front Aging Neurosci.* 2022; 14:870517.
164. Greenwald BS, Krammer-Ginsberg E, Marin DB, Laitman LB, Her-mann CK, Mohs RC, ve ark. Dementia with coexistent major depression. *Am J Psychiatry* 1989; 146(11):1472-8.
165. Wragg RE, Jeste DV. Overview of depression and psychosis in Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry.*1989;146(5):577-87.
166. Small GW, Rabins PV, Barry PP, Buckholtz NS, DeKosky ST, Ferris SH, ve ark. Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders. Consensus statement of the American Association for Geriatric Psychiatry, the Alzheimer's Association, and the American Geriatrics Society. *JAMA.*1997;278(16):1363-71.
167. Goodwin JS, Goodwin JM, Garry PJ. Association between nutritional status and cognitive functioning in a healthy elderly population. *JAMA.* 1983;249(21):2917-21.
168. Wallace JI, Schwartz RS, LaCroix AZ, Uhlmann RF, Pearlman RA. Involuntary weight loss in older outpatients: incidence and clinical significance. *J Am Geriatr Soc.* 1995;43(4):329-37.
169. White H, Pieper C, Schmader K. The association of weight change in Alzheimer's disease with severity of disease and mortality: a longitudinal analysis. *J Am Geriatr Soc.* 1998;46(10):1223-7.
170. Nyth AL, Gottfries CG, Lyby K, Smedegaard-Andersen L, Gylding-Sabroe J, Kristensen M, ve ark. A controlled multicenter clinical study of citalopram and placebo in elderly depressed patients with and without concomitant dementia. *Acta Psychiatr Scand.*1992;86(2):138-45.
171. Katona CL, Hunter BN, Bray J. A double-blind comparison of the efficacy and safety of paroxetine and imipramine in the treatment of depression with dementia. *Int J Geriatr Psychiatry.* 1998;13(2):100-8.
172. Yury CA, Fisher JE. Meta-analysis of the effectiveness of atypical antipsychotics for the treatment of behavioural problems in persons with dementia. *Psychother Psychosom.* 2007;76(4):213-8.
173. Deberdt WG, Dysken MW, Rappaport SA, Feldman PD, Young CA, Hay DP, ve ark. Comparison of olanzapine and risperidone in the treatment of psychosis and associated behavioral disturbances in patients with dementia. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2005;13(8):722-30.
174. Schneider LS, Dagerman KS, Insel P. Risk of death with atypical antipsychotic drug treatment for dementia: meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *JAMA.* 2005;294(15):1934-43.
175. Jeste DV, Dolder CR, Nayak GV, Salzman C. Atypical antipsychotics in elderly patients with dementia or schizophrenia: review of recent literature. *Harv Rev Psychiatry.* 2005;13(6):340-51.
176. Banerjee S, Hellier J, Dewey M, Romeo R, Ballard C, Baldwin R, ve ark. Sertraline or mirtazapine for depression in dementia (HTA-SADD): a randomised,

- multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2011;378(9789):403-11.
177. Rugarli EI, Langer T. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. *EMBO J*. 2012; 31(6):1336-49.
 178. Dumont M KK, Yu F, Wille E, Katz M, Calingasan NY, Gouras GK, ve ark. Coenzyme Q10 decreases amyloid pathology and improves behavior in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2011;27(1):211-23.
 179. Gugliandolo A BP, Mazzon E. Role of Vitamin E in the Treatment of Alzheimer's Disease: Evidence from Animal Models. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12):2504.
 180. McManus MJ MM, Franklin JL. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ prevents loss of spatial memory retention and early neuropathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2011;31(44):15703-15.
 181. Covey MV MM, Hobbs CE, Smith RA, Oorschot DE. Effect of the mitochondrial antioxidant, Mito Vitamin E, on hypoxic-ischemic striatal injury in neonatal rats: a dose-response and stereological study. *Exp Neurol*. 2006;199(2):513-9.
