

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyofizik Anabilim Dalı

**DENEYSEL ALZHEİMER MODELİNDE OLAYA İLİŞKİN
POTANSİYELLER VE OKSİDAN STRES DEĞİŞİKLİKLERİNE
ROSMARİNİK ASİDİN ETKİLERİ VE MEKANİZMASI**

Deniz KANTAR GÖK

Doktora Tezi

Antalya, 2016

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyofizik Anabilim Dalı

**DENEYSEL ALZHEİMER MODELİNDE OLAYA İLİŞKİN
POTANSİYELLER VE OKSİDAN STRES DEĞİŞİKLİKLERİNE
ROSMARİNİK ASİDİN ETKİLERİ VE MEKANİZMASI**

Deniz KANTAR GÖK

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU

Bu Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim
Birimi Tarafından Desteklenmiştir (Proje No:2013.03.0122.013)

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2016

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Enstitü Kurulumuzun 22.06.2000 tarih ve 02/09 sayılı ilke kararına dayalı olarak, Üniversitemiz Senatosu'nun 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı ile onaylanan "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora çalışma alanında en az bir yurt dışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır.

- 1- Kantar Gok D, Akpinar D, Yargicoglu P, Ozen S, Aslan M, Demir N, Derin N, Agar A. Effects of extremely low-frequency electric fields at different intensities and exposure durations on mismatch negativity. Neuroscience. 2014 Jul 272:154-66.
- 2- Kantar Gok D, Akpinar D, Hidisoglu E, Ozen S, Agar A, Yargicoglu P. The developmental effects of extremely low frequency electric fields on visual and somatosensory evoked potentials in adult rats. Electromagn Biol Med. 2015 Aug 21:1-10.
- 3- Kantar Gok D, Ozturk N, Er H, Aslan M, Demir N, Derin N, Agar A, Yargicoglu P. Effects of rosmarinic acid on cognitive and biochemical alterations in ovariectomized rats treated with D-galactose. Folia Histochem Cytobiol. 2015 Dec 53(4):283-93.

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyofizik Doktora Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.12/02/2016

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU AKKIRAZ**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

Üye : **Doç. Dr. Semir ÖZDEMİR**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

Üye : **Doç. Dr. Nazmi YARAŞ**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

Üye : **Prof. Dr. Cüneyt GÖKSOY**
Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Biyofizik Anabilim Dalı

Üye : **Doç. Dr. Süha YAĞCIOĞLU**
Hacettepe Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirtilen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

ÖZET

Alzheimer hastalığı bilişsel fonksiyonlarda ve davranışlarda ilerleyici bozukluk ile karakterize edilen yaygın bir demans türüdür. Alzheimer hastalığında beyin dokusunda artarak biriken ve polimerize olarak fibriller şeklinde kümelenen amiloid beta ($A\beta$) peptidinin patofizyolojik süreçlerde rol aldığı bilinmektedir. Çalışmamızda antioksidan özellikleri olan rosmarinik asidin $A\beta$ 42 peptidinin indüklediği komplikasyonlara etkisi elektrofizyolojik parametreler, histolojik ve biyokimyasal analizler yardımıyla incelenmiştir.

Çalışmamızda 100 adet 2 aylık Wistar erkek sıçan, her grupta 25 hayvan olacak şekilde rastgele bölünerek sham(S), sham+rosmarinik asit (SR), $A\beta$ 42peptidi (AH) ve $A\beta$ 42peptidi+rosmarinik asit (AHR) grupları oluşturulmuştur. Alzheimer modeli oluşturulacak sıçanlara (AH ve AHR) $A\beta$ 42 peptidi (2,2 nmol/10 μ l) intraserebroventriküler olarak uygulanmıştır. İki haftalık deney süresi boyunca SR ve AHR gruplarına gavaj yoluyla 50 mg/kg/gün rosmarinik asit verilmiştir. Deney süresinin sonunda işitsel olaya ilişkin potansiyeller kaydedildikten sonra sıçanların beyin dokularında biyokimyasal ve histolojik analizler gerçekleştirilmiştir.

Alzheimer grubunda TBARS ve 4-HNE değerlerinin S ve SR gruplarına göre anlamlı düzeyde arttığı ve AHR grubunda rosmarinik asitin lipid peroksidasyonu azaltarak kontrol seviyesine getirdiği görülmüştür. Ayrıca, antioksidan enzim aktivitelerinin (SOD, CAT,GSH-Px) AH grubunda anlamlı şekilde azaldığı, tedavi uygulanan AHR grubunda ise bu azalışın önlendiği izlenmiştir. Alzheimer grubunda S ve SR grubuna göre azalan GSH düzeyinin AHR grubunda arttığı ancak kontrol düzeyine dönmediği saptanmıştır. Amiloid β 42'nin AH grubunda ACh miktarını ve AChE aktivitesini düşürerek kolinerjik sistemi zayıflattığı, rosmarinik asitin ise AHR grubunda bu etkiyi tersine çevirdiği belirlenmiştir. Ultrayapısal incelemeler sonucu AH grubunda hücrelerde yapısal bozukluklar gözlenirken, immünboyamalar ile $A\beta$ birikimleri ve astroglial aktivasyon saptanmıştır. Tedavi uygulanan AHR grubunda ise hücre yapılarının normale döndüğü ve $A\beta$ birikimleri ile astrosit aktivasyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Elektrofizyolojik incelemeler AH grubunda işitsel ayırım ve ekoik hafızayla ilişkili süreçlerin etkilendiğine işaret ederken, rosmarinik asit uygulamasının bu fonksiyonlar üzerinde iyileştirici etkisi olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda, $A\beta$ 42 peptidinin oksidan-antioksidan dengesi, kolinerjik belirteçleri ve işitsel süreçlerle ilişkili nöral ağ dinamiklerini etkilediği saptanmış, rosmarinik asitin bu parametrelerde düzelme sağladığı ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Amiloid beta,Rosmarinik asit, Lipid peroksidasyon, Antioksidan sistem, Kolinerjik sistem, İşitsel olaya ilişkin potansiyel.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is a common type of dementia characterized as a progressive defectiveness in cognition and behaviour. It is known that amyloid beta peptide ($A\beta$) polymerization and accumulation of amyloid fibrils play a role in the pathophysiology of Alzheimer's Disease. In the present study, we examined the effects of antioxidant properties of rosmarinic acid to the complications of AD by electrophysiological, histological and biochemical analysis.

In our work, 100 wistar rats are divided randomly into four groups; Sham(S), Sham+ rosmarinic acid (SR), $A\beta$ 42 peptide (AH) and $A\beta$ 42 peptide+ rosmarinic acid (AHR) groups. Alzheimer model rats (AH and AHR) were administered with $A\beta$ 42 peptide (2,2 nmol/10 μ l) intracerebroventricularly. SR and AHR groups were received 50mg/kg/day rosmarinic acid via gavage for two weeks. At the end of the experimental period, auditory event related potentials were recorded and then histological and biochemical analysis were performed in the brain tissues.

Increased TBARS and 4-HNE values were detected in Alzheimer group compared to the S and SR groups and rosmarinic acid decreased lipid peroxidation to the control levels in the AHR group. Furthermore, antioxidant enzyme activities (SOD, CAT, GSH-Px) were attenuated in the AH group, rosmarinic acid treatment was prevented this attenuation in the AHR group. Similarly, decreased GSH level in the AH group versus the S and SR groups was increased but not reached to the control level in the rosmarinic acid treated AHR group. Also, $A\beta$ impaired the cholinergic system by reducing the amount of ACh and AChE activity, and rosmarinic acid reversed these effects in the AHR group. Beside, ultrastructural and immunohistochemical analysis showed histopathological alterations, significant $A\beta$ deposition and astrocyte activation in the AH group. Attenuated $A\beta$ deposition, astrocyte activation and preserved cell structure were observed in the AHR group. Electrophysiological results indicate that $A\beta$ 42 peptide can affect the auditory discrimination and ecoic memory processes, and the treatment of rosmarinic acid can improve the $A\beta$ 42 related alterations in these functions.

In conclusion, our study clearly showed that $A\beta$ 42 peptide affect antioxidant-oxidant balance, cholinergic markers and neurol network dynamics of auditory processes and rosmarinic acid has curative effect on the alterations detected in these parameters.

Key words: Amyloid beta, Rosmarinic acid, Lipid peroxidation, antioxidant system, cholinergic system, auditory event related potential.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimibenim için bilimsel sorulara nasıl yaklaşılacağı, bilimsel araştırma yöntemlerini öğreten, sorgulayıcı ve yaratıcı düşünme ve sistematik çalışma becerisi edindiğim, bilimle uğraşmanın bir meslek olmaktan ziyade insanın kimliğine nüfuz eden, dünyaya bakışını değiştiren bir şey olduğunu anlamamı sağlayan vekişisel gelişimim adına birçok şey kazandığım eşsiz bir dönemdi. Bu süre zarfında benim her zaman yanımda olan, kendisinden çok şey öğrendiğim ve ayrıca bu araştırmanın gerçekleşmesinde yol gösteren ve araştırmanın her aşamasında destek olan değerli hocam Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Ayrıca, bu araştırmanın gerçekleşmesine katkı sağlayan Doç. Dr. Güzide Ayşe GÖKHAN OCAK'a, bana her aşamada yardımcı olan çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Enis HİDİŞOĞLU'na, Uzm. Hakan ER'e, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Narin DERİN hocam ve personeline teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak da, beni hayatları boyunca koşulsuz seven aileme ve çalışmalarımda bana yardımcı olanve doktora sürecimde beni anlayışla destekleyenhayat arkadaşım Vedat GÖK'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	7
2.1. Alzheimer Hastalığı	7
2.2. Alzheimer Hastalığı Etiyolojisi: Genetik, Epigenetik ve Epidemiyoloji	7
2.3. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi	8
2.3.1. Amiloid kaskad hipotezi, Amiloid Beta ve diğer APP Metabolitleri	9
2.3.2. Nöronal Sitoiskelet Hipotezi	11
2.3.3. Alzheimer Hastalığı Kolinerjik Hasar Hipotezi	12
2.2.4. Alzheimer Hastalığı Oksidatif Stres Hipotezi	14
2.4. Alzheimer Hastalığında Apolipoprotein E4 Allelinin Rolü	21
2.5. Alzheimer Hastalığında Kognitif Bozukluğun Temeli	22
2.6. Alzheimer Hastalığında Terapötik Yaklaşımlar	24
2.6.1. Kolinesteraz İnhibitörleri	24
2.6.2. Amiloid β Hedefli Tedavi Stratejileri	24
2.6.3. Tau Hedefli Tedavi Stratejileri	26
2.6.4. Apolipoprotein E Hedefli Tedavi Stratejileri	27
2.6.5. Metal Şelatörleri	27
2.6.6. N-metil-D-aspartik asit Reseptör Antagonist	28
2.6.7. Antioksidanlar	28

2.6.8.	Rosmarinik Asit	29
2.7.	Alzheimer Hastalığı ve Beyin Sinyalleri	31
2.8.	Uyumsuzluk Negativitesi	33
2.8.1.	Uyumsuzluk Negativitesinin Nöronal Mekanizması	33
2.8.2.	Uyumsuzluk Negativitesi ve Osilasyonlar	37
2.8.3.	Uyumsuzluk Negativitesi ve Dikkat İlişkisi	37
2.8.4.	Uyumsuzluk Negativitesi ve Klinik Uygulamalar	37
2.8.5.	Uyumsuzluk Negativitesi ve Alzheimer Hastalığı	38
2.8.6.	MMN ve Hayvan Deneyleri	39
GEREÇ VE YÖNTEM		41
3.1.	Gruplandırma	41
3.2.	Deney Protokolü	41
3.3.	İşitsel Uyarılma Potansiyellerinin Kaydedilmesi	42
3.4.	Olaya İlişkin Potansiyellerin Analizi	43
3.4.1.	Olaya İlişkin Potansiyellerin Matematiksel Analizleri	43
3.5.	Biyokimyasal Yöntemler	45
3.5.1.	Doku Tiobarbitirik Asit Reaktif Ürünlerinin Ölçümleri	45
3.5.2.	Protein Tayini	46
3.5.3.	4-Hidroksi 2- Nonenal Seviyesinin Tayini	46
3.5.5.	Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivite Tayini	47
3.5.6.	Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivite Tayini	48
3.5.7.	Glutasyon Tayini	49
3.5.8.	Katalaz Enzim Aktivite Tayini	50
3.5.9.	Asetilkolin/Asetilkolinesteraz Tayini	51
3.6.	İmmünohistokimyasal Analizler	52
3.7.	Elektron mikroskobu incelemesi	53
3.8.	Sonuçların Değerlendirilmesi	53
BULGULAR		54
4.1.	Genel Görünüm	54
4.2.	Ağırlık Değişimi	54
4.3.	Doku Tiobarbitirik Asit Reaktif Ürünleri Sonuçları	54

4.4.	4-Hidroksi 2- Nonenal Aktivitesi Sonuçları	55
4.5.	Süperoksit Dismutaz Enzim Aktiviteleri Sonuçları	56
4.6.	Katalaz Enzim Aktivitesi Sonuçları	56
4.7.	Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi Sonuçları	57
4.8.	Glutasyon Sonuçları	58
4.9.	Asetilkolin Sonuçları	58
4.10.	Asetilkolinesteraz Aktivitesi Sonuçları	59
4.11.	İmmuhistokimyasal Boyama Sonuçları	60
4.12.	Elektron mikroskop Analizi Sonuçları	64
4.13.	Olaya İlişkin Potansiyel (OİP) ve Uyumsuzluk Negativitesi (MMN) Sonuçları	67
TARTIŞMA		79
SONUÇLAR		86
KAYNAKLAR		87
ÖZGEÇMİŞ		112

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AH	:	Alzheimer Hastalığı
NFT	:	Nörofibril yumaklar
Aβ	:	Amiloid beta
APP	:	Amiloid prekürsör protein
α-APPs	:	Alfa sekretuar amiloid prekürsör protein
βAPP	:	Beta amiloid prekürsör protein
APPICD	:	İntraselüler domain amiloid prekürsör protein
fAβ	:	Fibriller amiloid beta
BACE	:	Beta sekretaz enzimi
PS	:	Presenilin
ADAM	:	Disintegrin ve metalloproteinaz
GFAP	:	Glial fibriller asidik protein
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
NFκB	:	Nükleer faktör kappa Beta
SOD	:	Süperoksit dismutaz
CAT	:	Katalaz
GSH	:	Glutasyon
GSH-Px	:	Glutasyon peroksidaz
MDA	:	Malondialdehit
4-HNE	:	4-hidroksi-2-nonenal
TBA	:	Tiyobarbitürik asit
TBARS	:	Tiyobarbitürik asit reaktif türleri
ChAT	:	Kolin asetiltransferaz
ACh	:	Asetilkolin
AChE	:	Asetilkolin esteraz
mAChR	:	Muskarinik asetilkolin reseptörü
nAChR	:	Nikotinik asetilkolin reseptörü
AChEIs	:	Asetilkolin esteraz inhibitörleri
EEG	:	Elektroensefalografi
OİP	:	Olaya ilişkin potansiyel
UP	:	Uyarılmış potansiyel
LTP	:	Uzun süreli güçlenme
MMN	:	Uyumsuzluk negativitesi
RA	:	Rosmarinik asit

APOE	:	Apolipoprotein E
AGE	:	İleri glikasyon son ürünleri
RAGE	:	İleri glikasyon son ürünleri reseptörü
Ca²⁺	:	Kalsiyum
Fe⁺²	:	Ferröz demir
Fe⁺³	:	Ferrik demir
Cu⁺²	:	Bakır iyonu
Cu	:	Bakır elementi
O₂^{•-}	:	Süperoksit anyonu
OH[•]	:	Hidroksil radikali
NO	:	Nitrikoksit
H₂O₂	:	Hidrojen peroksit
PKC	:	Protein kinaz C
iNOS	:	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
GSK	:	Glikojen sentaz kinaz
JNK	:	c-Jun N-terminal kinaz
NMDA	:	N-metil D-aspartat
PIB	:	Pittsburg molekülü
FDA	:	Amerikan gıda ve ilaç cemiyeti
NEP	:	Neprilisin
IDE	:	İnsulin degrade edici enzim
ECE	:	endotelin çevirici enzim
ACE	:	angiotensin dönüştürücü enzim
ERK	:	Ekstraselüler sinyal regüle kinaz
MAPK	:	Mitogen aktive protein kinaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2. 1. Alzheimer Hastalığı Etiyolojik Mekanizmalar	8
2. 2. Amiloid prekürsör proteininin kesilme basamakları	9
2. 3. Amiloid kaskad hipotezi ile ilişkili diğer mekanizmalar	11
2. 4. Merkezi Sinir Sisteminde Hiyerarşik Yapıların ve Bağlantıların Şematik Gösterimi	36
3. 1. $x(t)$ sinyalinin T zamandaki örnek görünümü. R_{xx} : Otokorelasyon fonksiyonunun matematiksel ifadesi, S_{xx} : Güç spektral yoğunluk fonksiyonunun matematiksel ifadesi.	44
4. 1. Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin TBARS değerleri	55
4. 2. Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin 4-HNE değerleri	55
4. 3. Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin SOD aktivitesi değerleri	56
4. 4. Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin CAT aktiviteleri	57
4. 5. Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin GSH-Px aktiviteleri	57
4. 6. Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin GSH aktiviteleri	58
4. 7. Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin ACh değerleri	59
4. 8. Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin AChE aktiviteleri	59
4. 9. Sham ve deney gruplarında immünohistokimyasal A β boyama sonuçları	61
4. 10. Sham ve deney gruplarında immünohistokimyasal GFAP boyama sonuçları	62
4. 11. Sham ve deney gruplarında immünohistokimyasal sinaptofizin boyama sonuçları.	63
4. 12. Sham ve deney gruplarında bazal önbeyinde elektron mikroskopu incelemeleri	64
4. 13. Sham ve deney gruplarında işitsel korteksde elektron mikroskopu incelemeleri	65
4. 14. Sham ve deney grubu hayvanlarından kaydedilen OİP'ler ve bileşenleri (ISI:375 ms)	67
4. 15. Sham ve deney grubu hayvanlarından kaydedilen OİP'ler ve bileşenleri (ISI:600 ms)	68

TABLULAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
4. 1. Sham ve deney grubu hayvanlarının ağırlık değişimleri.	54
4.2. Sham ve deney grubu hayvanların biyokimyasal sonuçları	66
4. 3. Sham ve deney grubu hayvanlarından 375 ms ISI değerinde standart ve nadir uyarıya yanıt olarak ortaya çıkan OİP bileşenlerinin latensleri (ms)	69
4. 4. Sham ve deney grubu hayvanlarından 600 ms ISI değerinde standart ve nadir uyarıya yanıt olarak ortaya çıkan OİP bileşenlerinin latensleri (ms)	70
4. 5. Sham ve deney grubu hayvanlarından 375 ms ISI değerinde standart ve nadir uyarıya yanıt olarak ortaya çıkan tepeden tepeye OİP genlikleri (μV)	72
4. 6. Sham ve deney grubu hayvanlarından 600 ms ISI değerinde standart ve nadir uyarıya yanıt olarak ortaya çıkan tepeden tepeye OİP genlikleri (μV)	73
4. 7. Sham ve deney gruplarına ait MMN yanıtları (μV)	74
4. 8. Sham ve deney grupları güç değerleri (μV^2)	76
4. 9. Sham ve deney grupları delta bandı koherans değerleri (z-değeri)	77
4. 10. Sham ve deney grupları teta bandı koherans değerleri (z-değeri)	78

GİRİŞ

Yirminci yüzyılda tıptaki gelişmelere paralel olarak yaşlı popülasyonun hızla artması ve toplumda önemli konumlarda aktif görev alan bireylerin yaş ortalamasının yükselmesi demansı önemli bir sağlık problemi haline getirmiştir. Bu nedenle hafıza kaybına yol açan bilişsel hastalıkların ayırteıcı tanısının konulabilmesi ve hastalıkların ilerleyişinin önlenmesi öncelikli bir araştırma konusu olarak ön plana çıkmıştır. Yapılan incelemeler Alzheimer hastalığının (AH) yaşlı popülasyonu oluşturan 65 yaş üzeri kişilerde görülen tüm demans vakalarının %80 'ini oluşturduğunu göstermektedir[1]

Alzheimer hastalığı hafıza kaybını takiben ilerleyen bilişsel bozukluğa paralel olarak davranışlarda ve yaşamsal fonksiyonlarda çok yönlü problemlere yol açan ve ölümlle sonuçlanan nörodejeneratif bir hastalıktır.

Dr. Alois Alzheimer'ın 1907'de gerçekleştirdiği öncü çalışmalardan bu yana nöropatologlar otopsi incelemelerinde hastaların beyinde amiloid plakları ve nörofibril yumakları (NFT) belirlemiş ve hastalığa bu patolojilerin neden olduğunu ifade etmişlerdir[2]. Amiloid plakların beyin parankimasında ve serebral kan damarlarında bulunan ekstraselüler amiloid beta (A β) birikimleri olduğu bulunmuştur. Hücre içinde gözlenen NFT'lerin ise mikrotübüllerle ilişkili tau proteininin hiperfosforile olarak helikal filamentler halinde kümelenmesinden oluştuğu belirlenmiştir[1]. Amiloid plaklar ve NFT'lere ilave patolojik veriler hücre içinde granülovakuoler dejenerasyon, sinaps sayısında azalma, Meynert'in bazal nükleusunda oluşan kolinerjik hücre kayıpları ve astroglial aktivasyon şeklinde sıralanabilir[3].

Günümüze kadar yapılan çalışmalardan elde edilen kanıtlar bu iki temel patoloji bulgusu yanı sıra hastalığının multifaktöriyel, heterojen bir hastalık olduğuna işaret etmektedir[4]. Hastalığın patogenezisini açıklamaya yönelik birden çok hipotez ortaya atılmıştır[5]. Literatürde en yaygın kabul gören hipotez amiloid kaskad hipotezidir. Bu hipotezde amiloid prekürsör proteininin (APP) ardı ardına β ve gamma sekretazlarla kesilmesiyle oluşan A β 40 ve 42 peptidlerinin miktarındaki artışın patolojik basamakları tetiklediği öne sürülmektedir[6]. Bu peptid oligomerlerinin fibril yapıları oluşturup uzadığı ve β -sheet yapısında birikimler oluşturarak amiloid plakları meydana getirdiği bilinmektedir. Amiloid β artışını takiben hücre içi sinyal yollarının aktivasyon neticesinde tau proteininin fosforilasyonunun gerçekleştiği ve NFT'lerin geliştiği ifade edilmiştir. Yapılan birçok çalışmada A β peptidlerinin çok yönlü toksik etkileri gösterilmiştir[6]. Bu peptidlerin doğrudan ya da çeşitli patolojik mekanizmalar aracılığıyla reseptörler, taşıyıcılar, enzimler gibi önemli fonksiyonel biyomoleküllerin işlevleri bozarak sinyal iletimini

bozduğu ve sitotoksisteye neden olduğu bulunmuştur[7, 8]. Ayrıca, Aβ 'nın fibriller oluşturup lokal mikrogliya ve astrositleri aktive ettiği, bu hücrelerden salınan moleküllerin nöronlarda nörotoksik etkiler yaratarak dejenerasyona katkı sağladığı bilinmektedir[9]. Sonuç olarak nöron soma ve dendritlerinde gelişen yapısal ve fonksiyonel değişiklikler, nöron kaybına, birçok nörotransmitterin eksikliğine ve biyokimyasal değişikliklere neden olmaktadır. Neticede sinaptik fonksiyonların bozulmasıyla başlayan tüm bu basamaklar, nöron kaybı ve diffüz atrofi ile sonlanmaktadır.

Alzheimer hastalığında nörodejenerasyona yol açan moleküler mekanizmalara yönelik araştırmalar sonucunda hastalıkta rol olan birçok patojenik faktör ortaya konmuştur. Egzito toksite, kalsiyum (Ca^{+2}) dengesindeki bozulma, mitokondriyel disfonksiyon, nöroinflamasyon ve oksidatif stres bu faktörler arasında yer almaktadır[10, 11]. Yapılan çalışmalar sonucunda bu mekanizmaların aynı anda tetiklendiği ve birçok seviyede birbirine etki ettiği fikrine ulaşılmıştır. Bu yönden birçok patofizyolojik olaya ikincil olarak ortaya çıkan oksidatif stresin AH patogenezinde ve ilerlemesinde belirleyici bir etken olması en doğal beklentidir. Nitekim, literatürde redoks dengesindeki bozulmanın hastalığın erken evrelerinde etkili olduğunu ve birçok sinyal yolunun aktivasyonunda rol alarak hastalığın ilerleyişinde yer aldığını gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır[12, 13]. Ayrıca, Alzheimer hastalarında biyomoleküllerin oksidasyonunu gösteren belirteçlerin seviyesindeki artış pek çok çalışmada gösterilmiştir[8, 14]. Tüm bu bulgular AH'de oksidatif stresin hastalığın oluşumu ve ilerlemesinde temel bir faktör olduğunu ifade eden oksidatif stres hipotezini desteklemektedir.

Alzheimer hastalığında artan oksidatif stresin en önemli nedeni Aβ peptidinin yol açtığı reaktif oksijen türleri (ROS) üretimidir. Amiloid β peptidinin okside olarak serbest radikal oluşumunda rol aldığı, direk olarak membran bileşenleri ile etkileşip lipid peroksidasyonu indüklediği gösterilmiştir[15, 16]. Amiloid β'nin indüklediği lipid peroksidasyona paralel olarak 4-hidroksinonenal (4-HNE) artışının da önemli membran proteinlerinin fonksiyonlarını etkileyip iyon transferini ve Ca^{+2} homeostazisini bozarak da ROS artışına yol açtığı tespit edilmiştir[8, 17]. Ayrıca, Aβ peptidinin redox aktif metallerle karşı yüksek afiniteye sahip olduğu ve onları indirgeyerek hidrojen peroksit (H_2O_2) ve okside Aβ oluşumuna neden olduğu saptanmıştır[18]. Bunun yanısıra Aβ fibrillerinin nükleer faktör kapp beta (NFκβ) aktivasyonu, mitokondriyel fonksiyon bozukluğu, proteinlerin glikasyonu ve tau nitro-oksidasyonu gibi indirek mekanizmalarla da oksidatif stresi arttırdığı bilinmektedir[13, 19]. Bu bulgular, AH'nin patogenezinde Aβ peptidinin indüklediği serbest radikallerin rolünü desteklemektedir.

Alzheimer hastalığında artan oksidatif stresin yanı sıra antioksidan enzim düzeylerinde belirli beyin bölgelerinde değiştiği bulunmuştur. Beyindeki önemli antioksidan savunma sistemlerinin süperoksit dismutaz (SOD)-katalaz (CAT) ve glutatyonla (GSH) ilişkili glutatyon peroksidaz (GSH-Px)-glutatyon redüktaz sistemleri olduğu bilinmektedir. Alzheimer hastalarında gerçekleştirilen otopsi çalışmalarında serebral korteksde SOD aktivitesinin azaldığını, arttığını ya da değişmediği gösteren

çelişkili sonuçlar elde edilmiştir[20, 21]. Yakın tarihli bir çalışmada Alzheimer hastalarında ve hafif bilişsel bozukluk gözlenen yaşlı bireylerde serum SOD enzim aktivitesinin azaldığı ve buna paralel şekilde malondialdehit (MDA) seviyesinin arttığı belirlenmiştir[22]. Benzer şekilde AH'de CAT aktivitesini belirlemeye yönelik çalışmalarda da çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Zira, hastalarda frontal, temporal korteksde artan CAT aktivitesini gösteren çalışmaların yanı sıra[23], parietotemporal, basal ganglia ve amigdala bölgelerindeki azalan CAT aktivitesini gösteren çalışmalarda mevcuttur[20, 24]. Bunlara ilaveten AH'de farklı beyin bölgelerinde GSH-Px aktivitesinin azaldığına, arttığına ya da değişmediğine işaret eden çalışmalarda mevcuttur[23-25]. Ayrıca, GSH-Px aktivitesine bağlı antioksidan etkide rol alan GSH molekülünün de seviyesinin Alzheimer hastalarında azaldığı ve GSH seviyesinin bilişsel skorlarla oldukça korele olduğu belirlenmiştir [26]. Hayvanlarda gerçekleştirilen çalışmalarda Aβ peptidinin SOD ve CAT enzimlerinin aktivitelerinde değişime yol açtığı belirlenmiştir [27]. Bunlara ilaveten Aβ 42'nin ventriküler enjeksiyonunun hipokampüsde GSH miktarını arttırdığını, temporal ve parietal kortekslerde ise değiştirmedini gösteren bulguların yanısıra hipokampüs, parietal korteks ve piriform korteks alanlarında GSH miktarını ve GSH-Px ekspresyonunu azalttığı bildirilen bulgular da bulunmaktadır[28]. Çalışmamızda Aβ 42 peptidinin antioksidan enzimlere ve GSH düzeyine etkisiyle ilişkili bu çelişkili sonuçların aydınlatılması amaçlanmıştır.

Alzheimer hastalığının en önemli etkilerinden biri de öğrenme ve hafızanın azalmasıdır. Hastalardaki otopsi çalışmalarında bazal önbeyinde tespit edilen ciddi düzeydeki kolinerjik nöron kaybı, kolinerjik ileti bozukluğunun hastalıkta gözlenen öğrenme ve hafıza kaybının temel patofizyolojik mekanizması olduğunun düşünülmesine yol açmıştır[29, 30]. Günümüze kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde hastalığın erken dönemlerinde kolinerjik depresyonun varlığıyla ve hastalığın etiolojisindeki rolüyle ilişkili birbiriyle çelişen pek çok yayın dikkati çekmektedir[31, 32]. Günümüzde kolinerjik zayıflamanın hastalığın yegane nedeni olmamakla birlikte hastalığın patofizyolojisinde etkili olduğu görüşü yaygın olarak kabul edilmiştir. Hastalığın gelişimi sırasında kolinerjik aktivitede azalma olduğunu gösteren kanıtlar dikkate alınarak kolinerjik sistemin nörokoruyucu etkisinin ortadan kalkmasının beynin diğer toksik etkenleri kompanse etme yeteneğini zayıflatarak hastalığın gelişimini kolaylaştırdığı düşünülmektedir[33]. Zira, AH'de neokortekse pek çok kolinerjik projeksiyonu olan bazal önbeyindeki kolinerjik hücre kaybına dayalı olarak serebral korteks alanlarındaki kolinasetil transferaz (ChAT) ve asetilkolin esterase (AChE) enziminin aktivitesinin azaldığı bulunmuştur[29, 30, 32]. Bununla birlikte, peptidin asetilkolin (ACh) metabolizması üzerindeki etkisini anlamaya yönelik nöronal hücre kültürü çalışmalarında ise birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bazı hücre kültürü çalışmalarında Aβ peptidinin ACh seviyesini ChAT aktivitesinin inhibisyonuna bağlı olarak azalttığı bildirilirken[34, 35], diğer çalışmalarda ACh seviyesindeki azalmaya karşın ChAT aktivitesinde bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir[36]. Bu çelişkili sonuçlar, kullanılan Aβ peptidinin doz ve moleküler yapısındaki değişikliklerin farklı hücresel etkilere yol açmasından kaynaklanabilir. İn vivo araştırmalarda ise Aβ 25-35 peptidinin medial septumda ACh salınımını azalttığı, Aβ 42 peptidinin bazal önbeyin ve kortekste ChAT reaktivitesini

azalttığı gösterilmiştir[37]. Amiloid β peptidinin toksik etkilerine karşı kolinerjik nöronların daha duyarlı olduğu bilinmekle birlikte bunun nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. Amiloid β 'nin neden olduğu kolinerjik nöron hasarında çeşitli membran reseptörleri aracılığıyla artan ROS, inflamatuvar araçların üretimi ve değişen hücre içi Ca^{+2} seviyesi gibi mekanizmaların etkili olabileceği düşünülmektedir[38, 39]. Sonuç olarak A β 'nin kolinerjik nörokimyasal fonksiyonları nöron dejenerasyonundan bağımsız bir şekilde etkilediği düşünülmeyle birlikte bu etkinin mekanizması ve oksidan stres ile ilişkisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Literatürde bu konu ile ilgili çelişkili bilgilerin olması nedeniyle planlanan çalışmamızda, A β 42 peptidinin kolinerjik sistem üzerine etkilerinin değerlendirilmesi ve oksidatif stresin bu basamaklardaki rolünün belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Son yıllarda yapılan araştırmalarda elektroensefalografi'nin (EEG) tanı yöntemi olarak kullanılmasının yanı sıra, bilişsel süreçler hakkında yüksek zamansal çözünürlükte bilgi içerdiği için AH ve diğer kognitif hastalıkların patogenezi ortaya koymaya yönelik çalışmalarda kullanılabilir güçlü bir teknik olduğu belirtilmiştir[40]. Diğer yandan, spontan EEG'nin belirli periyotlarını inceleyerek elde edilen bilgilerin sınırlı olması nedeniyle yakın zamanda AH ile ilişkili çalışmalarda beyin fonksiyonlarının göstergesi olarak daha çok olaya ilişkin potansiyeller (OİP) incelenmiştir. Alzheimer gibi çeşitli nörolojik hastalıkların patogenezi aydınlatmaya çalışan çalışmalarda OİP sinyallerinin, AH ile ilgili erken işaretlerin belirlenip uygun terapötik yaklaşımların geliştirilmesinde ve hastalığın prognozunun takibinde güvenilir bir biyogösterge olabileceği belirtilmiştir [41-44]. Bu bilgilerin ışığı altında çalışmamda A β indüklü AH modeli oluşturulan sıçanlardan kaydedilecek işitsel OİP'lerde oluşacak değişikliklerin araştırılması hedeflenmiştir. Beyin dalgalarını incelemek amacıyla güç spektrumu ve koherans analizleri kullanılan en önemli matematiksel yöntemlerdir. Güç spektrumu analizi yardımıyla zaman boyutundaki sinyali oluşturan farklı frekans bileşenlerinin genliği bulunabilmektedir. Yayınlanan birkaç OİP çalışmasında AH hastalarında sol frontal ve santral alanların en fazla etkilenen bölgeler olduğu ve santral bölgede en çok etkilenen frekans bantlarının delta ve teta bantları olduğu ifade edilmiştir [45, 46].

Alzheimer hastalarından kaydedilen görsel OİP'lerin güç spektrumları incelendiğinde delta bandındaki pik genliğinin santral bölgelerde [46], işitsel OİP'lerin analizi ile de delta bandının genliğinin frontal bölgelerde azaldığı saptanmıştır [47]. Ayrıca, farklı bölgelerden elde edilen salınımlar arasındaki koherans incelendiğinde bilişsel görevler sırasında azalan alfa, delta ve teta koherans değerlerinin kortiko-kortikal bağlantıların hastalığa bağlı olarak zayıflamasıyla ilişkili olabileceği vurgulanarak, AH'de bilişsel stimülasyon sonrası düşük frekans bantlarındaki koherans fonksiyonunun tüm diğer elektrofizyolojik parametrelerden daha çok etkilendiği öne sürülmüştür [42]. Literatürde AH hayvan modelleriyle ilgili yayınlarda daha çok spontan EEG çekimlerinin yer aldığı, OİP'nin kaydedilmesine yönelik çalışmaların ise oldukça sınırlı olduğu dikkati çekmektedir. Bu çalışmalardan birinde Alzheimer transjenik fare türlerinde spontan EEG kortikal teta aktivitesinin azaldığı, beta ve gamma aktivitelerinin yükseldiği [48], diğer bir araştırmada da kolinerjik nöronların hasarlanması ile gerçekleştirilen AH modelinde hipokampus ve neokortekste azalan kolinerjik aktivite ve bilişsel bozukluklar ile

birlikte spontan EEG paterninde yavaş dalgaların gücünün arttığı, hızlı dalgaların gücünün ise azaldığı gözlenmiştir[49].

Bu bulgular bazal önbeyinde bulunan nöronal ağın, spontan EEG aktivitesinin korunmasındaki önemli rolünün olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca bazı transgenik hayvanlarda ve A β indüklü modellerde hipokampal teta aktivitesinin azaldığı[48, 50], bazal önbeyinde ise A β 'nın teta ritmini bozduğu belirlenmiştir[51]. Daha önceki çalışmalara bakıldığında A β peptidinin kortikal OİP parametreleri üzerindeki etkilerine yönelik herhangi bir yayının olmaması bu potansiyel kayıtlarını içeren projemizin orijinal olduğunu işaret etmektedir. Dolayısıyla çalışmamız A β 42 peptidinin toksik etkilerinin ve bu etkileri azaltmaya yönelik tedavi yaklaşımlarının araştırılmasında biyokimyasal ve histolojik değişimlere paralel olarak beyin dinamiklerindeki değişikliklerin incelenmesi amacıyla planlanmıştır.

Alzheimer hastalığının multifaktöriyel etiyolojiye sahip olup, hastalıkta rol alan moleküler mekanizmaların birbiriyle içiçe geçmiş kompleks etkileşimler gösterdiği bilinmektedir[52]. Hastalığın sınırlı tedavi seçenekleri düşünüldüğünde, çoklu biyolojik aktiviteye sahip bileşiklerin terapötik etkinliklerinin anlaşılması oldukça önemlidir. Bu sebepten hastalığı yavaşlatan yada durduran yeni ilaçların geliştirilmesi için faydalı etkileri olan toksisitesi düşük bitkilere odaklanılmıştır. Özellikle, medikal bitkilerle ilgili eski avrupa referans kitaplarında adı geçen *salvia officinalis*'in kolinerjik aktiviteyi artırdığı ve hafıza geliştiren özellikleri olduğu belirlenmiştir [53]. Yüzyıllardır bitkisel ilaç olarak kullanılan *salvia officinalis*'in ticari ekstraktları farklı miktarlarda (yaklaşık % 10) doğal fenolik bir bileşik olan rosmarinik asit (RA) içermektedir. Rosmarinik asitin antioksidan, anti-inflamatuar özellikleri çeşitli deney sistemlerinde in vivo ve in-vitro olarak ortaya konulmuştur[54, 55]. Rosmarinik asidin AH hastalığındaki terapötik potansiyelini incelemeye yönelik çalışmalar bu molekülün kısa bir karbon zinciriyle bağlı iki fenol halkasının serbest A β 'ya bağlanarak, A β 'nın fibriller A β (fA β)'ya polimerizasyonunu inhibe ettiğini, ya da bu yapının fA β 'ya bağlanarak fA β 'daki A β moleküllerinin β -sheet konformasyonunu destabilize ettiğini öne sürmekte ve anti-amiloidojenik aktivitesine vurgu yapmaktadır [56]. Zira, yakın zamanda gerçekleştirilen bir çalışmada AH transjenik farede RA uygulamasının A β oligomerlerinin miktarını ve A β birikimlerini azalttığı gözlenmiş, polifenollerin AH'deki koruyucu etkilerinin A β kümelenmesinin önlenmesi ile açıklanabileceği ifade edilmiştir [57]. Ancak, bu bileşiğin çeşitli çalışmalarda gözlenen terapötik özelliklerinin anti-amiloidojenik etkilerine alternatif mekanizmalarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Rosmarinik asitin PC12 hücrelerinde A β 42 indüklü ROS oluşumunu ve lipid peroksidasyonu doz bağımlı olarak azaltıp antioksidan özelliği ile hücre ölümünü önlemesi bu fikri desteklemenin yanı sıra, bu doğal bileşiğin A β kaynaklı oksidatif hasara karşı temel nöroprotektif ajan olarak tedavi amacıyla kullanılabileceğini ortaya koymuştur[58]. Ayrıca, kolinerjik aktiviteye etkilerinin incelendiği çalışmalarda in vitro bir deneyde RA'nın AchEaktivitesini inhibe ettiği gösterilirken, PC12 hücrelerinde RA içeren *R.officinalis* ekstraktının Ach miktarını ve AchE aktivitesini arttırdığı bulunmuştur[59, 60]. Bunlara ilaveten, *M.officinalis* ve *S. officinalis* gibi RA içeren bitki ekstraktlarının merkezi sinir sisteminde Ach reseptörüne bağlanarak kolinerjik aktivite gösterdiği

bilinmektedir[61]. Bu bulgular doğrultusunda, RA'nın kolinerjik sistemi ve sinaptik fonksiyonları etkileyerek yeni bir tedavi potansiyeli sağlayacağı düşünülerek AH hastalığındaki olumlu etkilerinin ortaya konması hedeflenmiştir. Diğer yandan RA'nın antioksidan özellikleri ve kolinerjik sisteme etkileri göz önüne alınırsa OİP parametrelerinde çeşitli değişikliklere yol açabileceği düşünülebilir. Literatürde A β 42'ye bağlı OİP değişikliklerinde RA'nın nasıl bir etkisi olduğunu inceleyen herhangi bir çalışmanın olmaması nedeniyle çalışmam bu yönüyle de orijinal olup literatüre yeni ve kapsamlı bilgiler katmıştır.

Sonuç olarak araştırmamızda A β 42 peptidinin oksidatif stres düzeyine, antioksidan sisteme ve kolinerjik belirteçlere etkilerinin incelenmesinin yanı sıra işitsel beyin potansiyellerinde indüklediği değişikliklerin belirlenmesiyle hastalığın mekanizmasına ilişkin yeni bilgiler ortaya konması hedeflenmiştir. Ayrıca, deneysel protokolümüz A β 42'nin tetiklediği kolinerjik sistem, oksidatif stres ve OİP değişikliklerinde RA'nın terapötik rolüne elektrofizyolojik, biyokimyasal ve patolojik parametreler yardımıyla ışık tutacaktır. Ancak, projemizde RA'nın A β indüklü patolojik değişikliklerin sadece belirli bir kısmına etkisi mercek altına alınacağından araştırmamız bir ön çalışma niteliğindedir. Zira antioksidan özelliği yanında anti-inflamatuar etkisi ve beta sekretaz ile ilişkisi dikkate alındığında, RA'nın AH'deki rolünün tam olarak aydınlatılabilmesi için çalışmamızın sonuçları doğrultusunda planlanacak daha ayrıntılı çalışmalara gereksinim olduğu açıktır. Diğer yandan A β 42 indüklü AH modelinde OİP değişikliklerinde etkisi olabilecek farklı nörotransmitter sistemlerinin de incelenmesi gerekmektedir. Bununla birlikte, projemiz bu konu ile ilgili ilk çalışma olduğu için yeni ufuklar açacaktır.

Özetle, çalışmamız

i) Amiloid β 42 indüklü Alzheimer modelinde beyin dokusunda oluşan lipid oksidasyon, antioksidan enzim düzeyi, kolinerjik sistem, bilişsel bozukluk değişikliklerinin saptanması ve işitsel beyin potansiyelleri ile ilişkisinin aydınlatılması A β 42 peptidinin beyin dinamiği ile ilişkisini ortaya koymuş, AH etyopatolojisine yönelik bilimsel araştırmalara ışık tutmuştur.

ii) Amiloid β 42 indüklü Alzheimer modelinde OİP'nin konvansiyonel parametreleri (latens ve genlik) ve spektral bileşenlerindeki değişikliklerin saptanması ve bu değişiklikler üzerine RA'nın etkilerinin ortaya konulmasıyla literatüre yeni ve kapsamlı bilgiler katılmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı hafıza ve diğer kognitif fonksiyonlarda ilerleyen bozulma ile karakterize edilen nörodejeneratif bir hastalıktır. Genellikle ortalama on sene gibi bir süre içinde hafif kognitif bozukluk evresinden ileri AH evresine geçilir ve hasta bu sürenin sonunda tamamen çaresiz bir durumda kaybedilir. Hastalığın bu uzun süresi ve kim olduğumuzu belirleyen hayati yapıları etkilemesi nedeniyle hasta yakınları ve toplum üzerinde muazzam bir duygusal ve finansal yük oluşturmaktadır. Alzheimer hastalığının sadece 2010 yılı içinde dünya çapında 604 milyon dolara mal olduğu belirlenmiştir[62]. Dünya çapındaki AH vakası sayısı şu an 36 milyondur ve önümüzdeki yıllarda bu rakamın artış hızıyla ilgili tahminler gözönüne alınırsa 2050 yılında üç katına çıkabileceği öngörülmektedir [62].