 182. Lim JW, Lee J, Pae AN. Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease: prospects for therapeutic intervention. *BMB Reports*. 2020;53(1):47-55.
 183. Du H GL, Zhang W, Rydzewska M, Yan S. Cyclophilin D deficiency improves mitochondrial function and learning/memory in aging Alzheimer disease mouse model. *Neurobiol Aging*. 2011;32(3):398-406.
 184. Berger Z, Ravikumar B, Menzies FM, Oroz LG, Underwood BR, Pangalos MN, ve ark. Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Hum Mol Genet*. 2006;15(3):433-42.
 185. Ravikumar B, Berger Z, Vacher C, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. Rapamycin pretreatment protects against apoptosis. *Hum Mol Genet*. 2006;15(7):1209-16.
 186. Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem*. 2003;278(27):25009-13.
 187. Rubinsztein DC, Shpilka T, Elazar Z. Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr Biol*. 2012;22(1): R29-34.
 188. Fang EF, Hou Y, Palikaras K, Adriaanse BA, Kerr JS, Yang B, ve ark. Mitophagy inhibits amyloid-beta and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*. 2019;22(3):401-12.
 189. Andreux PA B-BW, Ryu D, Burdet F, Ibberson M, Aebischer P, Auwerx J, ve ark. The mitophagy activator urolithin A is safe and induces a molecular signature of improved mitochondrial and cellular health in humans. *Nat Metab*. 2019;1(6):595-603.
 190. Yoshino J, Baur JA, Imai SI. NAD⁺ Intermediates: The Biology and Therapeutic Potential of NMN and NR. *Cell Metab*. 2018;27(3):513-528.
 191. Covarrubias AJ, Perrone R, Grozio A, Verdin E. NAD⁺ metabolism and its roles in cellular processes during ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22(2):119-141.

192. Yang Y, Sauve AA. NAD (+) metabolism: Bioenergetics, signaling and manipulation for therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1864(12):1787-1800.
193. Croft T, Venkatakrishnan P, Lin SJ. NAD⁺ Metabolism and Regulation: Lessons From Yeast. *Biomolecules*. 2020;10(2):330.
194. Hwang ES, Song SB. Possible Adverse Effects of High-Dose Nicotinamide: Mechanisms and Safety Assessment. *Biomolecules*. 2020;10(5):687.
195. Braidy N, Grant R, Sachdev PS. Nicotinamide adenine dinucleotide and its related precursors for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Opin Psychiatry*. 2018;31(2):160-6.
196. Okabe K, Yaku K, Tobe K, Nakagawa T. Implications of altered NAD metabolism in metabolic disorders. *J Biomed Sci*. 2019;26(1):34.
197. Martens CR, Denman BA, Mazzo MR, Armstrong ML, Reisdorph N, McQueen MB, ve ark. Chronic nicotinamide riboside supplementation is well-tolerated and elevates NAD⁺ in healthy middle-aged and older adults. *Nat Commun*. 2018;9(1):1286.
198. Trammell SA, Schmidt MS, Weidemann BJ, Redpath P, Jaksch F, Dellinger RW, Li Z, Abel ED, Migaud ME, Brenner C. Nicotinamide riboside is uniquely and orally bioavailable in mice and humans. *Nat Commun*. 2016; 7:12948.
199. Kang JE, Lim MM, Bateman RJ, Lee JJ, Smyth LP, Cirrito JR, ve ark. Amyloid-beta dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. *Science*. 2009;326(5955):1005-7.
200. Laurijssens B, Aujard F, Rahman A. Animal models of Alzheimer's disease and drug development. *Drug Discov Today Technol*. 2013;10(3):319-27.
201. Ashe KH, Zahs KR. Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron*. 2010;66(5):631-45.
202. Bhardwaj S, Kesari KK, Rachamalla M, Mani S, Ashraf GM, Jha SK, ve ark. CRISPR/Cas9 gene editing: new hope for Alzheimer's disease therapeutics. *J Adv Res*. 2022; 40:207-221.
203. Tomruk C, Şirin C, Buhur A, Kılıç KD, Çetin EÖ, Erbaş O, ve ark. The four horsemen of neurodegenerative diseases Alzheimer, Parkinson, Huntington and amyotrophic lateral skleroz; clinical definition and experimental models. *FNG & Bilim Tıp Dergisi* 2018;4(1):37-43.
204. Cohen RM, Rezai-Zadeh K, Weitz TM, Rentsendorj A, Gate D, Spivak I, ve ark. A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric a β , and frank neuronal loss. *J Neurosci*. 2013; 33(15):6245-56.
205. Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, ve ark. Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol*. 2003; 184(1):247-63.
206. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*. 2003;39(3):409-21.

207. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, ve ark. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci*. 2006;26(40):10129-40.
208. Morley JE, Farr SA, Kumar VB, Armbrrecht HJ. The SAMP8 mouse: a model to develop therapeutic interventions for Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des*. 2012;18(8):1123-30.
209. de Bem AF, Krolow R, Farias HR, de Rezende VL, Gelain DP, Moreira JCF, ve ark. Animal Models of Metabolic Disorders in the Study of Neurodegenerative Diseases: An Overview. *Front Neurosci*. 2021; 14:604150.
210. Savage LM, Sweet AJ, Castillo R, Langlais PJ. The effects of lesions to thalamic lateral internal medullary lamina and posterior nuclei on learning, memory and habituation in the rat. *Behav Brain Res*. 1997;82(2):133-47.
211. Van Dam D, De Deyn PP. Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol*. 2011;164(4):1285-300.
212. Salkovic-Petrisic M, Osmanovic-Barilar J, Knezovic A, Hoyer S, Mosetter K, Reutter W. Long-term oral galactose treatment prevents cognitive deficits in male Wistar rats treated intracerebroventricularly with streptozotocin. *Neuropharmacology*. 2014; 77:68-80.
213. Calvo-Ochoa E, Arias C. Cellular and metabolic alterations in the hippocampus caused by insulin signalling dysfunction and its association with cognitive impairment during aging and Alzheimer's disease: studies in animal models. *Diabetes Metab Res Rev*. 2015;31(1):1-13.
214. Kang JE, Lim MM, Bateman RJ, Lee JJ, Smyth LP, Cirrito JR, ve ark. Amyloid-beta dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. *Science*. 2009;326(5955):1005-7.
215. Gerstner JR, Perron IJ, Pack AI. The nexus of A β , aging, and sleep. *Sci Transl Med*. 2012;4(150):150fs34.
216. Tabuchi M, Lone SR, Liu S, Liu Q, Zhang J, Spira AP, ve ark. Sleep interacts with abeta to modulate intrinsic neuronal excitability. *Curr Biol*. 2015; 25(6):702-712.
217. Wang W, Bodles-Brakhop AM, Barger SW. A role for P-glycoprotein in clearance of Alzheimer amyloid β -peptide from the brain. *Curr. Alzheimer Res*. 2016;13: 615–620.
218. Alten B, Yesiltepe M, Bayraktar E, Tas ST, Gocmen AY, Kursungoz C ve ark. High-fructose corn syrup consumption in adolescent rats causes bipolar-like behavioural phenotype with hyperexcitability in hippocampal CA3-CA1 synapses. *Br J Pharmacol*. 2018;175(24):4450-4463.
219. Stancu IC, Vasconcelos B, Terwel D, Dewachter I. Models of β -amyloid induced Tau-pathology: the long and "folded" road to understand the mechanism. *Mol Neurodegener*. 2014; 9:51.

220. Byun K, Bayarsaikhan E, Kim D, Kim CY, Mook-Jung I, Paek SH, ve ark. Induction of neuronal death by microglial AGE-albumin: implications for Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2012;7(5): e37917.