2.2. Alzheimer Hastalığı Etiolojisi: Genetik, Epigenetik ve Epidemiyoloji

Alzheimer hastalığının nedenini aydınlatılabilmek için yapılan çok yönlü incelemeler hastalığın genetik, epigenetik ve çevresel pek çok faktörün kompleks etkileşimleri sonucu ortaya çıktığına işaret etmektedir. Hastalığın patogenezinde önemli rol oynayan amiloid β peptidi, amiloid prekürsör proteininin (APP) sekretazlarla kopartılması sonucu oluşmaktadır. Amiloid prekürsör protein hemen her hücrede eksprese olan tek transmembran bölgesi olan bir proteindir. Bu proteinin α -sekretaz yoluyla kesilmesi solübl APP, ardı ardına β ve gamma sekretaz yoluyla kesilmesi ise A β peptidlerinin oluşmasına yol açar. Amiloid prekürsör protein ve gamma sekretaz enzim kompleksinin parçaları olan presenilin-1 (PS1) ve presenilin-2 (PS2) proteinlerinin genlerindeki mutasyonlar hastalığın %1'ini oluşturan erken başlangıçlı otozomal dominant AH'ye neden olmaktadır [63]. Bu mutasyonlar APP'nin sekretazlarla ilgili bölgeden kesilmesi gibi moleküler süreçleri etkileyerek üretilen amiloid peptidlerinin türünde ve oranında değişime neden olurlar [63]. Amiloid prekürsör protein geninin bulunduğu kromozom-21'in fazladan bir kopyasını taşıyan down sendromlu hastalarda da erken başlangıçlı bunama ve AH patolojik belirteçlerinin gözlenmesi [64], ayrıca APP geninin duplikasyonunun da erken başlangıçlı AH'ye neden olması [65], APP aşırı ekspresyonunun hastalığıdaki rolüne ilişkin hipotezleri desteklemektedir. Ayrıca farklı popülasyonlarda gerçekleştirilen geniş kapsamlı genetik incelemeler [63]apolipoprotein E (ApoE) 4 alelitaşıyıcılığının geç başlangıçlı AH vakalarıyla ilişkili olduğunu ve hastalığa yakalanma yaşını düşürdüğünü göstermektedir [66].

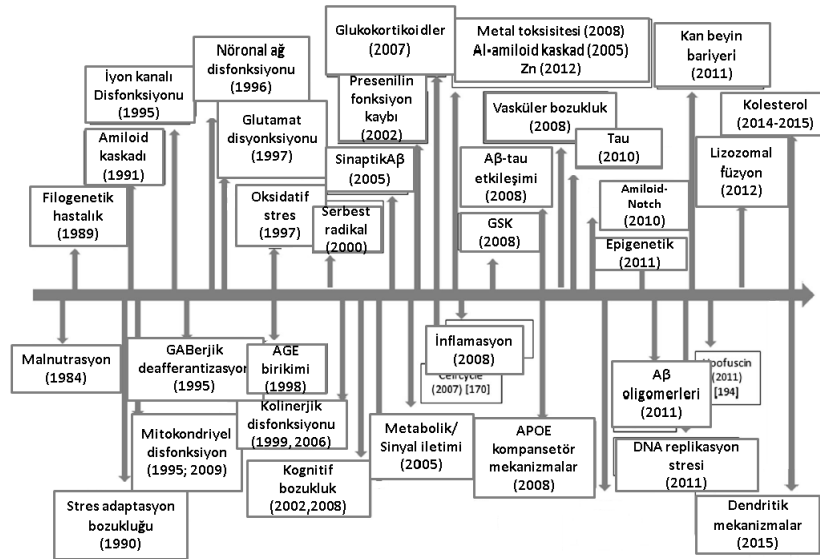
Alzheimer hastalığının patogenezinde epigenetik mekanizmalar da rol oynamaktadır[67]. İnsanlarda postmortem beyin dokularında, periferik lökositlerde ve transjenik hayvanlarda yapılan incelemeler AH'de anormal DNA metilasyonu ve

histon modifikasyonu gibi epigenetik değişimlerin varlığını belirlemişlerdir [68]. Ancak bu gözlenen epigenetik değişimlerin hastalığa yol açan bir neden mi yoksa gelişen patolojik süreçlerin bir sonucu mu olduğu kesinlik kazanmamıştır. İkizlerde gerçekleştirilen incelemeler epigenetik mekanizmaların hastalık riskini modüle ettiğine işaret etmektedir [68]. Bir öğrenme testinin hemen ardında hipokampüsteki DNA metilasyonunun inhibisyonu sağlıklı farelerde hafıza konsolidasyonunu bozarken [67], histon asetilasyonunun kuvvetlendirilmesi Alzheimer transgenik farelerde öğrenmeyi desteklemiştir [69]. Bu bulgular epigenetik modifikasyonların normal öğrenme ve hafıza süreçlerindeki ve aynı zamanda hastalığıdaki rolüne işaret etmektedir.

Geç başlangıçlı AH'de yaşlanma en önemli epidemiyolojik risk faktörüdür. Diğer potansiyel risk faktörleri kafa travması, düşük eğitim seviyesi, hiperlipidemi, hipertansiyon, diabetes mellitus, homosisteinemi, ve obezite olarak belirlenmiş olmakla birlikte [70, 71], bunların bazıları hakkında çelişkili sonuçlar olduğunu belirtmek gerekir [72].

2.3. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi

Alzheimer hastalığı özellikle serebral korteks, hipokampus, entorhinal korteks ve ventral striatum gibi kognitif fonksiyonları olan bölgelerde gözlenen ciddi sinaptik kayıplar ve nöron ölümü ile karakterize edilen oldukça kompleks bir hastalıktır [73]. Hastalarda beyin parankimasında gözlenen temel histopatolojik bulguları ekstraselüler yerleşimli amiloid plaklar, hücre içinde tau protein kümelerinden oluşan nörofibril yapılar, glial aktivasyon ve inflamasyon izleri oluşturmaktadır [74, 75]. Bu belirtilerden yola çıkarak hastalığın patogenezi hakkında pekçok mekanizma önerilmiştir (Şekil 2.1). Bunların başlıcaları amiloid kaskad hipotezi, kolinerjik hasar hipotezi, nöronal sitoskelet hipotezi [76] ve oksidatif stres hipotezi [77] şeklinde sıralanabilir.

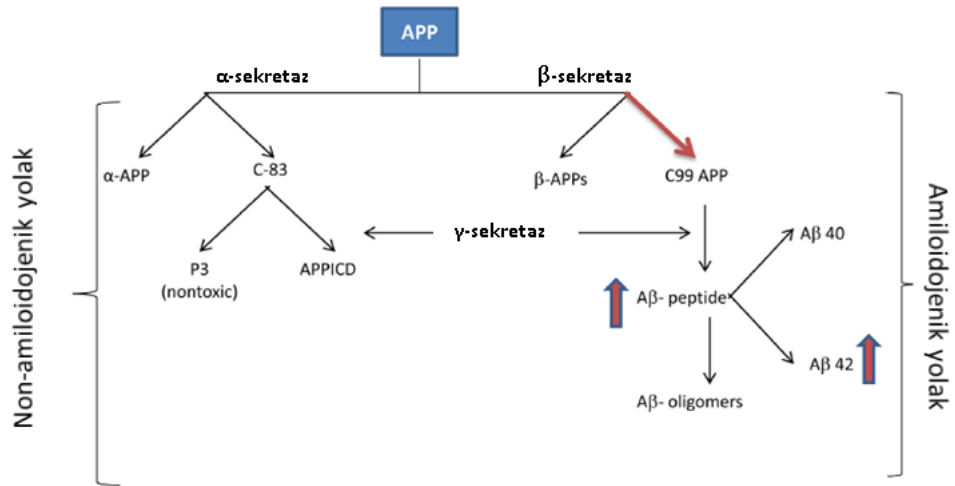


Şekil 2. 1. Alzheimer Hastalığı Etiyolojik Mekanizmalar [78]

2.3.1. Amiloid kaskad hipotezi, Amiloid Beta ve diğer APP metabolitleri

Hardy ve Higgins'in 1992 yılında yayınladığı makaleleri AH'nın nöropatolojik mekanizmasına ilişkin amiloid kaskad hipotezini ortaya attıkları öncül bir çalışmadır[79]. Makalede AH'nın temel nöropatolojik mekanizmasının amiloid plakların temel bileşeni olan A β peptidinin birikimi olduğu ve bunun sonucunda nörofibriler yumaklar, nöron ölümü ve vasküler hasarın amiloid birikimine ikincil olarak geliştiği öne sürülmüştür.

Amiloid plakların ana bileşeni olan A β peptidleri ve diğer metabolitler APP'nin proteolitik yıkımı ile oluşmaktadır[80]. Amiloid prekürsor protein ilk basamakta α -veya β -sekretaz enzimlerinden biri ile koparılır. Alfa-sekretaz APP'nin A β bölgesini etkileyerek 83 amino asit dizilimli C83 ile alfa sekretuar amiloid prekürsör proteinini (α -APPs) oluşturur. Sağlıklı bir kişide beyinde α -sekretaz aktivitesi hakim olup α -APPs salınımı daha fazladır. Beta-sekretaz enzimi ise APP'nin amino terminalini etkileyerek 99 amino asit dizilimli C99 ile beta amiloid prekürsör proteinini (β APPs) oluşturur. Daha sonra devreye giren gamma sekretaz birçok alt üniteden oluşan bir proteaz kompleksi olup tam olarak karakterize edilememiştir fakat temel olarak dört önemli proteinden oluştuğu bilinmektedir [81]. Bunlar PS1, PS2, nikastrin ve APH-1 (anterior pharynx-defective 1) proteinleridir. Bu enzim hem C83'ü hem de C99'u etkileyerek, C83'ten P3 isimli peptidi ile interselüler domain APP (APPICD)'yi ve C99'dan A β 'yi oluşturur. A β peptidleri 38, 40 ve 42 amino asit dizilimli olabilir ve " β sheet" konformasyonu ile birikirler[82](Şekil 2.2). Amiloid birikimleri " β sheet" yapısında olduğundan kolayca polimerize olarak hızla kümeler oluştururlar. Bu birikimlerin çözülebilirlikleri oldukça az olup mikroskopla incelendiğinde filamentler şeklinde görülürler ve proteoglikan ve apolipoproteinler gibi diğer proteinlerle birleşerek sitotoksik özellik gösterirler.

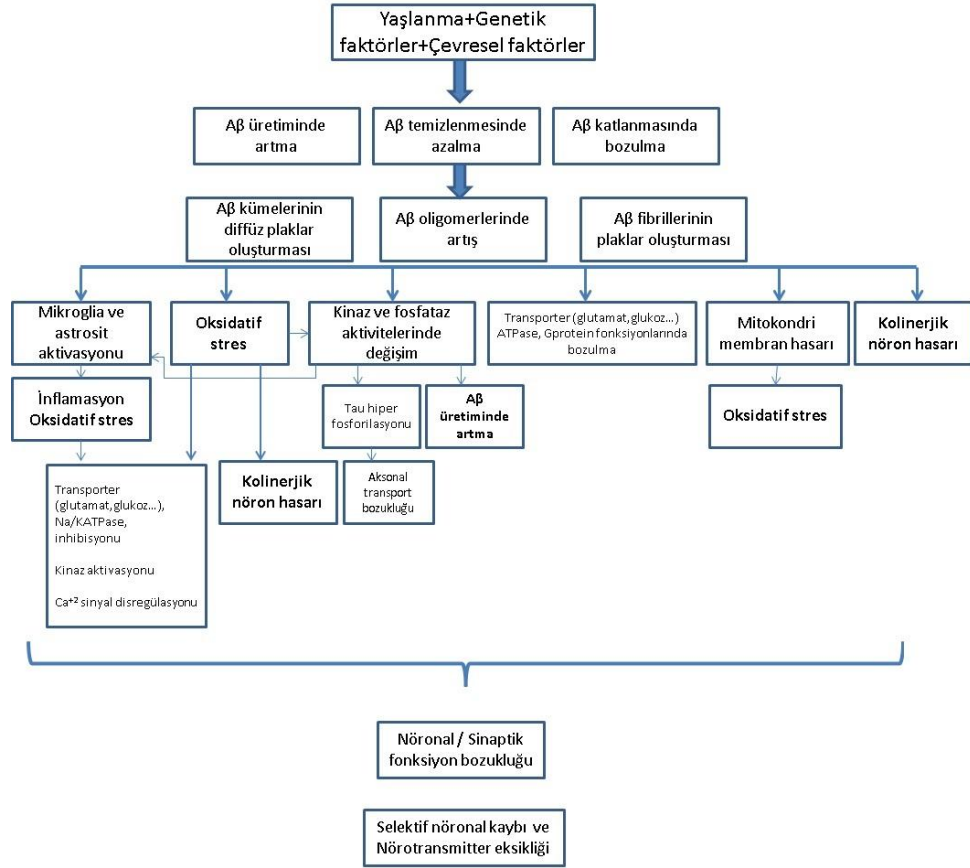


Şekil 2. 2.Amiloid prekürsör proteininin kesilme basamakları

Farklı çalışmalardan elde edilen kanıtlar APP ve A β 'nin AH patogenezi içinde nedensel role sahip olduğu görüşünü desteklemektedir. APP ve A β prosesini kontrol eden sekretazların yapısındaki presenilin proteinlerinde gerçekleşen genetik

mutasyonların A β 42 seviyesini arttırdığı saptanmıştır [83]. Erken başlangıçlı AH'de de APP, PS1 yada PS2'deki otozomal dominant mutasyonların APP metabolizmasını etkileyerek A β birikimine ve kümelenmesine yol açtığı bulunmuştur [63]. Transgenik sıçanlarda mutant insan APP'sinin tek başına yada mutant PS1 ile birlikte ekspresyonu AH benzeri moleküler ve kognitif değişimlerin tetiklenmesini sağlamıştır[84][85, 86]. Amiloid β peptidinin nöronal ve sinaptik aktivitenin düzenlenmesinde rol oynadığı ve bu nedenle birikiminin aşırı nöronal aktivite ile sinaptik depresyona yol açtığı düşünülmektedir [10]. İnhibitör internöronlardaki fonksiyonel bozulmaların ve ekzitotoksositeye neden olan aşırı glutamaterjik iletinin patojenik kaskad üzerinde rol oynayan önemli mekanizmalar olduğu bilinmektedir [10][87][88]. Bu aşırı nöronal aktivite devamında daha fazla A β peptidlerinin üretimine yol açarak nörodejeneratif bir döngüyü tetikleyebilmektedir [89]. Örneğin, PS-1'e bağlanarak gamma sekretaz trafiğini düzenleyen Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) geninin aktivasyonunun nöronal aktiviteye bağlı olarak gerçekleşen A β üretiminde rol aldığı saptanmıştır[90]. Ayrıca, A β 'nin fibriller oluşturup lokal mikroglia ve astrositleri aktive ettiği, bu hücrelerden salınan moleküllerin nöronlarda nörotoksik etkiler yarattığı bilinmektedir.

Deneyisel modellerde elde edilen kanıtlar ışığında dimer, trimer ve daha büyük oligomerler oluşturançözülebilir, fibril yapıda olmayan A β 'nin monomerik-A β ve amiloid plaklardaki A β fibrillerinden daha az patojenik olduğu ileri sürülmektedir. Ancak hangi amiloid birikiminin daha patojenik olduğu ve birikimlerinin sinaptik ve nöronal disfonksiyonu nasıl tetiklediği yapılan yoğun çalışmalar ve bilimsel tartışmaların halen tam olarak cevaplayamadığı sorulardır[91][92][10]. Bu yapıların hem hücre içinde hem de hücre dışında etkili olarak proteinlerle ve lipidlerle bağ kurabildiği belirlenmiştir. Reseptör tirozin kinazlar ve ileri glikasyon son ürünleri (advanced glycation end products, AGE) reseptörleri gibi pek çok hücre yüzeyi molekülleri A β oligomer indüklü toksisitede rol oynamaktadır[93][94]. Bu etkileşimlerin devamında tetiklenen potansiyel mekanizmalar içinde nörotransmitter reseptörlerinin ve ilgili sinyal moleküllerinin dağılımı ve aktivitelerinin değişimi [95][10, 92, 96, 97], Ca²⁺homeostazisinin [11], aksonal transportun ve mitokondriyel fonksiyonların bozulması [98-100]yer almaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2. 3. Amiloid kaskad hipotezi ile ilişkili diğer mekanizmalar

Günümüzde Alzheimer araştırmalarında bu konudaki en temel sınırlayıcı faktör nöronal membranlardaki çözülebilir Aβ birikimlerinin miktarının belirlenmesindeki teknik yetersizliktir. Bu problemin çözümü ile stratejik bölgelerdeki Aβ birikimlerinin seviyesinin belirlenerek bu birikimlerin kognitif bozuklukla korelasyon gösterip göstermediği aydınlatılabilecektir. Ayrıca geliştirilen Aβ ile ilişkili ilaçların bu fonksiyonel bölgelerdeki peptid birikimlerine etkisi açıklığa kavuşturulabilmektedir. Ayrıca Aβ dışında APP'nin ve diğer APP metabolitlerinde patogenesisdeki ve normal fizyolojideki rolünün anlaşılması Aβ azaltıcı ilaçların geliştirilmesiyle ilgili çalışmalar açısından büyük önem taşımaktadır.

2.3.2. Nöronal Sitoiskelet Hipotezi

Alzheimer birçok proteinin patojenik konformasyon gösterdiği bir hastalıktır. Alzheimer hastalığında anormal amiloid plak birikiminin yanı sıra hücre içinde nörofibriler yapıda kümelenmeler (nörofilament yumakları, NFT) gözlenmektedir. Bu kümelerin temel bileşeninin artan fosforilasyon ve asetilasyon gibi anormal post-translasyonel modifikasyonlar gösteren tau proteini olduğu bulunmuştur [101]. Hastalıkla ilişkili nöronal sitoiskelet hipotezinde tau proteini ile ilişkili bu değişikliklerin ve devamında oluşan NFT'lerin AH patolojisinin indüklenmesinde nedensel role sahip olduğu öne sürülmektedir. Tau proteini nöronlarda daha çok mikrotübüllerde bulunan bir protein olup, mikrotübüllerin polimerizasyonu, depolimerizasyonu ve stabilizasyonu işlemlerinin düzenlenmesinde görev

almaktadır. Amiloid β peptidlerinin glikojen sentaz kinaz (GSK) gibi hücreiçi kinazları aktive ederek mikrotübüllerde bulunan tau proteinlerinin hiperfosforilasyonuna yol açarak NFT birikimlerini tetiklediği ve bu sürecin nöron soma ve dendritlerinde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar tau proteinlerinin temel fonksiyonu olan mikrotübüllerin stabilizasyonunda çeşitli hücrel mekanizmalarda rolleri olduğuna işaret etmekte ve tau kümelenmesinin bu mekanizmaları da bozarak hastalığın patogeneziğine katkı sağlayabileceği öne sürülmektedir [102]. Hücre kültürü ve farelerde yapılan incelemeler sonucunda tau proteininin sinaptik aktivitede etkili olan sinyal moleküllerinin dağılımını düzenleyerek ekzitatoriletiyi fasilite ettiği bulunmuştur [102]. Ancak anormal konformasyon gösteren tau'nun dendritik spinlerde birikerek normal sinir iletimini bozabileceği düşünülmektedir[103]. Amiloid β oligomerlerinin MARK enzim ailesiyle etkileşerek tau'nun postsinaptik membrandaki birikimini arttırdığı gösterilmiş [104], buna paralel olarak hücrede ya da transgenik hayvanlarda tau seviyesinin azaltılmasının da A β 'nin yol açtığı nöronal disfonksiyonu azalttığı saptanmıştır [102]. Ayrıca APP ve PS'de indüklenen genetik mutasyonların amiloid plak oluşumunun ardından NFT birikimine yol açtığı gösterilmiştir. Bu bulgular A β 'nin patolojik basamaklarda üst sırada olduğuna işaret ederken, nöronal etkilerinde tau proteininin rol aldığını ortaya koymaktadır.