221. Li J, Wang C, Zhang JH, Cai JM, Cao YP, Sun XJ. Hydrogen-rich saline improves memory function in a rat model of amyloid-beta-induced Alzheimer's disease by reduction of oxidative stress. *Brain Res*. 2010; 1328:152-61.
222. Youngblood BD, Zhou J, Smagin GN, Ryan DH, Harris RB. Sleep deprivation by the "flowerpot" technique and spatial reference memory. *Physiol Behav*. 1997;61(2):249-56.
223. Murman DL, Chen Q, Powell MC, Kuo SB, Bradley CJ, Colenda CC. The incremental direct costs associated with behavioral symptoms in AD. *Neurology*. 2002;59(11):1721-9.
224. Ambrée O, Leimer U, Herring A, Görtz N, Sachser N, Heneka MT, ve ark. Reduction of amyloid angiopathy and Abeta plaque burden after enriched housing in TgCRND8 mice: involvement of multiple pathways. *Am J Pathol*. 2006;169(2):544-52.
225. Vloeberghs E, Van Dam D, Coen K, Staufenbiel M, De Deyn PP. Aggressive male APP23 mice modeling behavioral alterations in dementia. *Behav Neurosci*. 2006;120(6):1380-3.
226. Pugh PL, Richardson JC, Bate ST, Upton N, Sunter D. Non-cognitive behaviours in an APP/PS1 transgenic model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*. 2007;178(1):18-28.
227. Ilchibaeva TV, Kondaurova EM, Tsybko AS, Kozhemyakina RV, Popova NK, Naumenko VS. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its precursor (proBDNF) in genetically defined fear-induced aggression. *Behav Brain Res*. 2015; 290:45-50.
228. Eilam D. Open-Field Behavior Withstands Drastic Changes in Arena Size. *Behav Brain Res*. 2003; 142(1):53-62.
229. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985;14(3):149-167.
230. Deacon RM, Rawlins JN. T-maze alternation in the rodent. *Nat Protoc*. 2006;1(1):7-12.
231. Dember WN, Richman CL. Spontaneous Alternation Behavior. New York, USA: Springer; 1989.
232. Olton DS, Becker JT, Handelmann GE. Hippocampus, space and memory. *Behav Brain Sci*. 1979;2(3), 313-322.
233. Deacon RMJ, Penny C, Rawlins JNP. Effects of medial prefrontal cortex cytotoxic lesions in mice. *Behav Brain Res*. 2003; 139 (1-2):139–55.
234. Reisel D, Bannerman DM, Schmitt WB, Deacon RM, Flint J, Borchardt T, ve ark. Spatial memory dissociations in mice lacking GluR1. *Nat. Neurosci*. 2002; (9):868-73.

235. Slattery, D.A. ve J.F. Cryan, Using the Rat Forced Swim Test to Assess Antidepressant-Like Activity in Rodents. *Nature Protocols*. 2012; 7(6):1009-14.
236. Newman, J.P. ve D.S. Kosson, Passive Avoidance Learning in Psychopathic and Nonpsychopathic Offenders. *Journal of Abnormal Psychology*, 1986.95(3): p. 252-256.
237. Fonseca-Rodrigues D, Gonçalves J, Laranjeira I, Almeida A, Pinto-Ribeiro F. Sucrose intake and preference by Wistar Han rats are not influenced by sex or food/water deprivation. *Pharmacol Biochem Behav*. 2022; 216:173387.
238. Chiu K, Lau WM, Lau HT, So KF, Chang RC. Micro-dissection of rat brain for RNA or protein extraction from specific brain region. *J Vis Exp*. 2007;(7):269.
239. Jia M, Meng F, Smerin SE, Xing G, Zhang L, Su DM, ve ark. Biomarkers in an animal model for revealing neural, hematologic, and behavioral correlates of PTSD. *J Vis Exp*. 2012;(68):3361.
240. Kasza Á, Penke B, Frank Z, Bozsó Z, Szegedi V, Hunya Á, ve ark. Studies for Improving a Rat Model of Alzheimer's Disease: Icv Administration of Well-Characterized β -Amyloid 1-42 Oligomers Induce Dysfunction in Spatial Memory. *Molecules*. 2017;22(11):2007.
241. Yesiltepe M, Cimen B, Sara Y. Effects of chronic vagal nerve stimulation in the treatment of β -amyloid-induced neuropsychiatric symptoms. *Eur J Pharmacol*. 2022; 931:175179.
242. Colaianna M, Tucci P, Zotti M, Morgese MG, Schiavone S, Govoni S, ve ark. Soluble beta amyloid (1-42): a critical player in producing behavioural and biochemical changes evoking depressive-related state? *Br J Pharmacol*. 2010;159(8):1704-15.
243. Underwood E (2013) Neuroscience. Sleep: the brain's housekeeper? *Science*. 2013; 342(6156):301.
244. Zhao B, Liu P, Wei M, Li Y, Liu J, Ma L, ve ark. Chronic Sleep Restriction Induces A β Accumulation by Disrupting the Balance of A β Production and Clearance in Rats. *Neurochem Res*. 2019;44(4):859-873.
245. Shirzad S, Neamati A, Vafaei F, Ghazavi H. Bufo viridis secretions improve anxiety and depression-like behavior following intracerebroventricular injection of amyloid β . *Res Pharm Sci*. 2020;15(6):571-582.
246. Van Dam D, De Deyn PP. Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol*. 2011;164(4):1285-300.
247. Yamada K, Tanaka T, Han D, Senzaki K, Kameyama T, Nabeshima T. Protective effects of idebenone and alpha-tocopherol on beta-amyloid-(1-42)-induced learning and memory deficits in rats: implication of oxidative stress in beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo. *Eur J Neurosci*. 1999;11(1):83-90.
248. Nakamura S, Murayama N, Noshita T, Annoura H, Ohno T. Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta (1-42)-amyloid peptide. *Brain Res*. 2001;912(2):128-36.

249. Wang X, Hu X, Yang Y, Takata T, Sakurai T. Nicotinamide mononucleotide protects against β -amyloid oligomer-induced cognitive impairment and neuronal death. *Brain Res.* 2016; 1643:1-9.
250. Gong B, Pan Y, Vempati P, Zhao W, Knable L, Ho L, ve ark. Nicotinamide riboside restores cognition through an upregulation of proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α regulated β -secretase 1 degradation and mitochondrial gene expression in Alzheimer's mouse models. *Neurobiol Aging.* 2013;34(6):1581-8.
251. Hou Y, Lautrup S, Cordonnier S, Wang Y, Croteau DL, Zavala E, ve ark. NAD⁺ supplementation normalizes key Alzheimer's features and DNA damage responses in a new AD mouse model with introduced DNA repair deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(8):E1876-E1885.
252. Hou Y, Wei Y, Lautrup S, Yang B, Wang Y, Cordonnier S, ve ark. NAD⁺ supplementation reduces neuroinflammation and cell senescence in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease via cGAS-STING. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Sep 14;118(37):e2011226118.
253. Xie X, Gao Y, Zeng M, Wang Y, Wei TF, Lu YB, Zhang WP. Nicotinamide ribose ameliorates cognitive impairment of aged and Alzheimer's disease model mice. *Metab Brain Dis.* 2019;34(1):353-366.
254. Kosel F, Pelley JMS, Franklin TB. Behavioural and psychological symptoms of dementia in mouse models of Alzheimer's disease-related pathology. *Neurosci Biobehav Rev.* 2020; 112:634-647.
255. Lyketsos CG, Olin J. Depression in Alzheimer's disease: overview and treatment. *Biol Psychiatry.* 2002;52(3):243-52.
256. Olin JT, Schneider LS, Katz IR, Meyers BS, Alexopoulos GS, Breitner JC, ve ark. Provisional diagnostic criteria for depression of Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2002;10(2):125-8.