2.3.3. Alzheimer Hastalığı Kolinerjik Hasar Hipotezi

Kolinerjik hipotezde kolinerjik nöron kaybının ve buna bağlı gelişen kolinerjik ileti bozukluğunun Alzheimer hastalığına yol açan patofizyolojik bir mekanizma olduğu öne sürülmektedir [29]. Merkezi sinir sisteminde önemli bir nörotransmitter olan ACh daha çok internöronlarda bulunmakla birlikte bazal ön beyinden (meynert'in basal nükleusu) serebral kortekse ve limbik yapılara projeksiyon yapan nöronlarda kolinerjik sistemin önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Kolinerjik nöronlarda asetilkolin sentezi akson terminalinde serbest kolinin kolin ChAT aracılığı ile asetile edilmesiyle gerçekleşmektedir. Kolin asetiltransferaz enzimi kolinerjik hücre gövdesinden aksonal uca taşınmakta, hem ChAT hem de ACh konsantrasyonları aksonal terminalde en yüksek miktara ulaşmaktadır. Kolin asetiltransferaz enzimi yalnızca kolinerjik nöronlarda bulunduğundan bu nöronları gösteren bir belirteç olarak çalışmalarda kullanılmaktadır. Salınan ACh daha sonra sinaptik boşlukta AChE tarafından kolin ve asetat'a çevrilerek parçalanmaktadır. Asetilkolin merkezi sinir sisteminde ekzitator katyon kanalı olan nikotinik (nAChR) ve G-protein bağımlı olan muskarinik reseptörleri (mAChR) aracılığı ile etki göstermektedir. Muskarinik reseptörler fosfolipaz C'yi aktive eden Gq (M1, M3, M5) ya da adenilat siklazı inhibe eden Gi/o (M2, M4) proteinlerine bağlı olarak fonksiyon görmektedirler. Reseptörlerin farklı etkilerine ek olarak belirli bölgelerde pre ya da postsinaptik dağılım göstermesi asetilkolinin merkezi sinir sisteminde farklı etkiler gösterebilmesini sağlamaktadır. Bu nörotransmitter periferde primer olarak ekzitator olmakla birlikte merkezi sinir sisteminde kolinerjik ileti daha çok nöronal uyarılabilirliği, presinaptik nörotransmitter salınımını ve nöron ateşlenmesini koordine eden bir nöromodulatördür [105, 106]. Bu heterojen etkilere örnek verilirse, ACh'nin presinaptik M2/M4 mAChR kolinerjik terminalerde inhibitör otoreseptör rolü oynarken [107], kortikostriatal sinapslarda glutamat salınımını

azaltmakta[108], M1/M5 mAChR striatal sinaptozomlarda dopamin salınımını uyarırken [109]postsinaptik M1/M5 reseptörleri piramidal nöronlarda uyarılabilirliği arttırmaktadır [107]. Alzheimer hastalarında yapılan otopsi incelemelerine göre bazal ön beyinde nöron kaybı oranının %75'i geçtiği tespit edilmiştir. Bu kayıp serebral korteks alanlarında ve hipokampüsde ChAT enziminde belirlenen azalma ile de teyit edilmiştir[29, 30]. Merkezi sinir sisteminde azalan kolinerjik aktivite ile ölçülen kognitif bozukluğun korele olduğu saptanmıştır[110]. Ayrıca hayvan modellerinde kolinerjik sistem hasarının AH'de gözlenen benzer bir hafıza bozulmasına yol açması kolinerjik sistemin hastalığıdaki rolünü desteklemektedir [111]. Bir diğer ilginç bulgu da hastaların beyinde dejenere olan kolinerjik nöronlara paralel olarak serebral korteksde de AChE ve ChAT enzimlerinin aktivitelerinin azalmasıdır [112]. Frontal ve parietal korteksde azalan AChE enzim miktarı ile kognitif bozukluğun başlangıç tarihi, amiloid plak birikimi, nörofilament kümeleri ve erken hasta kaybı arasında korelasyon tespit edilmiştir [113]. Bu sonuçlar dikkate alınarak erken klinik çalışmalarda hafıza bozukluğunun önlenmesi amacıyla AChE inhibitörleri (AChEIs) gibi çeşitli kolinerjik agonistler terapatik ajan olarak uygulanmış ve günümüzde halen belirli kolinerjik ajanlar azalan kolinerjik iletinin artırılması için yaygın olarak hastalarda kullanılmaktadır [114]. Ancak bu ajanların kognitif fonksiyonlara olumlu etkisinin oldukça sınırlı olduğu ve bu etkinin kalıcı olmadığı bulunmuştur. Belirli bir süre sonunda bu ilaçla tedavi edilen hastalarda hastalığın ilerleme düzeyinin ve bilişsel/fonksiyonel gerilemenin kullanmayanlarla kıyaslandığında anlamlı derecede değişmediği belirlenmiştir[115]. Sonuç olarak bu ilaçların semptomatik fayda sağlamakla birlikte uzun süreli tedavi edici etkilerinin olmadığı ortaya konmuştur. Günümüzde bazı araştırmacılar kolinerjik sistemin hastalığın etiolojisinde rol oynamadığını öne sürmektedir. Literatürde hastalığın erken dönemlerinde kolinerjik deplezyonun varlığıyla ilgili birbiriyle çelişen pek çok çalışma yer almaktadır. Hastalığın erken dönemlerinde medial temporal lobda kolinerjik azalma olduğunu gösteren çalışmaların [31] aksine Davis ve ark. (1999) [32] kolinerjik belirteçleri inceleyerek kolinerjik ileti azalmasının erken evrede değil hastalığın geç evrelerinde ortaya çıktığını öne sürmüşlerdir. Ancak daha sonra yapılan araştırmalarda erken dönemde kolinerjik inervasyon kaybının hayatta kalan kolinerjik sinaplarda artan ChAT seviyesiyle kompanse edilebileceği gösterilmiş, ayrıca kolinerjik nöronlarda kayıp olmasa da fonksiyonlarında ve hücresel bütünlüklerinde bozulma olabileceği gösterilmiştir.

Günümüzde kolinerjik zayıflamanın hastalığın yegane nedeni olmadığı görüşü yaygın olarak kabul edilmiştir. Bu görüş AChEI'nin klinik uygulamalarında hedeflenen terapötik etkinin sağlanamaması [116] ve kolinerjik hasarın sıçanlarda ciddi hafıza bozukluğuna yol açmaması ile desteklenmiştir[117]. Kolinerjik hasarın AH'de tek başına nedensel bir role sahip olmadığı ancak hastalığın patofizyolojisinde etkili olduğu düşünülmektedir. Kolinerjik sistemde gözlenen değişikliklerin rolüne dair farklı görüşler ortaya atılmıştır. Hastalığın multifaktöriyel bir etiolojiye sahip olduğunu öneren çalışmalar (Şekil 2.1) ve hastalığın gelişimi sırasında kolinerjik aktivitede bozulma olduğunu gösteren kanıtlar [118, 119] dikkate alınarak kolinerjik tükenmenin beyin diğer toksik etkenlerle kompanse etmeye yeteneğini

zayıflatarak hastalığın gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir. Bu konudaki bir diğer yaklaşımda kolinerjik aktivitenin azalmasının amiloid birikimleri neticesinde gerçekleştiği ve kognitif bozuklukla neticelenen istenmeyen bir döngüyü başlattığı şeklindedir[112]. Kolinerjik sistemin nörokoruyucu etkisinin nAChR agonistleri (nikotin) yada indirek olarak AChE inhibitörleri ile ACh seviyesinin artırılmasıyla nAChR stimülasyonu yoluyla gerçekleştiği bulunmuştur. In vitro çalışmalarda nikotinin kortikal ve hipokampal nöronları N-metil D- aspartat (NMDA) ve Aβ aracılı toksisiteye karşı koruduğu gösterilmiştir [120, 121]. Alzheimer hastalığında nöropatoloji ve bilişsel zayıflamanın önlenmesinde muskarinik agonistlerde umut vaat edici olmakla birlikte henüz bu konuda fazla çalışma bulunmamaktadır[122, 123]. Nikotinin inme, Parkinson, huntington ve travmatik beyin hasarı gibi nörodejenerasyonun görüldüğü koşullarda da koruyucu etki göstermesi nikotinin nAChR aracılı koruyucu rolünü destekler niteliktedir. Alzheimer hastalarında hipokampus ve korteksde hem nAChRs hemde mAChRs protein seviyesinin azalması diğer patolojik değişimleri arttıran ve diğer risk faktörlerinin etkilerinin baskılanmasını önleyici bir olgu olarak görülmektedir[124]. İnsan ve hayvan çalışmalarından elde edilen sonuçlara dayanarak hastalıkta gözlenen kolinerjik anormallikler kolin transportunun bozulması, asetilkolin salınımının değişimi, reseptör ekspresyonunun azalması, kolinerjik hücrede nörotropin seviyesinin düşmesi ve aksonal taşımanın zarar görmesi şeklinde sıralanabilir. Kolinerjik anormalliklerin davranış ve bilişsel fonksiyonların yanı sıra amiloid birikimde de rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle kolinerjik terapi yaklaşımları halen geçerliliğini korumaktadır.

2.3.4. Alzheimer Hastalığı Oksidatif Stres Hipotezi

Yaşlanmanın fizyolojik nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte serbest radikal teorisi yaşlanmanın ve yaşlılıkla ilişkili hastalıkların artan oksidatif stresin hücresel dejenerasyona yol açarak bu süreçte temel bir rol oynadığını ifade etmektedir[125]. Yaşla ilişki nörodejeneratif hastalıklarda serbest radikal miktarında gözlenen artış ile nöronların bu hasara karşı daha duyarlı olması önemli karakteristikler olarak belirlenmiştir. Bu nedenle AH gelişimi ve ilerleyişinde serbest radikal üretiminin önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir [126, 127]. Nöronların belirli nedenlerden dolayı serbest radikal hasarına daha duyarlı olduğu ifade edilmiştir. Bunlar şöyle sıralanabilir: (I) Nöronlar gerekli enerjiyi sağlamak için mitokondride gerçekleşen oksidatif fosforilasyon reaksiyonlarına oldukça bağımlıdır. (II) Membranlarında bulunan yüksek orandaki çoklu doymamış yağ asitleri lipid peroksidasyon reaksiyonlarında substrat olarak kullanılabilir. (III) Yüksek seviyede bulunan iyonik haldeki demir serbest radikal reaksiyonlarını katalize etmektedir. (IV) Endojen bir antioksidan olan glutatyonun seviyesi diğer dokulara göre daha düşüktür[128, 129]. Mitokondrial oksidatif fosforilasyona ek olarak monoamin oksidaz ile katekolaminlerin (epinefrin, norepinefrin), indolaminlerin (serotonin, melatonin) enzimatik dönüşümünün; katekolaminlerin otooksidasyonunun ve lipooksijenaz, siklooksijenaz enzimlerinin aktivitelerinin de serbest radikal üretime neden olduğu bilinmektedir[126]. Alzheimer hastalığında arttığı tespit edilen serbest radikaller süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^{\bullet}) ve nitrik oksit (NO) şeklinde sıralanabilir.

Nöronlarda antioksidan savunma sistemi pek çok yolla üretilen ROS'dan kaynaklanabilecek hasarın önlenmesinde oldukça önemlidir. Bu sistem fizyolojik ROS üretimini detoksifikasyon ile dengeleyen enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlardan oluşmaktadır. Antioksidan sistem üç temel başlık altında incelenebilir (Halliwell and Gutteridge 2007):

1. Enzimatik antioksidan sistem: Süperoksit dismutaz enziminin mitokondride (manganez bağımlı form), sitozolde (çinko-bakır bağımlı form) ve hücre dışında (demir bağımlı form) olmak üzere üç farklı forma sahip olduğu bilinmektedir. Süperoksit dismutaz enzimi $O_2\bullet^-$ 'yi H_2O_2 'ye dönüştürerek fonksiyon görmektedir. Selenyum bağımlı GSH-Px ve CAT enzimleri enzimatik antioksidan sisteminin diğer üyeleridir. Bu enzimler H_2O_2 'yi suya dönüştürerek detoksifikasyon sağlamaktadırlar.
2. Küçük molekül antioksidan sistem: Vitamin E ve vitamin C gibi moleküller serbest radikallerle reaksiyona girerek aktivitelerini düşürmektedir.
3. Şelatör protein antioksidan sistem: Glutasyon gibi düşük moleküler ağırlıktaki tiol grupları içeren proteinlerdir. Bu proteinler metallerle bağ yaparak serbest radikal üretimini katalize eden reaksiyonları önlerler.

İnvitro çalışmalarda amiloid plaklarda bulunan A β peptidinin toksik etkilerini oksidan hasar aracılığıyla gerçekleştirdiğinin saptanması AH'de oksidan hasarın önemine ilişkin hipotezi desteklemiştir[126]. Behl ve ark. (1994) [125]A β toksisitesinde rol oynayan faktörlerden birinin H_2O_2 olduğunu ve bu nedenle hücrelerde katalaz enzim aktivitesinin koruyucu fonksiyonunun önemli olduğunu vurgulamışlardır. Daha sonra yapılan bir çalışmada A β toksisitesine dirençli olan PC12 hücreleri belirlenmiş, bu hücrelerde yapılan incelemede dirençli hücrelerin yüksek miktarda katalaz ve GSH-Px içerdikleri tespit edilmiştir [130]. Vitamin E gibi antioksidan maddelerin A β 'nin toksik etkilerini baskıladığının saptanması oksidan hasar ile A β toksisitesi arasındaki ilişkiye dair hipotezleri kuvvetlendirmiştir[131]. Amiloid β 'nin endotel hücrelerinde $O_2\bullet^-$ radikali üretimini tetiklediği ve bu sürecin oksidatif ve peroksidatif reaksiyonları indükleyerek hücre ölümüne yol açtığı bulunmuş, bu bulgular ışığında oksidan hasarın dejeneratif hastalıklarda önemli bir faktör olduğu ifade edilmiştir[132]. Amiloid β 'nin yüksek konsantrasyonda bulunduğu plaklarda çinko ve bakır gibi metal iyonlarının bir araya gelerek fazla miktarda oksidatif reaksiyonun katalizlenmesine yol açıp nöronal toksisiteyi arttırdığı belirtilmiştir[18]. Ayrıca, AH'de metal ve A β birikimi ile nörojenerasyon miktarı arasında bir korelasyon olduğu saptanmıştır. Atwood ve ark. (1998)[133] bakırın amiloid kümelenmesini fasilite ettiğini, bakır(Cu^{+2})-A β kompleksinin H_2O_2 üretimine yol açarak nörotoksik etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu bulgulara ek olarak, Alzheimer hastalarında yapılan nekropsi çalışmalarında amiloid plaklarda bakır, çinko ve demir metalleri yüksek konsantrasyonda bulunmuştur[134]. Metal iyonlarına ek olarak mikrogliyalardan salınan inflamatuvar araçların A β birikimleri ile etkileşerek oksidatif yükü arttırdığı belirlenmiştir[135]. Tüm bu çalışmalar oksidatif stresin hastalığın gelişiminde önemli bir rol oynadığı görüşünü destekler niteliktedir.

Alzheimer hastalarının beyinde gerçekleştirilen incelemelerinde histopatolojik değişimlerin yanısıra ROS kaynaklı hasarın izleri de belirlenmiştir [136]. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar özetlenirse A β birikimlerinin O $_2\bullet^-$ radikalinin ortaya çıktığı enzimatik reaksiyonları indüklemeye yoluyla H $_2$ O $_2$ oluşumunu arttırarak oksidan hasar ve buna bağlı hücre ölümüne yol açtığı düşünülmektedir[38]. Hücre ölümünün sebeplerinden birinin A β 'nin neden olduğu çeşitli mekanizmalarla lipid membran yapılarının peroksidasyonu olduğu önerilmiştir[137]. Lipid peroksidasyon doymamış yağ asitlerinin ROS ile etkileşerek hidroksil radikali üretimi ile başlayan bir dizi reaksiyondur ve sonuçta lipid zincirinin yapısı yeniden düzenlenirken yeni serbest radikaller oluşmaktadır. Böylece hasar diğer membran lipidlerine de yayılarak plazma membranında yapısal ve fonksiyonel hasar meydana gelmektedir [138]. Sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında Alzheimer hastalarının beyin dokusunda lipid peroksidasyon seviyesinin ciddi düzeyde arttığı tespit edilmiştir[22, 137]. Zira, nöronların plazma membranının araşidonik ve dokosaheksaenoik asit gibi doymamış yağ asitlerince oldukça zengin olduğu bilindiğinden lipid peroksidasyon hasarına yatkın olması beklenen bir sonuçtur[136]. Bu yağ asitlerinin oksidasyonu neticesinde dokuda MDA, 4-HNE ve akrolein gibi çeşitli aldehitlerin seviyesi artmaktadır. Birçok araştırmacı frontal, oksipital ve hipokampus gibi farklı beyin bölgelerinde bu aldehitlerin seviyesinin yükseldiğini göstermiş, hastalıkta artan oksidan stres koşullarında ROS kaynaklı nörotoksik reaksiyonların lipid peroksidasyona yol açarak nörodejenerasyonda önemli bir etken olduğunu vurgulamışlardır[22, 136, 137, 139].

Reaktif oksijen türlerinin lipitlerin yanı sıra proteinleri de hedef alarak protein zincirlerinde oksidasyona yol açtığı bilinmektedir. Alzheimer hastalarında parietal bölgede ve hipokampusda artan protein oksidasyonuna ilişkin bulgular tespit edilmiştir[140]. Ayrıca, DNA'da oksidan hasar neticesinde üretilen 8-hidroksi-2-deoksiguanosin molekülünün hastalarda nüklear ve mitokondrial DNA örneklerinde arttığı bulunmuş, bu bulgunun hastalarda DNA tamir mekanizmasının bozulduğuna işaret ettiği öne sürülmüştür[141].

Alzheimer hastalarında antioksidan savunma sistemi enzimlerinin ekspresyonu ve aktivitesindeki değişim ile ilgili pek çok çalışma yer almaktadır. Literatürde yer alan incelemelerde Alzheimer hastalarında SOD ekspresyonunun ve aktivitesinin değişimiyle ilgili çelişkili sonuçlar elde edildiği dikkati çekmektedir [20, 24, 142]. Serebral korteksde ve hipokampusde SOD aktivitesinde belirgin bir azalma olduğunu gösteren bulguların [21, 143] yanı sıra kontrollerle kıyaslandığında SOD aktivitesinde fark olmadığını gösteren çalışmalarda bulunmaktadır [20, 24]. Post-mortem incelemelerde dokudaki enzim aktivitesi hızla azaldığından araştırmalarda biyokimyasal ölçümler öncesinde harcanan zamandaki farklılıkların bu çelişkili sonuçlara yol açabileceği düşünülmektedir. Padurariu ve ark. (2010)[22] Alzheimer hastalarında ve hafif bilişsel bozukluk gözlenen yaşlı bireylerde serum SOD enzim aktivitesinin azaldığını ve buna paralel şekilde MDA seviyesinin arttığını belirlemişlerdir. Benzer biçimde hastalarda temporal korteksde azalan SOD ekspresyonunun artan oksidan hasara karşılık yetersiz kalan antioksidan savunma

mekanizmasının göstergesi olduğu ifade edilmiştir[144]. Bununla birlikte daha önceki yayınlarda histopatolojik değişimlerin ve lipid peroksidasyonun en çok gözleendiği medial temporal lobda SOD aktivitesinde artış belirlenmiş, bu artışın serbest radikal oluşumunu kompanse etmeye yönelik bir savunma mekanizması olabileceği öne sürülmüştür [23]. Bu konuda göz önünde bulundurulması gereken önemli bir nokta da hücresel olayların dinamik bir süreç olduğu ve hastalığın ilerleyişine bağlı olarak gözlenen değişimlerin farklı olabileceğidir. Hayvan çalışmalarında, SOD geninin inaktif edilmesinin farelerde A β oligomerizasyonunu hızlandırması [145]ayrıca A β peptidinin de SOD aktivitesini azaltması bu enzimin hastalığın patogenezisindeki rolüne işaret etmektedir[146]. Bu nedenle, SOD aktivitesinin arttırılmasına yönelik ajanların oksidan hasarı azaltarak koruyucu etki göstereceği ifade edilmiştir[146, 147].

Alzheimer hastalarında katalaz aktivitesini belirlemeye yönelik incelemelerde serebellum, frontal korteks ve temporal korteksde katalaz enzim aktivitesinin diğer beyin bölgelerine göre arttığı, total beyin katalaz aktivitesinin ise kontrol grubu ile kıyaslandığında değişmediği belirlenmiştir [21]. Aynı hastalarda yapılan bir başka çalışmada ise parietotemporal, basal ganglia ve amigdala bölgelerindeki katalaz aktivitesinin azaldığı saptanmıştır [20]. Alzheimer hastalarında katalaz aktivitesiyle ilgili postmortem dokuda gerçekleştirilen incelemeler SOD enzimiyle ilişkili bulgulara benzer şekilde hem ölçüm zamanı hem de ölçüm yerindeki farklılıklardan dolayı tam bir kesinlik kazanamamıştır. Gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmasında A β 'nın katalaz enzimine bağlanarak aktivitesini inhibe ettiği ve böylece H₂O₂ parçalanmasının büyük oranda önleendiği belirlenmiştir [27, 148]. Ayrıca yapılan birçok çalışmada hücre ortamına katalaz enziminin eklenmesinin A β 'nın ROS aracılı toksik etkilerine karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir[149, 150]. Bu çalışmalar dikkate alınarak katalaz aktivitesini arttıran ya da mimik eden ajanların koruyucu etkileri transgenik hayvan modellerinde incelenmiş, bu ajanların bazılarının A β ve tau ile ilişkili süreçlere etki ederek koruyucu olduğu saptanmıştır [151]. Belirlenen bu olumlu etkiler ışığında Alzheimer hastalığında ROS kaynaklı hasarın önlenmesinde katalaz aktivitesinin arttırılmasının faydalı bir terapötik yaklaşım olabileceği ifade edilmiştir

Antioksidan savunma sisteminde yer alan bir diğer önemli enzim glutatyon peroksidaz enzimidir. Alzheimer hastalarında hipokampus, amigdala ve piriform korteksde glutatyon redüktaz ve GSH-Px aktivitelerinin yükseldiği bulunurken [24], aynı kişilerin frontal, temporal ve serebellar korteks bölgelerinde yapılan ölçümlerde GSH-Px aktivitesinin değişmediği izlenmiştir[25]. Rinaldi ve ark. (2003) [152]ise hastaların serum örneklerinde gerçekleştirdikleri incelemede GSH-Px ve SOD aktivitelerinin azaldığını saptamışlardır. Yakın zamanda gerçekleştirilen bir diğer çalışmada benzer şekilde hastaların serum GSH-Px seviyesinin azaldığını göstererek bu bulguyu desteklemiştir[22]. Ayrıca, GSH-Px aktivitesine bağlı antioksidan etkide önemli rol oynayan GSH seviyesinin de Alzheimer hastalarında azaldığı ve GSH seviyesinin bilişsel skorlarla oldukça korele olduğu belirlenmiştir [26]. Ayrıca hayvan çalışmalarında gerçekleştirilen immünohistokimyasal analizler A β 42'nin ventriküler

enjeksiyonununhipokampüs, parietal korteks ve piriform korteks alanlarında GSH ve GSH-Px miktarlarını azalttığına işaret etmektedir [28]. Nitekim, Pocernich ve Butterfield 2012 yılında yayınladıkları makalede [153]en önemli endojen antioksidan bileşiklerden biri olan GSH'nin miktarının arttırılmasının AH'nin ilerleyişinin durdurulmasında potansiyel bir terapötik yaklaşım olduğunu belirtmişlerdir.

Amiloid β 'ninoksidan hasara etkisi

Bugüne kadar yapılan yayınlardaAH'de gözlenen oksidan süreçlerde A β 'nin pekçok farklı moleküler mekanizma aracılığıylaetki gösterdiği belirlenmiştir. Amiloid β peptidine maruz bırakılan insan ve sıçan dokularında oksidatif stresin arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir [154].Nitekim, in vitro çalışmalarhücrelere A β uygulamasının H₂O₂ ve lipid peroksitleri arttırdığını göstermiştir[15, 16, 125]. Bu bulguyla uyumlu olarak AH transgenik farelerde H₂O₂ ve NO üretimi artmış, protein ve lipidlerde oksidatif modifikasyonlar gözlenmiştir[155]. Hipokampal kültürde A β aracılı ROS üretiminde NMDA kanal aktivasyonu ve hızlı Ca artışının etkili olduğu[156], oksidan hasarın sinaptik bozulma ve nöron kaybında rol aldığı saptanmıştır[157]. Ayrıca A β 'nin hastalıkta oksidatif stresle ilişkilendirilenglikalize protein üretimindeki artışta önemli rol oynadığı saptanmış, A β bağımlı nitrooksidatif stresle ilişkili enzimatik reaksiyonların glikasyon vetau fibrilasyonunu tetiklediği bulunmuştur[154, 158]. Daha önceki bir çalışmada A β 'nin reaktif nitrojen türlerininüretimini NF-kB aracılığıyla arttırdığı saptanmıştır[159]. Bu etkileşimlerin yanı sıra A β 'nin metallerle reaksiyona girerek nöronal hasar ve oksidasyonu güçlendirdiği de bilinmektedir[18].