257. dos Santos VV, Santos DB, Lach G, Rodrigues AL, Farina M, De Lima TC, ve ark. Neuropeptide Y (NPY) prevents depressive-like behavior, spatial memory deficits and oxidative stress following amyloid- β (A β (1-40)) administration in mice. *Behav Brain Res.* 2013; 244:107-15.
258. Ledo JH, Azevedo EP, Clarke JR, Ribeiro FC, Figueiredo CP, Foguel D, ve ark. Amyloid- β oligomers link depressive-like behavior and cognitive deficits in mice. *Mol Psychiatry.* 2013;18(10):1053-4.
259. Jiang Y, Liu Y, Gao M, Xue M, Wang Z, Liang H. Nicotinamide riboside alleviates alcohol-induced depression-like behaviours in C57BL/6J mice by altering the intestinal microbiota associated with microglial activation and BDNF expression. *Food Funct.* 2020;11(1):378-391.
260. Xie X, Yu C, Zhou J, Xiao Q, Shen Q, Xiong Z, Li Z, Fu Z. Nicotinamide mononucleotide ameliorates the depression-like behaviors and is associated with attenuating the disruption of mitochondrial bioenergetics in depressed mice. *J Affect Disord.* 2020;263:166-174.

261. Sterniczuk R, Antle MC, Laferla FM, Dyck RH. Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 2. Behavioral and cognitive changes. *Brain Res.* 2010; 1348:149-55.
262. Toda T, Noda Y, Ito G, Maeda M, Shimizu T. Presenilin-2 mutation causes early amyloid accumulation and memory impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:617974.
263. García-Mesa Y, Giménez-Llort L, López LC, Venegas C, Cristòfol R, Escames G, ve ark. Melatonin plus physical exercise are highly neuroprotective in the 3xTg-AD mouse. *Neurobiol Aging.* 2012;33(6): 1124.e13-29.
264. Filali M, Lalonde R, Rivest S. Subchronic memantine administration on spatial learning, exploratory activity, and nest-building in an APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology.* 2011;60(6):930-6.
265. Verma M, Beaulieu-Abdelahad D, Ait-Ghezala G, Li R, Crawford F, Mullan M, ve ark. Chronic Anatabine Treatment Reduces Alzheimer's Disease (AD)-Like Pathology and Improves Socio-Behavioral Deficits in a Transgenic Mouse Model of AD. *PLoS One.* 2015;10(5): e0128224.
266. Deacon RM, Koros E, Bornemann KD, Rawlins JN. Aged Tg2576 mice are impaired on social memory and open field habituation tests. *Behav Brain Res.* 2009;197(2):466-8.
267. Radde R, Bolmont T, Kaeser SA, Coomaraswamy J, Lindau D, Stoltze L, ve ark. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep.* 2006; 7(9):940-6.
268. Romano A, Pace L, Tempesta B, Lavecchia AM, Macheda T, Bedse G, ve ark. Depressive-like behavior is paired to monoaminergic alteration in a murine model of Alzheimer's disease. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014;18(4): pyu020.
269. Arendash GW, King DL, Gordon MN, Morgan D, Hatcher JM, Hope CE, ve ark. Progressive, age-related behavioral impairments in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes. *Brain Res.* 2001;891(1-2):42-53.
270. Ognibene E, Middei S, Daniele S, Adriani W, Ghirardi O, Caprioli A, ve ark. Aspects of spatial memory and behavioral disinhibition in Tg2576 transgenic mice as a model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res.* 2005;156(2):225-32.
271. Pentkowski NS, Rogge-Obando KK, Donaldson TN, Bouquin SJ, Clark BJ. Anxiety and Alzheimer's disease: Behavioral analysis and neural basis in rodent models of Alzheimer's-related neuropathology. *Neurosci Biobehav Rev.* 2021; 127:647-658.
272. Lalonde R, Lewis TL, Strazielle C, Kim H, Fukuchi K. Transgenic mice expressing the betaAPP695SWE mutation: effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination. *Brain Res.* 2003;977(1):38-45
273. Kosel F, Hamilton JS, Harrison SL, Godin V, Franklin TB. Reduced social investigation and increased injurious behavior in transgenic 5xFAD mice. *J Neurosci Res.* 2021;99(1):209-222.

274. Bories C, Guitton MJ, Julien C, Tremblay C, Vandal M, Msaïd M, De Koninck Y, Calon F. Sex-dependent alterations in social behaviour and cortical synaptic activity coincide at different ages in a model of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2012;7(9): e46111.
275. Sekiguchi K, Yamaguchi T, Tabuchi M, Ikarashi Y, Kase Y. Effects of yokukansan, a traditional Japanese medicine, on aggressiveness induced by intracerebroventricular injection of amyloid beta protein into mice. *Phytother Res*. 2009;23(8):1175-81.
276. Tamano H, Ide K, Adlard PA, Bush AI, Takeda A. Involvement of hippocampal excitability in amyloid β -induced behavioral and psychological symptoms of dementia. *The Journal of toxicological sciences*. 2016;41(4):449-57.
277. Davies, S.J. v.d., Sequential Drug Treatment Algorithm for Agitation and Aggression in Alzheimer's and Mixed Dementia. *J Psychopharmacol*, 2018. 32(5): p. 509-523.
278. Ostinelli EG, Hussein M, Ahmed U, Rehman FU, Miramontes K, Adams CE. Risperidone for psychosis-induced aggression or agitation (rapid tranquillisation). *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;4(4):CD009412.
279. Gerasimenko M, Cherepanov SM, Furuhashi K, Lopatina O, Salmina AB, Shabalova AA, ve ark. Nicotinamide riboside supplementation corrects deficits in oxytocin, sociability and anxiety of CD157 mutants in a mouse model of autism spectrum disorder. *Sci Rep*. 2020;10(1):10035.
279. Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, ve ark. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med*. 1998;4(1):97-100.
280. Webster SJ, Bachstetter AD, Van Eldik LJ. Comprehensive behavioral characterization of an APP/PS-1 double knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2013;5(3):28.
281. Liu L, Ikonen S, Heikkinen T, Tapiola T, van Groen T, Tanila H. The effects of long-term treatment with metrifonate, a cholinesterase inhibitor, on cholinergic activity, amyloid pathology, and cognitive function in APP and PS1 doubly transgenic mice. *Exp Neurol*. 2002;173(2):196-204.
282. Nag S, Tang F, Yee BK. Chronic intracerebroventricular exposure to beta-amyloid (1-40) impairs object recognition but does not affect spontaneous locomotor activity or sensorimotor gating in the rat. *Exp Brain Res*. 2001;136(1):93-100.
283. Cioanca O, Hritcu L, Mihasan M, Trifan A, Hancianu M. Inhalation of coriander volatile oil increased anxiolytic-antidepressant-like behaviors and decreased oxidative status in beta-amyloid (1-42) rat model of Alzheimer's disease. *Physiol Behav*. 2014; 131:68-74.
284. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984;34(7):939-44.

285. Buchman AS, Wilson RS, Bienias JL, Shah RC, Evans DA, Bennett DA. Change in body mass index and risk of incident Alzheimer disease. *Neurology*. 2005;65(6):892-7.
286. Knopman DS, Edland SD, Cha RH, Petersen RC, Rocca WA. Incident dementia in women is preceded by weight loss by at least a decade. *Neurology*. 2007;69(8):739-46.
287. Buchman AS, Schneider JA, Wilson RS, Bienias JL, Bennett DA. Body mass index in older persons is associated with Alzheimer disease pathology. *Neurology*. 2006;67(11):1949-54.