Oksidan hasar A β indüklü sitotoksitede rol alırken buna ek olarak A β üretimini de fasilite etmektedir. Antioksidan savunma sistemindeki kusurların oksidatif stresi arttırarak amiloid birikimini arttırdığı transgenik hayvan çalışmalarında gösterilmiştir[160]. APP transgenik hayvanlarda MnSOD ekspresyonunun arttırılması protein oksidasyonunu azaltıp antioksidan savunma kapasitesini arttırarak amiloid plak birikimini ve bilişsel azalmayı düzeltmiştir [161]. Oksidatif stresin alfa sekretaz aktivitesini azaltıp, c-Jun N-terminal kinaz (JNK) yolağını aktive ederek beta ve gamma sekretaz aktivitesini arttırarak amiloid beta oluşumunu fasilite ettiği saptanmıştır[162]. Alzheimer hastalarının beyin dokusunda yapılan incelemelerde de JNK sinyalinin aktive olduğu ve beta sekretaz (BACE), PS1 ekspresyonunun artışının bulunması, artan oksidatif stresin JNK gibi redoks dengesine hassas yolları tetikleyerek amiloid üretimini arttırabileceği ortaya konmuştur[163]. Düşük seviyedeki A β peptidinin normal hücre fonksiyonlarında görev aldığı ve hücrenin redoks durumunu dengeleyici etki gösterebileceği ancak anormal birikimin ve belirli formların artışının oksidan hasarı arttırarak nöronal fonksiyonları bozarak AH patogenezisinde rol aldığı düşünülmektedir.

Tau proteinininoksidan hasardaki rolü

Senil plakların ve NFT'lerin oluşumda etkili olan oksidatif stresin tetiklenmesinde tau proteininin de rolü olduğu öne sürülmüş, fosforile tau proteininin serin rezidüleri ile etkileşerek oksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir

[164]. İlk defa 1994 yılında hastaların beyin dokularında gerçekleştirilen analizler neticesinde tau proteininin oksidan özelliklerinin olabileceği ortaya konmuştur. Bu çalışmada fibril birikimlerindeki tau'nun glikasyon gibi non-enzimatik reaksiyonlar için hedef olduğu ve nöronal disfonksiyonun gözlemlendiği bölgelerde glikalize tau ile birlikte yüksek miktarda MDA tespit edilmiştir[159]. Glikasyon mekanizmasının A β ile uyarıldığı ve glikasyon neticesinde ortamda artan ROS ve NO'nun tau konformasyonunda değişime neden olarak helikal filamentler şeklinde çökmesine yol açtığı saptanmıştır [158]. Ayrıca, anormal proteolitik işlemlerle ilişkili olarak ortaya çıktığı düşünülen 'Truncated' tau proteininin de oksidatif hasarda rol aldığı belirlenmiştir. Truncated' tau'nun glial hücrelerde nitrik oksit üretimini 6 kat arttırdığı ve oksidatif stres indüklemeye kapasitesi olduğu gösterilmiştir[165].

Nükleer faktör kappa β 'nin oksidan hasara etkisi

Nükleer faktör kappa β enfeksiyon, stres, inflamasyon ve apoptosis'e cevap olarak aktive olan birçok geni düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Bu transkripsiyon faktörünün amiloid plakların çevresindeki astrositlerde ilgili sinyal kaskadını tetikleyerek reaktif nitrojen türlerinin üretimini sağlayan enzimlerin ekspresyonunda rol aldığı gösterilmiştir. Amiloid β uygulanan farelerde indüklenebilir nitrit oksit sentaz enziminin (iNOS) indüksiyonunun ve NO üretiminin NF- κ B aracılığıyla gerçekleştiği belirlenmiştir[13]. Combs ve ark. (2001)[166] gerçekleştirdikleri hücre kültürü çalışmasında NF- κ B aktivasyonunun AH patofizyolojisinde rol aldığını göstermişlerdir. Bu çalışmada fibriller A β ile muamele edilen hücrelerde NF- κ B aracılığıyla inflamatuvar sitokin tümör nekroz faktör alfa ekspresyonunun tetiklendiği ve bu sürecin iNOS stimülasyonu devamında NO ve peroksinitrit oluşumu ve apoptosis ile sonuçlandığını saptamışlardır. Ayrıca NF- κ B'nin BACE ekspresyonunu etkileyerek A β oluşumunda artışa neden olduğu bulunmuştur[167]. Bu çalışmalar A β toksisitesinde NF- κ B ile ilişkili sinyalleme kaskadlarının tetiklediği oksidan mekanizmaların rolünü ispatlar niteliktedir.

İleri glikasyon son ürünlerinin oksidan hasar ile ilişkisi

İleri glikasyon son ürünleri (advanced glycation end products, AGE) şeklinde sınıflanan bileşikler indirgenmiş şeker ile okside lipit, protein ve nükleik asitlerin non-enzimatik etkileşimleri neticesinde oluşmaktadır[168]. Artan AGE'lerin proteinler arası çapraz bağlar kurarak yada reseptörlerle etkileşerek birçok hücre yapının kimyasal ve fonksiyonel özelliklerini modifiye edip oksidatif stres, morfolojik ve inflamatuvar değişiklikler gibi dejeneratif hastalıkların patogenezesinde yer alan mekanizmaları tetiklediği bilinmektedir[169]. Araştırmalarda AGE moleküllerinin yaşlanma, oksidatif stres ve hiperglisemi koşullarında dramatik derecede arttığı saptanmıştır [170]. Değişen oluşum ve degradasyon işlemleriyle birlikte genetik faktörlerinde kişilerde AGE metabolizmasını etkileyerek AH benzeri patolojilerin gelişimine zemin hazırlayabileceği düşünülmektedir[19]. 90'lı yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda Alzheimer hastalarında senil plaklarda ve NFT'lerde biriken AGE moleküllerin saptanması bu görüşü desteklemektedir [171]. Oluşan AGE moleküllerinin O $_2^{\bullet-}$ ve H $_2$ O $_2$ oluşumunu indükleyip hücre içindeki yapıları modifiye ederek gen transkripsiyonu gibi pek çok işlemle etki gösterebildiği bilinmektedir [172]. Ayrıca AGE moleküllerinin özellikle nöronlar ve mikroglialarda eksprese edilen

RAGE ile etkileşerek nöroinflamasyonu tetikleyip nöronal stresi arttırdığı saptanmıştır [173]. Alzheimer hastalarında belirlenen AGE ve RAGE artışının CA3 bölgesinden tüm hipokampus ve serebral kortekse yayılması AGE kaynaklı oksidan stresinde bu yol üzerinden ilerlediği şeklinde yorumlanmıştır [174]. Ayrıca A β peptidinin RAGE ile etkileşebildiği ve kan damarlarında bulunan RAGE'lerin A β peptidlerinin dolaşımdan beyin dokusuna geçişini sağlayarak beyindeki birikimi fasilite ettiği izlenmiştir. Tüm bu bulgular dikkate alınarak AGE ve RAGE birikimlerinin hastalığın patogenezinde önemli bir rol oynadığı ifade edilmiştir [94].

Geçiş metallerinin oksidan hasardaki rolü

Demir, çinko, bakır (Cu) ve alüminyum (Al) gibi geçiş metalleri A β peptidleri ile direk etkileşerek oksidatif reaksiyonları katalize edip H₂O₂ ve OH•. üretimi ile nörotoksiteyi arttırabilmektedirler [18]. H₂O₂ ile reaksiyona giren Cu+2 iyonunun redoks tepkimelerini katalize ederek A β oksidasyonuna ve aldehitlerin üretimine yol açtığı gösterilmiştir [175]. Demir iyonunda amiloid plakların çevresinde oldukça yüksek konsantrasyonda bulunduğu bilinmektedir. Bu yüksek konsantrasyona bağlı olarak ferröz demiri (Fe+2) ferrik demire (Fe+3) yükseltgeyerek OH•. radikalini oluşturan Fenton reaksiyonları neticesinde nöronal hasarlanmanın arttığı bulunmuştur [176].

Alüminyum elementinin bu hastalığıdaki rolü tartışmalıdır. Hastaların beyinde biriken Al'ın APP proteolizisini bozarak amiloid üretimini hızlandırdığı ve metal şelatörlerin amiloid plak yükünü azaltabileceği önerilmiştir [177]. Fazla Al birikimi OH•. Radikali üretimi yoluyla protein, DNA ve membran lipidlerine zarar vermektedir [177]. Ayrıca, Al SOD aktivasyonuna yol açarken katalazı inhibe ederek H₂O₂ üretimini arttırır. Buna karşılık Al'ın aynı zamanda Fe+3 iyonunu stabilize ederek oksidasyon oranını azaltması AH'de antioksidan bir rolü olabileceğine işaret etmektedir. Sonuç olarak kompleks bir patofizyolojiye sahip olan AH'de özellikle birçok önemli enzimin kofaktörü olan metal elementlerinin etkilerinin birbiriyle ilişkili ve konsantrasyona bağlı olarak değerlendirilmesinin gerektiği göz önünde bulundurulmalıdır.

Mitokondriyel mekanizmalar ve oksidan hasar ilişkisi

Mitokondri ATP sentezi, Ca⁺² homeostazisi, hücre ölümü gibi önemli hücre fonksiyonlarında temel role sahip bir organeldir. Mitokondride yer alan elektron transport zinciri hücrede ROS üretiminin temel kaynağıdır ve mitokondri oksidatif strese özellikle savunmasızdır. Mitokondri disfonksiyonu AH patogenezinde yer alan önemli bir faktördür. Alzheimer hastalarında yapılan biyopsi çalışmalarında mitokondrinin küçüldüğü ve mitokondriyel protein ve DNA'nın sitoplazmada ve vakuollerde olduğu belirlenmiştir. Mitokondriyel anormalliklere eşlik eden oksidan hasar artan 8-hidroksiguanosin ve nitrotirozin seviyeleri yardımıyla belirlenmiş, bu bulguyla uyumlu olarak elektron zincirinde öneme sahip mitokondriyel sitokrom oksidaz aktivitesinde azalma saptanmıştır. Elektron transport zincirindeki eksikliğin ROS üretiminde artışa ve enerji depolarında azalmaya neden olarak nörodejeneratif sürece katkı sağladığı düşünülmektedir. Kanıtlar A β 'nın mitokondri üzerine direk etki yaparak fonksiyonlarını bozduğu ve nöronal ölüme yol açtığına işaret etmektedir.

Mitokondrideki A β varlığının mitokondri metabolizmasını bozduğu ve ROS artışına yol açtığı gösterilmiştir [178]. Amiloid β 'nin mitokondri membranında oksidan hasara, protein mobilitesinin değişmesine, enzim inhibisyonu ve permeabilite artışını sağlayarak membran potansiyelinin bozulmasına yol açtığı gösterilmiştir. Mitokondride artan oksidan strese cevap olarak membran potansiyelini azaltarak enerji üretimini sınırlayan koruyucu mekanizmayı tetikleyen anyon taşıyıcı proteinlerin ekspresyonunun da AH'de azaldığı belirlenmiştir.

2.4. Alzheimer Hastalığında Apolipoprotein E4 Allelinin Rolü

Apolipoprotein E 4 alleli baskınlığının AH gelişimi için genetik bir risk faktörü olduğunun belirlenmesinin ardından ApoE proteininin yapısal özelliklerini, nörobiyolojik fonksiyonlarını ve hastalığı patofizyolojik etkilerini incelemeye yönelik pek çok araştırma yapılmıştır. ApoE, apoE2, apoE3 ve apoE4 olmak üzere insanda en yaygın üç izoformu bulunan polimorfik bir proteindir. Apo E, lipoprotein partiküllerinin formasyonunu başlatmak ve spesifik hücre reseptörlerle ilişki kurarak lipid metabolizmasını yönlendirmek, nöronal hücrelerin reinnervasyonu ve yeniden yapılandırmasında fonksiyon görmek gibi pek çok önemli role sahiptir [179, 180]. Bu rollerin izoforma özgü farklılık gösterdiği ayrıca ApoE proteinlerinin eksprese edildikleri hücre tipine göre de farklı roller taşıdıkları belirlenmiştir.

Alzheimer hastalığının patolojisinde ApoE proteinlerinin patolojik etkileri A β bağımlı ve bağımsız olmak iki grupta incelenebilir. ApoE3 daha hızlı ve kararlı olmak üzere hem ApoE3 hem de ApoE4 izoformları A β peptidleri ile kararlı bağlar oluşturabilmektedir [179, 180]. Astroglial ApoE3'nin, ApoE4 izoformuna göre A β peptidlerine 20 kat daha fazla bağlanabildiği saptanmıştır (Huang, 2006; Kim et al., 2009). Bu nedenle mutant insan APP geni taşıyan farelerde apoE3 lipid içeriğinin arttırılması, peptidin temizlenmesini arttırarak amiloid seviyesini azaltmıştır [180]. ApoE2 ve apoE3'ün apoE4 izoformuna göre daha fazla miktarda A β peptidini temizleyebilmesi [181], birikimlerin astroglial degradasyonunda izoform tipinin önemine işaret etmektedir. Mikroglial A β temizlenmesi ölçüldüğünde apoE4'ün bu temizlenme miktarını %40 oranında düşürdüğü bulunmuştur [182]. Ancak bu bulgulara rağmen bu işlemlerin AH'de ki bilişsel bozukluğa katkısı netlik kazanmamıştır. Bunun en temel nedeni hastalarda amiloid plak birikimlerinin miktarı ile bilişsel semptomlar arasında bir korelasyonun bulunmamasıdır.

Apolipoprotein E3 izoformunun apoE4'den farklı olarak yaşa bağlı ya da ekzitotoksikiteye bağlı nörodejenerasyonda koruyucu olduğu bulunmuş, nöronlarda ApoE4'ün tek başına eksprese edildiği transgenik farelerde öğrenme ve hafıza bozukluğu olduğu saptanmıştır [183]. Bilişsel fonksiyonlarda gözlenen azalmanın nedenleri incelendiğinde ApoE4'ün sinaptogenezi bozarak dendritik spin yoğunluğunu azalttığı *invivo* ve *invitro* çalışmalarda tespit edilmiştir [184]. Ayrıca nöronal kök hücrelerin nörogenezinin ApoE4 ekspresyonu indüklenen farelerde azaldığı gözlenmiş ve bu azalışın bilişsel bozukluğa neden olabileceği ifade edilmiştir [185]. İzoformların nörit büyümesine etkileri incelendiğinde arka kök ganglion hücrelerinde ve nöronal kültürlerde apoE3'ün spin dallanma ve büyümesini uyardığı, apoE4'ün ise inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Buna ek olarak, ApoE4'ün aksine astroglial

apoE3'ün hipokampal nöronlarda spin uzamasını sağladığı belirlenmiştir. Bu modellerde A β birikimi gözlenmediği için belirlenen değişikliklerin apoE4'ün A β 'dan bağımsız etkileri olduğu söylenebilir. Ayrıca, beyin hasarı ve stres durumlarında nöronal apoE ekspresyonununundüklendiği ve artan apoE4'ün proteolitik olarak parçalanarak toksik fragmanlara ayrıldığı belirlenmiştir [179]. Nöronlarda üretilen ApoE4, ApoE3 izoformundan farklı olarak daha kolay proteolizize uğrar ve toksik fragmanlara parçalanır (Huang, 2010). Hastalarda bu fragmanların seviyesinin arttığı gözlenmiştir [186]. Bu fragmanları eksprese eden farelerde hipokampüsde gözlenen dejenerasyonun yanı sıra uzamsal öğrenme ve hafıza bozukluğu da izlenmiştir [187]. Bunun yanı sıra, ApoE4 fragmanlarının tau fosforilasyonunu ve fibriller şekilde kümelenmesini tetiklediği belirlenmiştir [179]. Nöronal mitokondride de apoE4'e bağlı disfonksiyon gözlenirken [188] hastalarda bu alelin taşıyıcılarında E3 taşıyıcılarına göre daha fazla disfonksiyon saptanmıştır [189]. Sonuç olarak ApoE4 izoformununun A β bağımlı ve bağımsız olmak üzere pek çok farklı mekanizma aracılığıyla nöronal fonksiyonları etkilediği belirlenmiş ve bu farklı etkilerin hastalığın gelişimine ve ilerlemesine katkısının anlaşılması için ilave çalışmalara gereksinim olduğu belirtilmiştir.

2.5. Alzheimer Hastalığında Kognitif Bozukluğun Temeli

Alzheimer hastalığı beyin ağırlığında ve hacminde ciddi kayba neden olmakta ve belirli beyin bölgelerini diğerlerine oranla daha fazla etkilemektedir. Hastalıkta belirli beyin bölgelerine özgü nöron kaybı gözlenmekle birlikte (örneğin entorhinal kortekste lamina II piramidal hücreleri, hipokampüs CA1 hücreleri gibi), beyin hacmindeki azalmanın büyük bir kısmı büzülme ve nöronal işlemlerin kaybına bağlıdır. Radyolojik görüntüleme tekniklerindeki gelişmeler sayesinde hastalarda yapılan morfometrik ölçümler bu konuda yeni bulgular elde edilmesini sağlamıştır [190]. Örneğin, magnetik rezonans görüntüleme ile kortikal kalınlığın birçok beyin bölgesinde azaldığı tespit edilmiştir. Bu azalışın hastalarda kognitif bozukluk ile korele olduğu ve bu bulguyla hafif kognitif evreden ileri evreye dönüşümün öncelenebildiği saptanmıştır [191].

Alzheimer hastalarında ve hastalık riski olanlarda fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme ile yapılan incelemeler anatomik değişimlerin ötesinde nöronal ağların aktivitesinde de belirgin değişimler gerçekleştiğini belirlemiştir. Örneğin medial prefrontal korteks, posterior singulat korteks-ventral kuneus, posterior inferior parietal lob ve hipokampal formasyon gibi dağıntık beyin bölgelerini içeren "Default mod network (DMN)" adı verilen ve beyin dinlenme durumunda aktivite gösteren ağda anormal aktivite ve bağlantı değişimleri gözlenmiştir. Ayrıca, hafıza görevlerinin gerçekleştirilmesi sırasında hipokampüsde hiperaktivite belirlenmiş, bu aktivite artışının hipokampüs hacmindeki azalma ve AH'de etkilenen bölgelerdeki anormal kortikal inceleme ile korele olduğu bulunmuştur [191]. Transjenik hayvan modellerinde elde edilen elektrofizyolojik ve biyokimsyal bulgularla da [10, 88] desteklenen bu gözlemler, hastalıkta nöronların ve nöronal ağların aktivitelerini yitirmesinden ziyade aşırı nöronal aktivitenin öğrenme, hafıza ve diğer kognitif fonksiyonlarla ilişkili hassas nöronal süreçleri karıştırdığına işaret etmektedir. Ayrıca belirli nöronal popülasyonların fazla

uyarılmasının ekzitotoksositeye ve bunun sonucunda da nörodejenerasyona yol açtığı düşünülmektedir. Bu bağlamda AH'de özellikle erken başlangıçlı hastalarda gözlenen epileptik nöbet insidansındaki artış ilginç bir bulgudur [10]. Transjenik hayvanlarda yapılan çalışmalar bu komplikasyonların nöronal ağlardaki aktivite değişimlerinin yalnızca küçük bir kısmını yansıttığını ve bu olgunun tüm yönleri ile aydınlatılabilmesi için geniş kapsamlı araştırmaların yapılması gerektiğini vurgulamaktadır [10, 88].

Elde edilen kanıtlar AH'de nöronların sinyal alıp yolladığı sinaps ve dendritlerin dejenerasyona karşı daha savunmasız olduğunu göstermektedir. Nöron kaybı ile kıyaslandığında sinapların ve dendritik spinlerin kaybının kognitif işlevlerdeki azalmayla daha fazla korelasyon gösterdiği saptanmıştır [192]. Sinaptodendritik seyrelme AH'de rol oynadığı düşünülen çeşitli faktörlerle muamele edilen nöronal kültürlerde ve transjenik farelerde gözlenmiştir. Bu modellerde dejenerasyonu takiben gerçekleşen sinaptik fonksiyonlarda azalma ve nöronal ağlardabelirlenen aşırı aktivite [10], bu tip değişimlerin hastalığın erken evrelerinde etkili olduklarına ve ilerlemesinde rol oynadıklarına işaret etmektedir. Son yıllarda radyolojik görüntüleme tekniğindeki gelişmeler hayattaki hastalarda patolojik belirteçlerin dedekte edilmesine imkan sağlayarak tanı doğruluğunu arttırmıştır. Kan dolaşımına enjekte edilen 'Pittsburg' (PIB) bileşiği kan beyin bariyerini geçerek, hastalığın tanısında önemli bir patolojik belirteç olan fibril A β peptid kümelerine (amiloid plak) bağlanmaktadır. Bağlanan bu bileşik pozitron emisyon tomografisi ile tespit edilmektedir. Diğer bir önemli patolojik belirteç olan nörofibriller kümeleride benzer şekilde belirleyebilmek içinde yeni radyofarmasötik ajanlar geliştirilmiştir [193]. Bu patolojik değişimlerin belirlenmesi hastalığın tanısı için oldukça önemli olmakla birlikte bu etkenlerin kognitif azalmadaki rolü halen kesinlik kazanmamıştır. Histopatolojik yada radyolojikmetotlarla belirlenen amiloid plakların miktarının fonksiyonel bozukluklarla korelasyon göstermediği hatta oldukça fazla plak birikimi belirlenmesine karşın normal kognitif fonksiyonlara sahip insanlar olduğu tespit edilmiştir [194]. Buna karşın artan PIB bağlanması ile beş yıl içinde AH gelişmesi arasında nedensel olabileceği ileri sürülen bir ilişki belirlenmiştir [195]. Ancak, otozomal dominant AH vakalarında sporadik AH vakalarıyla kıyaslandığında özellikle basal ganglia'da daha yüksek PIB bağlanması olmakla birlikte, bu bölgeye özgü ekstrapiramidal motor bozukluk gözlenmemektedir[196]. Dahası, çözülebilir olmayan amiloid fibrillerinin oluşumunun önlenmesi ve çözünür oligomerlerin oluşumunun desteklenmesi klinik olarak AH'ye benzer bir sendroma neden olsa da serebral PIB bağlanmasında belirgin bir artışı neden olmamıştır [197]. Ek olarak, AH hastalarında PIB kümelenmesinin paterni sporadik vakalarla APP lokus duplikasyonu olan vakalar arasında farklılık göstermektedir[198]. Bu gözlemler ve hayvan modellerinde elde edilen bulgular hastalığın ve gözlenen kognitif bozulmanın arkasında yatan temel mekanizmanın amiloid plaklar ve plaklarla ilişkili nöritik distrofi olduğu görüşünü desteklememektedir [10, 192]. Benzer şekilde hastalığın diğer önemli histolojik belirteci olarak kabul edilen nörofibril kümelerinin de her koşulda nöronal fonksiyonları bozmadığı ve bu kümelerin temel bileşeni tau proteininin bu yapıdan bağımsız olarak nöronal disfonksiyona yol açabileceği hayvan modellerinde yapılan deneylerde gösterilmiştir[102]. Tüm bu çalışmalar özetlenirse,

AH'deki kognisyon azalmasının temel bileşenleri olarak aşırı nöronal ağ aktivitesi, disfonksiyon, sinaps kaybı ve belirli nöronal popülasyonların dejenerasyonu sayılabilir. Tüm bu anormalliklerin farklı faktörler ve yollar arasındaki patolojik etkileşimler sonucu oluşması daha muhtemel görünmektedir.

2.6. Alzheimer Hastalığında Terapötik Yaklaşımlar

2.6.1. Kolinesteraz İnhibitörleri

Alzheimer hastalığında merkezi sinir sisteminde selektif olarak gözlenen azalan asetilkolin miktarı ve kolinerjik ileti bozulması ile karakterize edilen kolinerjik yetmezlik hastalığın patogenezi içinde önemli bir role sahip olduğundan asetilkolin miktarının artırılmasının bilişsel fonksiyonlarda iyileşme sağlayabileceği düşünülmektedir. Amerikan Gıda ve İlaç Cemiyeti (FDA) 1993 yılından itibaren takrin, donepezil, rivastigmin ve galantamin olmak üzere dört tane kolinesteraz inhibitörünün Alzheimer hastalarında kullanılmasını onaylamıştır. Birçok merkezde gerçekleştirilen çalışmalar donepezil, galantamin ve rivastigmin uygulaması neticesinde hastalarda kognitif ve günlük hayatla ilişkili genel fonksiyonlarda iyileşme gözlemlendiği bildirilmiştir. Geliştirilen ilaçların hastalarda yaygın olarak kullanımında güvenlik, tolere edilebilirlik profili ve risk/yarar oranı kritik bir öneme sahiptir. Donepezil ve galantamin kullanımına bağlı yan etkilerin tolere edilebilir sınırlarda olduğu, rivastigminin terapötik dozda kullanımında ise bulantı ve kusma gibi yan etkilerin insidansının yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak bu ilaçların hastalığın ilerlemesine etkilerinin az ve geçici olduğu ifade edilmekte [199], bu nedenle kombinasyon ilaç uygulamalarının terapötik etkinliği arttırabileceği düşünülmektedir. Yan etkileri daha az olan ve kolinerjik sistemin yanı sıra hastalıkta gözlenen diğer patolojik değişimlere de etki edebilecek multimodal ilaçların geliştirilmesine yönelik araştırmalar halen devam etmektedir.

2.6.2. Amiloid β Hedefli Tedavi Stratejileri

Alzheimer hastalığının patofizyolojisine ilişkin son yirmi yılda elde edilen kanıtlar ışığında A β seviyesinin azaltılmasına yönelik ajanlar geliştirilmeye çalışılmıştır. Amiloid β üretiminin azaltılması için amiloid prosesinde görev alan beta ve gamma sekretaz enzimlerini inhibe eden ilaçların geliştirilmesi hedeflenmiştir [80]. Bu enzimlerin yapısı uzun süredir bilinmesine rağmen bu alandaki en önemli problem kan beyin bariyerini geçebilen ve diğer proteinlerin (Notch ve voltaj kapılı sodyum kanalları gibi) kesilmesi sürecini etkilemeden APP kesimini spesifik olarak inhibe eden ilaçların geliştirilmesindeki zorluktur [80].

Hayvan deneylerinde beta sekretaz inhibitörlerinin ventriküler enjeksiyonu A β 40/42 seviyelerini düşürmüştür. Ancak genellikle küçük peptid yapısındaki bu inhibitörlerin kan beyin bariyeri penetrasyonları az olduğundan klinik uygulamaya uygunlukları yoktur. Kan beyin bariyerini geçebilecek küçük moleküler yapıdaki beta sekretaz inhibitörlerini geliştirmeye yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Ayrıca, APP'nin dimerizasyonu neticesinde azalan A β üretiminin beta sekretazın proteinle etkileşiminin bozulmasıyla ilişkili olduğu öne sürülmüş böylece APP'de bazı yapısal

değişiklikler oluşturulmasının belirli enzimlerin aktivitesini engelleyerek terapötik bir fayda sağlayabileceği belirtilmiştir.

Hayvanlarda yapılan çalışmalarda gamma sekretaz inhibitörlerinin plazma ve serebrospinal sıvıda A β seviyesini azalttığı belirlenmiş, gamma sekretaz inhibitörü olan tarenflurbil'in insanlarda da A β seviyesini benzer şekilde azalttığı ve iyi derecede tolere ettiği saptanmıştır. Ancak, faz III klinik çalışmasında kognitif ve fonksiyonel ölçümlerde herhangi bir fayda gözlenmemesi üzerine bu inhibitörle ilişkili çalışmalar sonlandırılmıştır [200]. Alfa ve beta sekretaz APP'nin aynı kesim noktasıyla etkileşmesi sebebiyle alfa sekretaz aktivitesinin artırılmasının A β seviyesini azaltabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle alfa sekretaz enzim yapısını ortaya çıkarmaya yönelik pek çok çalışmanın neticesinde adamalisin protein ailesinden disintegrin ve metalloproteinaz domain taşıyan protein (ADAM) 10,17ve9 proteinlerinin alfa sekretaz aktivitesinde etkin olduğu bulunmuştur. ADAM10 ekspresyonunun indüklendiği mutant insan APP transgenik farelerde azalan amiloid birikimlerinin yanı sıra uzun süreli güçlenmede (LTP)artış ve kognitif fonksiyonlarda düzelme gözlenmiştir [201]. Alfa sekretaz aktivitesini arttırmayı hedefleyen birçok ajan halen incelenmektedir. Örneğin,protein kinaz C(PKC) aktivatörü 'TPPB' bileşiğinin alfa sekretaz aktivitesini arttırdığı ve A β salınımını azalttığı belirlenmiştir [202]. Ayrıca, PKC ve alfa sekretazın membrana translokasyonunu etkileyen yada PKC aktivasyonu aracılığıyla alfa sekretaz stimülasyonunu uyaran bileşikler gibi farklı yollardan etki eden ajanların da hastalıkta terapötik potansiyeli olabileceği gösterilmiştir.Gamma sekretaz inhibitörü olarak geliştirilen bir başka ilaç ise faz III denemelerinde kognitif problemleri kötüleştirdiği için durdurulmuştur[203]. Büyüme ve gelişimde rolü olan Notch proteini de gamma sekretaz için substrat olduğundan bu enzimin inhibisyonuna yönelik çalışmalar yön değiştirmiş, modülasyonunun daha etkili olabileceği ifade edilmiştir. Enzimin modülasyonu yoluyla kesim noktasının kaydırılarak daha küçük fragmanların oluşumunun faydalı etki gösterebileceği belirtilmekle birlikte küçük amiloid beta fragmalarının nörotoksik etkilerini gösteren çalışmalar dikkate alındığında bu modülatörlerin etkinliği ve güvenilirliğinin sınırlanabileceği düşünülmektedir.

Amiloid β temizlenmesini fasiliteederek biriken A β 'nın miktarının azaltılması için A β 'ya özgü aşılar geliştirilmiş, bu immünizasyonun transgenik hayvanlarda plak birikimini azalttığı gözlenmiştir[204]. Ancak bu aktif immünizasyon metoduyla ilgili araştırmalarda insanlarda ciddi yan etkilerin tetiklendiği belirlenmiştir [205]. Tekrar eden infüzyonlarla düşük dozda anti-A β antikollarının verildiği pasif immünizasyon çalışmaları ise halen devam etmektedir [206].

Amiloid β üretimi, degradasyonu ve kan beyin bariyerinden transportu arasında kinetik bir denge vardır. Amiloid β 'nın temizlendiği bilinen 'vasküler yolak' olarak isimlendirilen vasküler sisteme ek olarak A β degrade eden enzimler olarak sınıflandırılan proteazlarında bu temizlenme sürecinde etkin olduğu bulunmuştur. Nephilisin (NEP), insulin degrade edici enzim (IDE), endotelin çevirici enzim (ECE), angiotensin dönüştürücü enzim (ACE) gibi proteazların A β 'yı degrade edebildiği saptanmıştır. Araştırmalarda NEP aktivitesinin yaşla azaldığı belirlenmiş,

hayvanlarda NEP ekspresyonunun arttırılmasının A β miktarını azaltırken uzaysal hafızayı düzelttiği tespit edilmiştir. Gen transfer çalışmalarından elde edilen olumlu bulgular dikkate alınarak, NEP aktivitesini arttırabilecek küçük moleküllerin bulunması amaçlanmaktadır. Örneğin, epilepsi tedavisinde kullanılan valproic asidin sıçanlarda hipokampüsde NEP ekspresyonunu ve aktivitesini arttırdığı, hipoksiye uğramış sıçanlarda da hafıza bozukluğunu düzelttiği bulunmuştur[207]. Ayrıca, hücre kültürü çalışmalarında APPICDbileşeninin de NEP transkripsiyonunu arttırdığı, APPICD miktarına etki eden hücre içi sinyal yollarının da NEP protein seviyesini arttırdığı bulunmuştur [208]. Dolayısıyla A β degradasyonunda etkili olan proteazların direk yada ilgili sinyal yolları ile indirek olarak modülasyonunu sağlayan ajanların A β birikimlerinin azaltılmasında fayda sağlayabileceği kanısına varılmıştır.

Bunlara ilaveten, A β peptidlerinin kümelenmelerini önlemeye yönelik anti fibrilasyon sağlayan ajanların etkileri halen incelenmektedir [209]. Bu yaklaşımlara alternatif olarak nöronları A β toksisitesine karşı daha dirençli hale getirerek hastalıkta gözlenen patolojik değişimleri önlenebileceği düşünülmektedir.

2.6.3. TauHedefli Tedavi Stratejileri

Son yıllarda tau proteiniyle ilişkili hücre sel mekanizmalar ve AH'de tau ile bağlantılı moleküler değişimler hakkında daha fazla bilgi elde edilmiştir. Bu nedenle tau ile ilişkili terapötik yaklaşımlara ilgi artmıştır[102]. Metilen mavisinin tau-tau etkileşimini ve tau miktarını azalttığı tespit edilmiştir [210]. Dolayısıyla, Alzheimer hastalarında fenotipin metilen mavisi uygulanan faz II klinik deneylerinde hastalığın ilerleyişinin yavaşatabileceğine dair olumlu sonuçlar alınması[211], başka bir metilen mavisi ajanıyla ilişkili faz III deneyleri planlanmasına neden olmuştur. Ayrıca, hastalığın patogenezesinde rol alan anormal tau fosforilasyonunda etkili olan enzimlerde ilaç geliştirilmesi için hedef olmakla birlikte, bu enzimlerin çok yönlü fizyolojik etkileri bu konudaki araştırmaları sınırlamaktadır[102, 104].

Alternatif bir yaklaşımda merkezi sinir sistemindeki tüm tau seviyesinin azaltılmasıdır. Farelerde endojen tau seviyesinin %50 oranında azaltılmasının A β ve apoE4 fragmanlarını azaltıp nöronal ve kognitif bozuklukda düzelmeye sağladığı gösterilmiştir[102]. Bu nedenle tau seviyesinin azaltılması için direk olarak taunun ya da ekspresyonunu ve temizlenmesini düzenleyen molekülleri modüle edebilecek ajanların geliştirilmesi hedeflenmektedir. Örneğin, tau'nun ubiquitin yoluyla temizlenmesinde aracı bir protein olduğu belirlenen CHIP'in seviyesinin azaltılmasının tau birikimlerini arttırdığı ve hastaların beyinde CHIP seviyesinin düşük olduğu belirlenmiştir [212]. Tau'nun mikrotübül bağlanma özelliklerini değiştirerek kümelenmesine yol açıp ubiquitin yoluyla temizlenmesini önleyen asetilasyon mekanizmasının engellenmesinin ve proteozom fonksiyonlarının arttırılmasının patojenik tau birikimini önleyebileceği önerilmiştir [101]. Tau temizlenmesinin aktif immünizasyon yoluyla hızlandırılabilirliği düşünülmüş, tau transgenik farelerde tau birikimlerinin ve nöronal disfonksiyonun azaldığı saptanmıştır [213].

Alzheimer hastalığıyla ilgili tau transgenik hayvan modellerinde ve A β oligomerlerine maruz kalan hücrelerde mikrotübüllerde yapısal bozukluklar gözlemlendiğinden [102, 214], mikrotübül yapılarını destekleyen ajanların terapötik potansiyeli olabileceği düşünülmüştür. Yapılan prelinik deneylerde stabilize edici ajanların tau transgenik hayvanlarda aksonal transportunu düzeltirken, motor problemlerin önleendiği, mikrotübül yoğunluğunu korumada ve kognisyonda fayda sağladığı tespit edilmiştir [214]. Mikrotübül yapısındaki bozulmayı ve tau hiperfosforilasyonunu azalttığı bilinen NAP (Activity-dependent neuroprotective protein-derived peptide, (NAP))peptidinin hastalara burun yoluyla uygulandığı faz II klinik çalışmasında olumlu sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir[215].

2.6.4. Apolipoprotein E Hedefli Tedavi Stratejileri

Apolipoprotein E'ye yönelik terapötik yaklaşımda Apo E seviyesininininyada ApoE'nin A β afinitesininin artırılarak A β temizlenmesinin fasilite edilippeptidin birikiminin azaltılabileceği düşünülmektedir[180]. Ancak, Alzheimer transgenik farelerde ApoE3 ve E4 ekspresyonlarının artırılmasının beyinde amiloid birikimini arttırdığı belirlenmiştir[216]. Amiloid β ApoE etkileşiminin bloke edilmesi de alternatif bir yaklaşım olarak ortaya konmakla birlikte, ApoE'nin hem plak oluşumu hem de A β temizlenmesinde rol alması bu konuda soru işaretlerine yol açmıştır. Bununla birlikte, ApoE lipid içeriğinin artırılmasının mikrogliya ve astrositleri aktive ettiği ve A β degradasyonunu tetiklediği gösterilmiştir. Nükleer reseptör stimülasyonunun beyinde A β birikimini azalttığı saptanmış, bu yolağın ApoE lipidasyonunu da arttırdığı göz önünde bulundurularközlenen A β azalışının ApoE bağımlı mekanizmalarla ilişkili olabileceği önerilmiştir[217]. Farklı nükleer reseptör modülatörleri ve ApoE aktivatörlerine yönelik çalışmalar da literatürde yer almaktadır[218].

Apolipoprotein E4 allelinin kendi domainleri arasındaki etkileşimin bu izoformun hücreler arasındaki trafiğini bozarak toksik etkilerinde rol aldığı bilindiğinden, özel modelleme teknikleri kullanılarak bu etkileşimi bloke eden bir molekül geliştirilmiştir. Bu ajanın ApoE4 hücreler arası trafiğini düzelterek bu izoformun nörit büyümesi, mitokondri fonksiyonları ve A β üretimi üzerindeki olumsuz etkilerini önlediği saptanmıştır [188]. Ayrıca nörotoksik apoE fragmanlarının temizlenmesi için bu fragmanları hedefleyen monoklonal antikorların kullanılması da farklı bir terapötik yaklaşımdır. Bunlara ilaveten, ApoE4 ekspresyonunun azaltılmasının da toksik fragmanların oluşumunu önleyebileceği ifade edilmiştir[179]. Son olarak sentetik apoE mimetik peptidin de akut beyin hasarı gerçekleşen farelerde ve hAPP eksprese eden Drosophila'da koruyucu olduğu bulunmuştur[219].

2.6.5. Metal Şelatörleri

Amiloid prekürsör proteinininkesilmesiyle ilişkili moleküler işlemlerde ve tau hiperfosforilasyonunda metallerin (Cu, Zn ve Fe) rol aldığı bilinmektedir. Çinko ve bakır şelatörlerinin A β birikimini inhibe ettiği gösterilmiş, bu iyonların A β ile bağlanmasını inhibe eden clioquinol molekülünün uygulandığı faz II klinik deneylerinde bilişsel fonksiyonların düzeldiği, plazma A β 42 seviyesinin ve çinko

konsantrasyonunun azaldığı bulunmuştur. XH1, DP-109, PBT2 gibi diğer metal şelatörlerinin de kognitif fonksiyonları arttırdığı ve serebrospinal sıvıda Aβ42 miktarının azaldığı saptanmıştır[220].

2.6.6. N-metil-D-aspartik Asit Reseptör Antagonist

Glutamat merkezi sinir sisteminde ana eksitator nörotransmitterdir ve öğrenme ve hafıza ile ilişkili nöronal yollarda rol almaktadır. Alzheimer hastalığında anormal glutamat seviyesinin nöronal disfonksiyon, hücre ölümü ve kognitif bozulmada rol oynadığı bilinmektedir. 2003 yılında FDA Alzheimer hastalığında NMDA reseptör antagonisti olan memantinin kullanımını onaylamıştır. Memantinin NMDA reseptör aktivitesini modüle ederek hasarlanan hücreleri onardığı ve anormal ekzitator sinyalleri azalttığı belirlenmiştir[221]. Donepezil ile memantinin birlikte uygulandığı hastalarda kognitif, fonksiyonel ve genel semptomlarda anlamlı bir iyileşme gözlenmiştir[222].

2.6.7. Antioksidanlar

Son yıllarda AH'de ana tedaviye yardımcı olarak vitamin E [223], vitamin C [224, 225], lipoik asit [226], ve kurkumin[227] gibi antioksidanların tedavi sürecine katılmasının fayda sağlayabileceği önerilmektedir. Bu ajanların serbest radikal üretimini azaltarak oksidan strese karşı koruma sağlayıp, nöronal hasarı azaltabileceği ileri sürülmüştür. Sano ve ark. (1997) [224] klinik denemelerde vitamin E aktivitesi en fazla olan alfa-tokoferolün hastalığın ilerleyişini yavaşlattığını ve serbest radikal seviyesi azalttığını saptamışlardır. İnvitro ve transgenik hayvanlarda gerçekleştirilen çalışmalarda vitamin E'nin Aβ seviyesini ve kümelenmesini azalttığı ve lipid peroksidasyonu önlediği belirlenmiştir [228]. Ancak belirli bir antioksidanın uzun süreli ya da yüksek dozda kullanımı molekülün okside olarak pro-oksidan bir madde haline gelmesine yol açmaktadır. Bu nedenle hastalarda birçok antioksidanın uygun dozlarda kullanımının toksik etkiyi azaltarak daha fazla fayda sağlayabileceği düşünülmektedir[229]. Örneğin, alfa-tokoferolün askorbik asit (vitamin C) ile birlikte kullanımının etkinliğini arttırdığı saptanmıştır [225]. Ancak, bir başka çalışmada hastalarda bir yıl boyunca Vitamin E ve C'nin birlikte kullanımının serebrospinal sıvıda antioksidanları arttırmakla birlikte klinik bulgularda bir fark yaratmadığı gözlenmiştir [230]. Alzheimer hastalarında B12 vitamininin serum seviyesini azalttığı belirlenmiş, hastalara B12 vitamin takviyesinin azalan kognitif fonksiyonları geliştirdiği ifade edilmiştir [231]. Ancak daha sonra gerçekleştirilen araştırmalarda B12 vitamininin hastalarda serum homosistein seviyesini düzeltirken, kognitif bozukluğunun ilerleyişinde herhangi bir yavaşlama sağlamadığı belirtilmiştir [232].

Alfa-lipoik asit kullanan hastalarda demans ilerlemesinin yavaşladığı öne sürülmüştür[233]. Bu konuyla ilgili çalışmalarda lipoik asitin vitamin C, E ve glutatyon gibi diğer antioksidanların geri dönüşümünü sağladığı, ACh üretimini arttırdığı ve metal şelatör gibi davranarak lipid peroksidasyonu azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda Alzheimer transgenik hayvanlara etkisi test edilmiş, lipoik asitin oksidatif değişiklikleri önlemekle birlikte Aβ birikimine ve kognitif fonksiyonlara etkisinin sınırlı olduğu ifade edilmiştir [226].