288. Ishii M, Iadecola C. Metabolic and Non-Cognitive Manifestations of Alzheimer's Disease: The Hypothalamus as Both Culprit and Target of Pathology. *Cell Metab*. 2015;22(5):761-76.
289. Jimenez A, Pegueroles J, Carmona-Iragui M, Vilaplana E, Montal V, Alcolea D, ve ark. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Weight loss in the healthy elderly might be a non-cognitive sign of preclinical Alzheimer's disease. *Oncotarget*. 2017;8(62):104706-104716.
290. Rabin JS, Shirzadi Z, Swardfager W, MacIntosh BJ, Schultz A, Yang HS, ve ark. Harvard Aging Brain Study; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Amyloid-beta burden predicts prospective decline in body mass index in clinically normal adults. *Neurobiol Aging*. 2020; 93:124-130.
291. Grau-Rivera O, Navalpotro-Gomez I, Sánchez-Benavides G, Suárez-Calvet M, Milà-Alomà M, Arenaza-Urquijo EM, ve ark. ALFA Study. Association of weight change with cerebrospinal fluid biomarkers and amyloid positron emission tomography in preclinical Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2021;13(1):46.
292. Jack CR Jr, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Feldman HH, Frisoni GB, ve ark. A/T/N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. *Neurology*. 2016;87(5):539-47.
293. Xu W, Sun FR, Tan CC, Tan L; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Weight Loss is a Preclinical Signal of Cerebral Amyloid Deposition and Could Predict Cognitive Impairment in Elderly Adults. *J Alzheimers Dis*. 2020;77(1):449-456.
294. Kang S, Moon NR, Kim DS, Kim SH, Park S. Central acylated ghrelin improves memory function and hippocampal AMPK activation and partly reverses the impairment of energy and glucose metabolism in rats infused with β -amyloid. *Peptides*. 2015; 71:84-93.
295. Hashimoto M, Hossain S, Agdul H, Shido O. Docosahexaenoic acid-induced amelioration on impairment of memory learning in amyloid beta-infused rats relates to the decreases of amyloid beta and cholesterol levels in detergent-insoluble membrane fractions. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1738(1-3):91-8.
296. Kwak J, Kim MJ, Choi KC, Choi HK, Jun W, Park HJ, ve ark. The chalcone derivative Chana 1 protects against amyloid β peptide-induced oxidative stress and cognitive impairment. *Int J Mol Med*. 2012;30(1):193-8.

297. Sato S, Solanas G, Peixoto FO, Bee L, Symeonidi A, Schmidt MS, ve ark. Circadian reprogramming in the liver identifies metabolic pathways of aging. *Cell*. 2017;170(4):664–677.
298. Cantó C, Menzies KJ, Auwerx J. NAD (+) Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metab*. 2015;22(1):31-53.
299. Lee HJ, Yang SJ. Supplementation with Nicotinamide Riboside Reduces Brain Inflammation and Improves Cognitive Function in Diabetic Mice. *Int J Mol Sci*. 2019;20(17):4196.
300. de Castro JM, Stein DJ, Medeiros HR, de Oliveira C, Torres ILS. Nicotinamide Riboside Neutralizes Hypothalamic Inflammation and Increases Weight Loss Without Altering Muscle Mass in Obese Rats Under Calorie Restriction: A Preliminary Investigation. *Front Nutr*. 2021; 8:648893.
301. Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, ve ark. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*. 2004;430(7000):686-9.
302. Kenyon CJ. The genetics of ageing. *Nature*. 2010;464(7288):504-12.
303. Kume S, Uzu T, Horiike K, Chin-Kanasaki M, Isshiki K, Araki S, ve ark. Calorie restriction enhances cell adaptation to hypoxia through Sirt1-dependent mitochondrial autophagy in mouse aged kidney. *J Clin Invest*. 2010;120(4):1043-55.
304. Schug TT, Li X. Sirtuin 1 in lipid metabolism and obesity. *Ann Med*. 2011;43(3):198-211.