Benzer bir çalışmada lipoik asitin uzun süreli kullanımının hem kontrol hem de AH transgenik hayvanlarda lipid peroksidasyonu azalttığı fakat A β seviyesini etkilemediği gözlenmiştir [234]. Farklı antioksidanların birlikte kullanımının koruyucu etkilerini arttırabileceği öngörülerek Alzheimer hastalarından elde edilen fibroblast hücrelerine lipoik asit ve N-asetil-sisteinbirlikte uygulanmış, oksidan hasar ve apoptoside kombine kullanıma bağlı olarak daha etkin bir azalma belirlenmiştir [235]. Benzer şekilde lipoik asit, L-karnitin ve dokosaheksaenoik asit içeren diet uygulanan farelerde ROS üretiminin demirce zengin diet uygulanan farelere göre %57 oranında azaldığı ve bilişsel performansın arttığı saptanmıştır [236]. Olası terapötik potansiyeli incelenen bir diğer antioksidan da bir polifenol olan kurkumindir. Lim ve ark. (2001) [227]gerçekleştirdikleri çalışmada kurkuminin oksidatif stresi, amiloid plak oluşumunu ve artışı azalttığı bulunmuştur. Bir başka çalışmada 3 hafta süreyle kurkumin kullanımının sıçanlarda oksidan hasara bağlı kognitif zayıflamayı azalttığı saptanmış, AH'de adjuvan bir ajan olarak kullanılabilirliği önerilmiştir[237]. Ancak, 6 ay süreyle kurkumintedavisi uygulanan Alzheimer hastalarında klinik bulgularda herhangi bir düzelme gözlenmemiştir [238].Benzer şekilde Ringman ve ark. (2012)[239] da6 ay süreli kurkumin uygulamasının iyi tolere edilmekle birlikte kognitif ve biyokimyasal bulgularda iyileşmeye yol açmadığını raporlamışlardır. Ginkgo biloba [240]ve östrojen [241]gibi diğer antioksidanların denendiği klinik çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiş, hastalığın ilerleyişi ve klinik semptomlarda bir değişiklik gözlenmemiştir. Kırmızı şarapta oldukça fazla miktarda bulunan bir polifenol olan resveratrolün birçok organ sisteminde yaşlanmayla ilgili süreçlerde etkili olduğu saptanmış, Alzheimer hastalığının ilerleyişinin yavaşlatılmasında etkili olabileceği düşünülmüştür. Yapılan hayvan deneylerinde bu polifenolün antioksidan ve anti-inflamatuar etkiler ile A β birikimini inhibe ederek nörokoruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir [242]. Gözlenen bu etkilerin sirtuin proteinlerinininsalınımına yol açan yolların aktivasyonu ile olabileceği vurgulanmıştır. Alzheimer tedavisinde resveratrol metabolitlerinin kullanılması insanda sirtuin bağımlı ve bağımsız sinyal yollarınınve terapötik potansiyeli planlanacak çalışmaların sonuçlarına bağlıdır.

Alzheimer hastalığındadiet biçiminde yada adjuvan olarak antioksidanlarınkullanımı düşük riskli, toksik etkisi az ve daha kolaytolere edilebilirliği bir terapötik yaklaşım olarak kabul görmektedir[243]. Ancak günümüze kadar klinik çalışmalardanenen ajanların bilişsel fonksiyonlara ve amiloid birikimine herhangibir etkisi gözlenmemiştir. Sonuç olarak AH patogenezi genetik ve çevresel faktörlerin dahil olduğu kompleks bir süreç olduğundan hastalığın ilerleyişini etkileyebilecek multimodal ilaçların geliştirilmesi oldukça zor bir iştir. Maalesef günümüzdeki tedavi yaklaşımları kognitif gerileme hızını geçici olarak azaltıp, hastalarda sınırlı derecede iyileşme sağlayabilmektedir. Ancak moleküler hedeflerle ilgili artan bilgi birikimi potansiyel terapötik bileşiklerin hızlıca belirlenmesinive hastalığı önlemeye yönelik yeni ajanların geliştirilmesini mümkün kılmaktadır.

2.6.8. Rosmarinik Asit

Rosmarinik asit *Artemisia capillaris*, *Calendula officinalis*, *Melissa officinalis*, *Salvia officinalis* gibi birçok bitkide bulunan doğal polifenolik bir bileşiktir. Bugüne kadar çeşitli dokularda yapılan incelemeler neticesinde RA'nın antioksidan, antiviral ve anti-inflamatuar etkileri bulunduğu tespit edilmiştir. Bu özellikleri göz önünde bulundurularak nörodejeneratif süreçlerdeki moleküler değişimlere etki ederek koruyucu olabileceği öne sürülmüştür. Nitekim, RA'nın sivrisinek kaynaklı viral bir hastalık olan Japon ensefalitinde anti-inflamatuar etki gösterdiği bulunmuştur[244]. Alzheimer hastalığında artan ROS'un kognitif zayıflama ve nöronal kayıpta etkili olduğunu gösteren bulgular dikkate alınarak, RA'nın bu patolojik değişiklikler üzerine etkisi çeşitli invitro çalışmalarda araştırılmıştır. Rosmarinik asitin PC12 hücrelerinde A β 42 indüklü ROS oluşumunu ve lipid peroksidasyonu doz bağımlı olarak azalttığı, hücre ölümünü önlediği bulunmuş[58], bu doğal bileşiğin A β kaynaklı oksidatif hasara karşı nöroprotektif bir ajan olarak tedavi amacıyla kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Reaktif oksijen türlerinin indüklediği hücre ölümüne karşı benzer koruyucu etkileri astrositlerde ve makrofajlarda da gözlemlenmiştir[245]. Ayrıca sıçanlarda A β 25-35 uygulamasına bağlı reaktif nitrojen türlerini azaltmasının yanı sıra hafıza bozukluğunun da düzelmesinde etkili olduğu belirlenmiştir [246]. Diğer yandan, RA'nın p38 MAP kinaz yolağını inhibe ederek tau hiperfosforilasyonunu, kaspaz 3 aktivasyonunu ve DNA fragmantasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir[58].

Amiloid β kümelenmesinin önlenmesini hedefleyen terapötik strateji kapsamında RA'nın doz bağımlı olarak A β 40 ve A β 42'den fibriller A β (fA β) oluşumunu, uzamasını önlediği ve ayrıca oluşan fibriller yapıda A β 'ların stabilizasyonunun bozulduğu in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir[57]. Rosmarinik asit uygulanan gruplarda A β birikimlerinin azalırken çözülebilir A β monomerlerinde arttığı saptanmıştır. Bu etkinin biyokimyasal mekanizmasına yönelik incelemelerde RA'nın kısa bir karbonhidrat zinciriyle bağlı iki fenol halkasının serbest A β 'ya bağlanarak, A β 'nin fA β 'ya polimerizasyonunu inhibe ettiğini, ya da bu yapının fA β 'ya bağlanarak fA β 'daki A β moleküllerinin β -sheet konformasyonunu destabilize ettiğini öne sürülmüştür [58].

Alzheimer hastalığının patofizyolojisinde kolinerjik sistemin önemi göz önünde tutulursa, RA'nın beyin ACh nörotansmitter sistemine olası etkilerinin ortaya çıkarılması bu polifenolün terapötik potansiyelinin anlaşılması bakımından önem taşımaktadır. Bir invitro çalışmada RA'nın ACh seviyesini ve AChE aktivitesini arttırdığı bulunmuştur [59]. PC12 hücrelerinde RA'nın mitogen aktive protein kinaz (MAPK), ekstraselüler sinyal regüle kinaz (ERK) sinyal yollarını etkileyerek nörotrofik mekanizmaların tetiklediği ve bu etkinin yanısıra kolinerjik fonksiyonları da iyileştirdiği saptanmıştır[59, 60]. Ayrıca, daha önceki çalışmalarda RA'nın belirlenen anksiyolitik etkisinin tirozin hidroksilaz, piruvat karboksilaz, MAPK gibi genlerin ekspresyonunun ve onlarla ilintili dopamin, serotonin ve asetilkolin gibi çeşitli nörotransmitterlerin seviyesinin modülasyonu ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Tüm bu sonuçlar RA'nın AH hayvan modellerinde belirlenen antioksidan ve anti amiloidojenik etkilerinin yanı sıra hastalıkta bozulan kolinerjik ileti üzerine de etki göstererek çok yönlü terapötik bir ajan olabileceğine işaret etmektedir.

2.7. Alzheimer Hastalığı ve Beyin Sinyalleri

Hans Berger ilk EEG çalışmasını gerçekleştirip, alfa osilasyonlarını tanımladıktan sonra bu konuda birçok klinik ve temel araştırma gerçekleştirilmiş, uyku ve dinlenme gibi farklı koşullarda birçok osilatör patern tanımlanmıştır. Ancak daha sonra gerçekleştirilen çalışmalarda uyanıklık halinde ve bilişsel süreçler sırasında kaydedilen spontan EEG kayıtlarının düşük genlikli, desenkronize bir patern göstermesi, bu osilasyonların anestesi ve epileptik nöbetler gibi bilinç dışı durumlarla ilişkili olduğunun düşünülmesine yol açmıştır. Bunun sonucunda bilişsel beyin süreçleriyle osilasyonları ilişkilendirmeye yönelik çalışmalara ilgi azalmıştır. Son yıllarda artan teknolojik imkanlara paralel olarak gelişen deneysel metotlar beynimizin nasıl çalıştığının anlaşılması, çeşitli bilişsel süreçlerle ilişkili fonksiyonel mekanizmaların çözümlenmesinde bilim adamlarına yol gösterecek yeni bulgular sağlamış, bu bulgular ışığında nöronal osilasyonların bu süreçlerdeki rolünü incelemeye yönelik çalışmalar artmıştır.

Sinirbilim alanında osilatör dinamiklerin analiziyle ilgili çalışmalarda, EEG'nin tanı yöntemi olarak kullanılmasının yanı sıra, yüksek temporal çözünürlükle bilişsel işlemlerdeki anormalliklerin belirlenmesine ve Alzheimer hastalığının teşhisine olanak sağlayabilecek güçlü bir teknik olduğu belirtilmiştir [41, 44]. Elektroensefalografi sinir hücre gruplarının doğal frekansları olarak kabul edilen farklı frekans bandlarındaki dalgaların süper-pozisyonu ile (dalgaların üst üste binmesi ile) meydana gelen beynin elektriksel aktivitesidir. Yapılan EEG çalışmaları neticesinde, çeşitli frekans bandlarındaki osilatör aktivitenin bilgi işlenmesinin değişik aşamalarını yansıttığı, en basit bilişsel fonksiyonların dahi oldukça geniş nöral ağları aktive ettiği ortaya konmuştur [247, 248]. Diğer yandan, spontan EEG'nin belirli periyodlarını inceleyerek elde edilen bilgilerin sınırlı olması nedeniyle yakın zamanda AH ile ilişkili çalışmalarda beyin fonksiyonlarının göstergesi olarak daha çok uyarılmış ve olaya ilişkin potansiyeller incelenmiştir. Ses, ışık gibi uyaranlar sonucunda değişikliğe uğrayan EEG sinyalinin toplanıp ortalaması alınarak elde edilen potansiyel değişiklikleri uyarılmış potansiyeller (UP), bir bilişsel uyaran sonrasında EEG'de açığa çıkan potansiyeller ise OİP şeklinde tanımlanmaktadır. Olaya ilişkin potansiyeller duyusal bilginin işlendiği nöral ağların yanı sıra, bilişsel süreçlerle ilişkili nöral ağların aktivitesini de yansıttığı için daha faydalı bilgiler sağlayacağı düşünülerek tercih edilmektedir. Dolayısıyla ifade edilen özellikleri nedeniyle Bipolar bozukluk, Şizofreni, Alzheimer gibi çeşitli nörolojik hastalıkların patogenezi aydınlatmaya çalışan çalışmalarda OİP sinyallerinin hafif bilişsel bozukluk ve AH ile ilgili erken işaretlerin belirlenip uygun terapötik yaklaşımların geliştirilmesinde ve hastalığın prognozunun takibinde güvenilir bir biyogösterge olabileceği belirtilmiştir [248].

Alzheimer hastalarında gerçekleştirilmiş UP ve OİP çalışmalarında işitsel ya da görsel erken sensöri bileşenlerin latenslerinin ve genliklerinin değişmediği gözlemlenmiştir [249]. Goodin ve Aminoff 1987 [249] yılında gerçekleştirdikleri çalışmada hastalardan kaydedilen olaya ilişkin işitsel N1 ve P2 cevaplarının değişmediğini saptamışlardır. Ayrıca, bu erken sensöri bileşenlerin normal yaşlanma sürecinden fazla etkilenmemekle birlikte, subkortikal yapılarla ilintili Huntington ve

Parkinson hastalığında değiştikleri bulunmuştur [250]. Bazı çalışmalarda hastalarda patern ve flash uyarı cevaplarında P2 bileşeninin latensinde uzama belirlenmiş [251], bu değişimin AH'yi diğer demanslardan ayırmak için kullanılabileceği ne srlmştir[252]. Ancak, daha sonra gerçekleştirilen bazı çalışmalarda bu bulgular teyit edilememiş, hastalarda görsel UP ve OİP cevaplarını normal değerlerde olduğu ifade edilmiştir [253]. Alzheimer hastalarında rastgele nokta hareketlerinin görsel takibinde bozulma ile birlikte görsel hareketle ilişkili OİP'nin N2 bileşeninin genliğinde ciddi bir azalma olduğu saptanmış, daha sonra bu N2 bileşeninin incelendiği pekçok çalışmada bu bulgu desteklenmiştir [254].

Alzheimer hastalarından kaydedilen spontan EEG'lerin g spektrumları incelendiğinde özellikle temporoparietal bölgelerde delta ve teta bandlarındaki aktivitenin arttığı, alfa bandındaki aktivitenin ise azaldığı tespit edilmiştir [40, 41]. Alzheimer hayvan modellerinde ve Aβ uygulanan invitro deneylerde de benzer şekilde spontan EEG aktivitesinde yavaşlama saptanmıştır [50]. Ayrıca sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında AH'de uzak yapılar arasındaki koherans değerlerinin alfa ve beta bandlarında azalması spontan EEG'de gözlenen en yaygın bulgudur [42]. Alzheimer hastalarında fotik uyarı ile oluşan UP'lerde alfa bandındaki (9.5–10.5 Hz) koherans değerlerinin hemisferler arasında ve aynı hemisfer içinde kontrollere göre azaldığı saptanmıştır[43]. Yakın tarihte yapılan başka bir çalışmada ise Yener ve ark. [45]hastalarda basit ışık uyarısından sonra bi-parietal ve sağ oksipital elektrot alanlarında yüksek teta osilatör cevapları gözlemlemişlerdir. Osipova ve ark. [255]da benzer şekilde AH hastalarında temporal bölgede işitsel uyarıyla tetiklenen osilasyonların genliğinin yükseldiğini saptamışlardır. Bu bulgulara dayanarak duyuşal uyarılmış kortikal cevaplarda gözlenen artışın prefrontal bölgenin inhibitör etkinliğinin hastalığa bağlı olarak azalması ile ilişkili olabileceği öne srlmştir. Yayınlanan birkaç OİP çalışmasında da AH hastalarında sol frontal ve sentral alanların en fazla etkilenen bölgeler olduğu ve sentral bölgede en çok etkilenen frekans bantlarının delta ve teta bandları olduğu ifade edilmiştir [45, 46]. Alzheimer hastalarından kaydedilen görsel OİP'lerin g spektrumları incelendiğinde delta bandındaki pik genliğinin sentral bölgelerde[46], işitsel OİP'lerin analizi ile de delta bandının genliğinin frontal bölgelerde azaldığı saptanmıştır[47]. Dolayısıyla, uyarı modalitesinden bağımsız olarak gözlenen sentral ve frontal delta cevaplarındaki azalmanın hastalardaki azalan frontal fonksiyonların ve karar verme bozukluğunun bir göstergesi olabileceği belirtilmiştir. Bu bulgulara ek olarak, hastalarda görsel OİP'ler incelendiğinde sentral bölgelerde delta bandında [46] ve sol frontal alanlarda teta bandında faz kilitlemesi değerlerinin düştüğü izlenmiştir [45].

Hastalara hafızayla ilişkili farklı bir paradigma uygulanarak yapılan bir çalışmada ise sentral ve temporal elektrotlar arasındaki koherans değerlerinin azaldığı [256], görsel oddball paradigması kullanarak yapılan başka bir incelemede de fronto-parietal kayıt alanlarında alfa, teta ve delta frekans bandlarında koherans değerlerinin azaldığı belirlenmiştir [257]. Bilişsel görevler sırasında azalan alfa, delta ve teta cevaplarının kortiko-kortikal bağlantıların hastalığa bağlı olarak zayıflamasıyla ilişkili olabileceği vurgulanarak, AH'de bilişsel stimulasyon sonrası

düşük frekans bandlarındaki koherans fonksiyonunun tüm diğer elektrofizyolojik parametrelerden daha çok etkilendiği öne sürülmüştür[41][256].

2.8. Uyumsuzluk Negativitesi

Uyumsuzluk negativitesi (MMN) bir dizi uyarıdaki ani bir değişim neticesinde ortaya çıkan ve uyarının başlangıcından 100-250 ms sonra özellikle temporal alanlarda pik değerine ulaşan bir OİP bileşenidir [258]. Otomatik doğası nedeniyle işitme süreçlerinde dikkat öncesi bilişsel işlemlerle ilişkili olduğu düşünülmektedir ve bu nedenle işitsel korteksde primitif zekayı yansıttığı öne sürülmüştür[259]. Uyumsuzluk negativitesi ontolojik olarak OİP dalgasında gözlenebilecek en erken bilişsel bileşendir [260].

Uyumsuzluk negativitesinde kullanılan deneysel paradigma, ardı ardına uygulanan bir uyarı serisinde standart uyarılar içerisinde rastgele serpiştirilmiş nadir uygulanan hedef uyarılar içerir. Dolayısıyla, rasgele bir biçimde %5-20 olasılıkla verilen nadir (seyrek) uyarının standart uyarıya göre frekans, şiddet veya süre bakımından farklı olduğu durumlarda MMN'nin oluştuğu gösterilmiştir. En iyi işitsel modalitede kaydedilen MMN'nin görsel modalitede de ortaya çıktığı gösterilmiştir. İşitsel MMN bileşeninin temporal ve parietal alanlarda en yüksek genlikte kaydedildiği belirlenmiş [258]. fronta-temporal ağ tarafından oluşturulduğu öne sürülmüştür [261, 262]. Uyumsuzluk negativitesinin özel görev gereksinimleri olmaksızın kişinin motivasyonundan bağımsız ve dikkat olmaksızın elde edilebilmesi farklı klinik popülasyonların test edilmesinde uygun bir metod olmasını sağlamaktadır[263]. Aynı zamanda MMN'nin işitsel sensöri kesinlik için tek objektif belirleyici olduğu düşünülmektedir [264].

2.8.1. Uyumsuzluk Negativitesinin Nöronal Mekanizması

Literatürde MMN kayıtlarını içeren veya MMN mekanizmasına yönelik pek çok yayın olmasına rağmen bu bileşenin oluşumunun altında yatan nöronal mekanizmalar halen tartışma konusudur. Yapılan yayınlarda bu mekanizmalara yönelik iki temel hipotezin öne çıktığı izlenmektedir. Bu hipotezler sensöri hafıza teorisi ve adaptasyon hipotezi başlıkları altında incelenmektedir. Yakın zamanda yapılan yayınlarda ise bu iki hipotezin birleştirildiği empirik Bayes teorisini temel alan tahmine dayalı kodlama 'predictive coding' yaklaşımı bütünleştirici bir model olarak önerilmektedir.

Sensöri hafıza teorisi

Uyumsuzluk negativitesi bileşeninin dikkat öncesi sensöri hafıza mekanizmalarıyla ilişkili otomatik bir değişim belirleme indeksi olarak görülebileceği ifade edilmiştir[265], çalışmalarda MMN'nin nasıl oluştuğuna dair pek çok görüş öne sürülmüştür. Naatanen ve ark. 1992 yılında yayınladıkları çalışmalarında MMN'nin gelen işitsel uyarı ile bir önceki sesin hafıza izinin karşılaştırılması neticesinde ortaya çıktığını önermişlerdir [262]. Aynı paralellikteki diğer yayınlarda da hafızadaki algı modeline dayalı tahminle gelen uyarının çelişmesi durumunda varolan algı modelinin yeniden düzenlenmesi gerektiği belirtilmiştir. Nöronal ağda bu yeniden düzenleme işlemlerini tetikleyen hata sinyalinin MMN bileşenini oluşturduğu ifade

edilmiş ve bu görüş model yeniden ayarlanması hipotezi olarak adlandırılmıştır[266]. Bu bağlamda MMN gelen ve önceki uyarıların karşılaştırılması yoluyla öğrenilmiş düzenlilikten sapmayı dedekte etme yeteneğinin bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir [266]. Sonuç olarak bugüne kadar birçok çalışmada desteklenmiş olan en yaygın görüş öğrenilmiş olan düzenli uyarı biçiminde ortaya çıkan bir değişimin uyumsuzluk belirleme işlemiyle ilişkili nöronal mekanizmaların aktivasyonuna yol açarak MMN'yi oluşturduğudur.

Uyumsuzluk negativitesinin oluşumunda temporal bölgeyle ilişkili sensöri hafıza mekanizmasına ek olarak diğeri frontal bölgeyle ilişkili otomatik dikkat kayması mekanizmasında rol aldığı ifade edilmiştir[261]. Prefrontal bölgedeki nöronal ağın rolü olduğu görüşü bu bölgede lezyon olan hastalarda MMN genliğinin kaybolduğunu gösteren incelemeyle kuvvetlenmiş [267], bu bölgelerin MMN bileşenine katkısının zamansal dinamiklerinin de temporal bölgeye göre farklı olduğu saptanmıştır [268]. Bu hipotez temporal korteksde bulunan uyumsuzluk belirleme sisteminin prefrontal korteks tarafından yukarıdan aşağı olacak şekilde modüle edildiğinin gösterilmesi ile de desteklenmiştir[269]. Sinyal kaynağının matematiksel modellerle hesaplandığı çalışmalarda da MMN'nin kaynakları bilateral olarak temporal korteks [260, 261] ve sağ prefrontal korteks olarak belirlenmiştir [270]. Sensöri hafıza mekanizması temporal bölgeyle ilişkilendirilirken, karşılaştırmaya yönelik işlemler prefrontal bölgeye bağlanmıştır [261]. fMRI ve EEG'nin birlikte kullanıldığı detaylı çalışmalarda frontal bölgede iki pik olduğu gösterilmiş, dipol modelleme tekniği ile iki zaman penceresinde OİP bileşeninin yersel dağılımı belirlenmiştir [271]. Erken bileşenin superior temporal gyrusda bilateral dipollerle modellenebileceği, geç bileşenin ise sol ve sağ inferior frontal gyruslarda bulunan dipollerle modellenebileceği gösterilmiştir.

Özetle, MMN önceki hafıza izine dayanan tahmine göre gelen uyarıda bir sapma tespit edilmesi durumunda elde edilmektedir. Bu hata sinyalindeki artış bir değişim gerçekleştiğini ve beyin internal modelinin tekrar ayarlanması gerektiğini belirtmektedir. Eğer hafıza izi halen aktif iken yeni bir uyarı gerçekleşirse otomatik değişim saptaması aktive olur ve MMN cevabı oluşur [264]. Bu periyodun süresine ekoik hafıza denir ve normal bireylerde en az 10 s süreyi bulduğu belirlenmiştir [272]. Bu perspektiften MMN'nin dikkat odaklanmasında bir farklılaşmayı tetikleyen otomatik işitsel değişim saptama işlemini yansıttığı varsayılmıştır [269].

Adaptasyon hipotezi

Jääskeläinen ve ark., (2004)[273] MMN'nin fronta-temporal dinamikleri yerine daha basit bir mekanizma olan lokal nöronal adaptasyon mekanizmalarından kaynaklanan N1 cevabındaki gecikme ve azalma neticesinde oluştuğunu ifade etmişlerdir. N1(N100) cevabı uyarının fiziksel özellikleri ile ilişkilendirilmiş erken işitsel işlemlerle ilişkili negatif bir bileşendir. Çalışmada peşpeşe gelen standart uyarılarla ilişkili N1 bileşeninin genliğinin işitsel korteksteki ilgili nöronların adaptasyonuna bağlı olarak azaldığı ve uzadığı bunun neticesinde N1 dalgasının farklı bir bileşenmiş gibi yanlış bir şekilde yorumlandığı iddia edilmiştir. Bu bileşenin

genliğinin tekrar eden uyarılarda baskılandığı gözlenmiş, nadir ses öncesinde tek bir standart uyarısında MMN oluşturduğu belirtilmiştir.

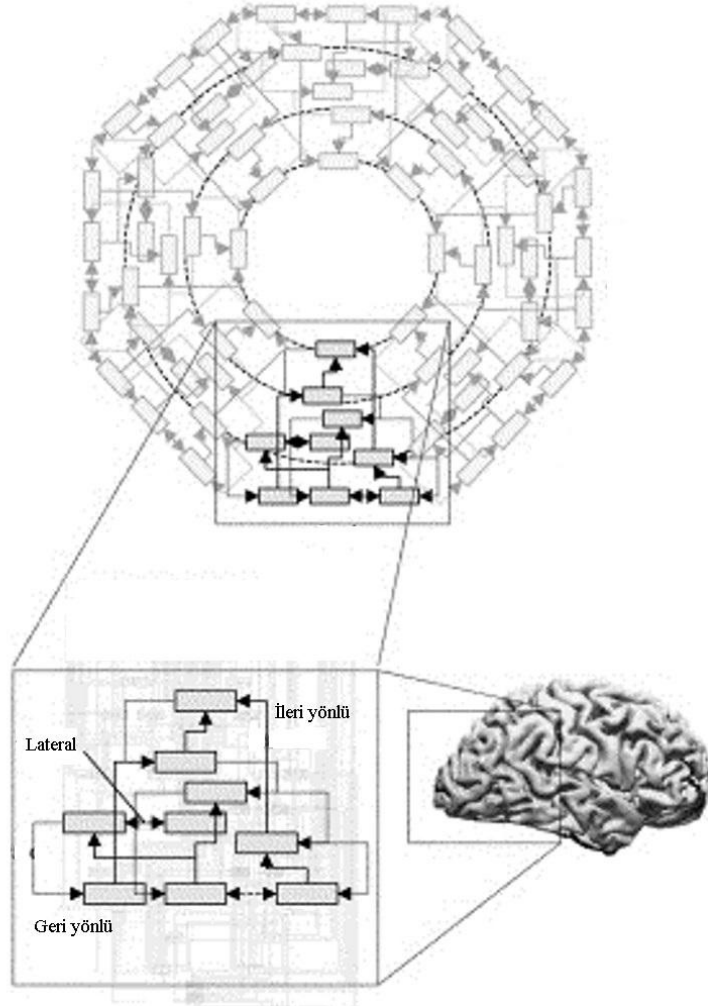
Bu görüşe karşı olarak Naatanen ve ark. (2005)[274] adaptasyon hipoteziyle uyuşmayan çeşitli bulgular olduğunu ifade etmişlerdir. Bu yayında adaptasyon hipotezinin geçerli olduğu durumda oluşan MMN'nin süresinin ve latensinin N1 bileşeni ile uyuşması gerektiği belirtilmiş ve önceki çalışmalarda bu koşulun sağlanmadığının saptandığı belirtilmiştir[275]. Ayrıca adaptasyon hipotezinin N1 bileşeninin olmadığı uyku durumunda yada bir uyarı dizisinde bir uyarının ortadan kaldırılması durumunda gözlenen MMN cevabını açıklayamadığı vurgulanmıştır [276].

Adaptasyon hipotezine karşı ortaya konulan bir diğer kanıtta belirli bir frekansa özgü adaptasyonun mümkün olmadığı paradigmalarda tonlardaki düzensiz azalmalar yada azalan tonlar arasındaki artan uyarıların da MMN cevabı oluşturmasıdır[277]. Ayrıca N1 ile MMN'nin kafatasındaki yerleşimleri birbirine uymamaktadır [261]. N1 genliğinin kontralateral hemisferde daha büyük olduğu izlenirken, MMN cevaplarının sağ hemisferde daha baskın olduğu saptanmıştır [278]. Horváth ve ark. (2008) [279]kullandıkları özel oddball paradigmasında N1 etkisini azaltarak frekans değişimlerinin N1 bileşenini etkilerken MMN üzerine etkili olmadığını göstermişlerdir. Dipol modelleme teknikleriyle MMN kaynağının aktivasyonunun N1 kaynağınınkinden önce gerçekleştiğinin saptanması adaptasyon mekanizmasıyla açıklanamayan bir başka bulgudur [280]. Bunun yanısıra N1'den farklı olarak MMN'nin frontal kaynaklarında olduğu intrakranial kayıtlardan elde edilen kanıtlarla belirlenmiştir [281]. Sonuç olarak bu bulgular adaptasyon mekanizmasının MMN oluşumunda yer aldığını doğrulamakla birlikte, bu cevabın oluşumunu tek başına açıklayamadığına işaret etmektedir.

Tahmine dayalı kodlama

Tahmine dayalı kodlama 'predictive coding' teorisine göre algı,beyindeki uyarıya neden olan faktörle ilişkilimodele dayalı tahmin ile sensöri bilginin entegre edilmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu görüş algının her seviyede aşağıdan gelen bilgi ile yukarıdan gelen tahminlerin kıyasladığı, hiyerarşik olarak organize olan nöronal sistemlerde oluştuğunu ön görmektedir(Şekil2.4).Bu görüş kapsamında yüksek kortikal alanlarsensöri bölgelerden gelen bilgiye dayanarak dış dünyayla ilişkili soyutlamalarını sürekli olarak yeniden yapılandığı ifade edilmiştir [282]. Bu amaçla gelen bilgide herhangi bir değişim ortaya çıktığında sensöri asosiyasyon alanları gelen bilgi ile tahminleri uzlaştırmak amacıyla yukarı bölgelere uyarının özelliklerinin tahmin edilemediğine dair bir hata sinyali üretildiği öne sürülmüştür[283].Bu sinyal ardından hiyerarşik katmanlar arasında iki yönlü bağlantılarla iletişim kurularakoptimizasyon sağlanmakta ve böylece hata sinyali baskılanmaktadır[284]. Bu bağlamda MMN öğrenilen düzenlilikten sapıldığını gösteren bir hata belirleme sinyali olarak tanımlanmaktadır. Böylece aşağıdan yukarı gelen sensöri uyarı yukarıdan aşağı etki eden hafıza izi ile kıyaslanmakta, saptanan farklılık hata sinyalini oluşturarak kısa süreli plastisite mekanizmaları ile hafıza izinin yenilenmesini sağlamaktadır [266]. Bu sürecin sonunda aşağıdan yukarı iletilen

tahmin hatası sinyalinin etkisinin de optimize edilmesi gerekmektedir. Bu işlem tahmin hatası ile ilişkili nöronal grubun postsinaptik hassasiyetinin optimize edilmesini içermektedir[284]. Örneğin, standart uyarı yukarıdaki nöron gruplarında tahmin edilebildiğinde aşağıdan yukarıya olan etkinin baskılanması ve sensöri uyarıya post-sinaptik cevapların azalması gerekmektedir. Bu mekanizma adaptasyon hipotezinin geçerli olduğu süreci yansıtmaktadır. Özetle hiyerarşik çıkarım ve tahmin hatası modeli hem hafıza izinin hem de adaptasyon mekanizmasının yer aldığı birleştirici bir yaklaşım sağlamaktadır.



Şekil 2.4.Merkezi Sinir Sisteminde Hiyerarşik Yapıların ve Bağlantıların Şematik Gösterimi[285]

Elektrofizyolojik datanın altında yatan nöronal mekanizmaların anlaşılmasında kullanılan dinamik nedensel modelleme yaklaşımı kullanılarak MMN oluşumuyla ilgili adaptasyon hipotezi, sensöri hafıza hipotezi (model yeniden ayarlanma) ve bunların kombinasyonu modellenerek data ile en uyumlu sonuç veren model test edilmiştir[286]. Sonuçlar MMN oluşumunda hiyerarşik seviyeler arasındaki bağlantılardaki plastisite kadar işitsel korteksdeki lokal adaptasyonunda

etkili olduğunu ortaya konmuştur. Uyumsuzluk negativitesisadece postsinaptik hassasiyetteki değişim yani intrinsik bağlantılarla açıklanamadığı gibi yalnızca ekstrinsik bağlantılardaki değişimlede açıklanamamaktadır. Böylece tahmine dayalı kodlama 'predictive coding' modeli ile iki hipotezin birleştirildiği daha bütünleştirici ve genel bir model oluşturulmuştur.

2.8.2. Uyumsuzluk Negativitesi ve Osilasyonlar

Bilişsel işlemlerin temelini nöronal osilasyonların oluşturduğunu ve OİP'lerin nöronal osilasyonlardan oluştuğunu gösteren birçok bulguya rağmen literatürde MMN oluşumunun altında yatan osilatör aktiviteyi inceleyen az sayıda çalışma vardır. Yakın tarihte yapılan çalışmalarda teta osilatör aktivitesinin normal bireylerde MMN oluşumunda etkili olduğu saptanmıştır[287]. Bu bulgularla uyumlu olarak nadir uyarının meydana getirdiği MMN dalga formunun spektral genliğinin 3-5 Hz aralığında pik yaptığı daha önceki bir çalışmada da gösterilmiştir [288]. Ko ve ark. (2012) [289] gerçekleştirdikleri çalışmada nadir tonların 250 ms civarında teta frekansında indüklediği gösterilmiş böylece işitsel ayırım süreçlerinde teta aktivitesinin rol aldığı ortaya konmuştur.

2.8.3. Uyumsuzluk Negativitesi ve Dikkat İlişkisi

MMN ontolojik olarak OİP dalgasında gözlenebilecek en erken bilişsel bileşendir [260]. Uyumsuzluk negativitesi ile ilgili önemli özelliklerden biri kişinin dikkatinden bağımsız olarak ortaya çıkması ve uyku, koma gibi durumlarda da gözlenebilmesidir[290]. Bu olgu beynin devamlı seslerin karşılaştırmasını otomatik olarak yapabilme kapasitesi olduğuna işaret etmektedir [259]. Uyumsuzluk negativitesi dikkatten nadir olarak etkilense de bazı çalışmalarda kişinin dikkati işitsel uyarı dışında bir şeye odaklandığında MMN amplitudunun azaldığını gösterilmiştir[291][292]. Diğer yandan görsel MMN genliğinin herhangi bir görsel uyarıya dikkat odaklanmasından etkilenmediği bulunmuştur [293]. Uyumsuzluk negativitesinin ortaya çıkışında özellikle frontal lobda bulunan kaynağın irade dışı bir dikkat değişimi işlemi ile ilişkili olduğu, akustik bir değişime otomatik yönelme cevabıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir [269]. Buna ek olarak MMN'nin frontal kaynaklarının işitsel değişim belirleme sisteminin düzenlendiği irade dışı yükseltgeme yada kontrast artırma mekanizmalarıyla ilişkili olduğu önerilmiştir[271]. Uyumsuzluk negativitesi işitsel algının oluşumunu, sensöri hafıza temsillerinin yapısını ve bu süreçlerde dikkatin rolünü anlamak için önemli bir pencere oluşturmaktadır [294]. İşitsel gruplandırma ayırımı için dikkatin gerekli olmadığı gösterilmiş olmakla birlikte [295], dikkat odaklanmasındaki değişim gruplandırmanın yeniden yapılandırılması için önemli olduğu vurgulanmıştır[296]. Woldorff ve ark. (1993)[297] odaklanmış işitsel dikkatin 20 ms kadar erken işitsel işlemleri dahi modüle edebildiğini göstermişlerdir. Bu bulgular dikkate alınarak yapılan incelemelerde MMN irade dışı dikkat değişiminin mekanizmasını karakterize etmek için kullanılmıştır[269].

2.8.4. Uyumsuzluk Negativitesi ve Klinik Uygulamalar

Uyumsuzluk negativitesinin belirli bir görev becerisi ve dikkat odaklanması gerekmeksizin kişinin motivasyonundan bağımsız olarak elde edilebilmesi farklı

linik popülasyonların test edilmesinde kullanımına olanak sağlamaktadır [263]. Uyumsuzluk negativitesinin en yaygın klinik uygulaması şizofreni araştırmalarıdır. Otuzdan fazla incelemede şizofreni hastalarında MMN genliğinin hem frekans hem de süre bakımından farklı olan nadir uyarılar için azaldığı belirlenmiştir [298]. Ayrıca MMN genliği ile bilişsel bozukluk ve fonksiyonel kapasite arasında korelasyon olduğu tespit edilmiştir [299].

Şizofreni araştırmalarında MMN bileşeninin önemli bir gösterge olmasının nedeni MMN'nin NMDA reseptör sinyal yoluna bağlı olması [300] ve şizofreninin patofizyolojisinde glutamaterjik sinapsların plastisitesinin rolü olmasıdır [301]. Ayrıca şizofreni hastalarında dikkat ve performansdan etkilenmeyen basit bir paradigma uygulanması oldukça pratik bir yaklaşım sunmaktadır. Uyumsuzluk negativitesinin bir diğer önemli uygulama alanıda disleksidir. Disleksi hastalarında frekans özelliği farklı olan nadir uyarılarda MMN genliğinin azaldığı bulunmuştur [302]. Öğrenme güçlüğü olan çocuklarda MMN genliğinin işitsel yolda bilinç öncesi algı süreçleriyle ilişkili olarak azalabileceği öne sürülmüştür [303]. Bazı çalışmalar MMN'yi sensöri öğrenme mekanizmasının işleyişini anlamak için kullanmışlardır. Tekrarlı okuma araştırmaları sonucu değişen nöronal aktivite MMN bileşeni aracılığı ile belirlenerek bu değişimin miktarının kişilerin benzer heceleri ayırma becerisi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [304]. Ayrıca, davranış ölçümleri ile birlikte yapılan deneylerde bir ses dizisindeki kısa düzenliliklerin nondeklaratif (implisit), sezgisel ve deklaratif (eksplisit) bilgisinin MMN ve P3 cevapları ile karakterize edilebileceği gösterilmiştir [305].

2.8.5. Uyumsuzluk Negativitesi ve Alzheimer Hastalığı

Uyumsuzluk negativitesinin kaydedildiği kısa süreli işitsel bellekle ilgili çalışmalarda, uyarılar arasındaki sürenin (interstimulus interval, ISI) yeterince uzun seçilmesi durumunda her bir uyarıya ait hafıza izi bir sonraki uyarı gelene kadar silindiğinden MMN'nin ortadan kaybolduğu tespit edilmiştir [263]. Dolayısıyla, MMN'nin ekoik hafıza süresinin belirlenmesinde güvenilir bir belirteç olarak kullanılabilirdiği ifade edilmiştir. Bu konudaki öncül çalışmalarda genç deneklerle kıyaslandığında yaşlanmanın MMN genliğini azaltıp, latensini uzattığı saptanmıştır [306]. Pekkonen ve ark., [307] yaşlı deneklerde gerçekleştirdikleri çalışmalarda frekans türünde nadir uyarılar için MMN genliğindeki azalmanın uzun ISI değerlerinde gözlendiğini belirlemiş, böylece yaşlanmanın algı süreçlerinden ziyade sensöri hafızayı etkilediğini saptamışlardır. Benzer şekilde Alzheimer hastalarında kısa ISI değerlerinde MMN etkilenmezken, uzun ISI değerlerinde (3 s) genliğin azaldığı bulunmuş, hastalarda artan ISI ile MMN azalma oranının daha hızlı seyrettiği izlenmiştir [308]. Bu bulgular AH'nin algı süreçlerini değil sensöri hafızanın süresini etkilediğine işaret etmektedir. Diğer yandan, süre özelliği bakımından farklı nadir uyarıya cevap olarak ortaya çıkan MMN bileşeninin genliğinin küçük ISI değerleri için yaşa bağlı olarak azaldığı gözlenirken, Alzheimer hastalarında MMN genliğinin aynı yaşta kontrollemlerle karşılaştırıldığında değişmediği belirlenmiştir. Bu durum süre ayırımına ilişkin nöronal süreçlerin yaşa bağlı olarak bozulmasına karşı hastalığa bağlı olarak daha fazla hasar görmediğine işaret etmektedir. Sonuç olarak yaşlı kontroller ile Alzheimer hastaları arasındaki MMN genliğindeki fark oldukça azdır.

Bu bulgular hastalıkta ortaya çıkan patolojik değişimlerin kısa ISI değerlerinde MMN ile ilişkili nöronal devreleri fazla etkilemezken, uzun ISI değerlerindehafıza izinin kalıcılık süresini etkileyerek MMN genliğini azalttığına işaret etmektedir.

Alzheimer hastalığının patogenezisinde rol alan kolinerjik sistemin işitsel OİP'ler ve MMN üzerine etkisi tam olarak anlaşılmamıştır. Muskarinik asetilkolin reseptörlerini baskılayan kolinerjik sistem antagonisti skopolaminin sağlıklı genç bireylerde frekans değişimine cevap olarak ortaya çıkan MMN genliğini azalttığı, P50 genliğini arttırdığı ve N100 latensini uzattığı bulunmuştur. Bir diğer çalışmada, yaşlı sağlıklı deneklerde işitsel OİP'ler incelendiğinde skopolaminin P50, N100 latenslerini uzattığı, MMN ve P200 latensini değiştirmediği bulunmuştur. Bu bulgular kolinerjik sistemin işitsel işlemleri modüle ettiğini ve kolinerjik modülasyonun işitsel OİP üzerine etkilerinin yaşa bağlı olarak değiştiğini göstermektedir.Asetilkolin esteraz inhibitörlerinin ve nikotinik agonistlerin birlikte kullanılmasının Alzheimer hastalarında kolinerjik fonksiyonları arttırdığı bilinmektedir[309]. Bu ajanların MMN bileşenine etkilerinin incelendiği çalışmalarda nikotinin sağlıklı gençlerde MMN genliklerini etkilemediği[310], Alzheimer hastalarında AChE inhibitörü takrinin akut uygulamasının MMN genliklerini azalttığısaptanmıştır [311]. Akut nikotinin takrin tedavisi gören ve görmeyen Alzheimer hastaları üzerine etkisi MMN bileşenini kullanarak incelenmiş, takrin tedavisi görmeyen hastalarda nikotin uygulamasının MMN genliğini arttırdığı, takrin kullanan hastalarda ise değiştirmediği belirlenmiştir[312]. Nikotin uygulanan hastaların hepsinde MMN latensinin kıaldığı izlenmiş, nikotin uygulamasının sensöri fonksiyonları arttırdığı ifade edilmiştir. Ayrıca, bu sonuçlarkolinerjik sisteme etki eden ajanların sensöri hafıza gücüne ve akustik sensöri ayırım işlemine etkilerinin MMN bileşenini kullanarak değerlendirilebileceğine işaret etmektedir.Böylece insanlarda kaydedilen MMN'nin hastalığın erken evresindegerçekleşen sensöri değişikliklerin belirlenmesindeuygun bir araç olabileceği ileri sürülmüştür.

2.8.6. MMN ve Hayvan Deneyleri

Literatürde MMN kayıtlarının daha çok insanlarda gerçekleştirildiği, sıçanlarda yapılan çalışmaların çok az sayıda olduğu dikkati çekmektedir. Bu çalışmalardan birinde sıçanların sol hemisferdeki işitsel korteks üzerinde 5x5 mm'lik bir alan açılarak (Bregmanın 3 mm arkasında ve orta hattın 5 mm lateralinde) vida elektrotlar yerleştirilmiş ve oddball paradigması (standart uyarı ; 2000 Hz, nadir uyarı; 2500 Hz tonlar) uygulanarak 63-253 ms arasında MMN benzeri bir aktivite kaydedilmiştir[313]. Bu çalışmadaki elektrod yerleşimini esas alarak Astikainen ve ark. [314]' da farklı oddball paradigmaları uygulayarak 53-109 ms arasında MMN aktivitesi kaydetmişlerdir. Tikhonravov ve ark. [315]'nin sıçanları üzerinde yaptığı başka bir çalışmada da, kafatasında sağ işitsel korteks üzerine (Bregmanın 4.5 mm arkası ve orta hattın 3.5 mm laterali) vida elektrotlar yerleştirilmiş ve oddball paradigması (standart uyarı ; 2000 Hz, nadir uyarı; 2500 Hz tonlar) uygulanarak MMN kayıtları alınmıştır. Ayrıca bu çalışmada sıçanlara farklı dozlarda NMDA reseptör antagonisti MK-801 verilerek MMN cevapları elde edilmiş ve MK-801'in doza bağımlı olarak MMN benzeri bileşeninin oluşumunu bloke ettiği gösterilmiştir. Eriksson ve Villa [316]'nin araştırmalarında ise yapay sesli harfleri içeren uyarılar

serbest halde dolaşan Long-Evans sıçanlara oddball paradigması içinde verilerek beyin potansiyelleri kaydedilmiştir. Bu çalışmada, uyarının başlangıcından sonra 100-200 ms arasında standart ve nadir uyarılmış potansiyeller arasında anlamlı bir fark olarak MMN cevabı bulunmuştur. Yakın tarihte gerçekleştirilen birçok çalışmada farklı paradigmalar kullanılarak uyanık halde serbestçe gezen sıçanlarda MMN cevapları kaydedilmiş, sıçanlarda insanda elde edilene benzer MMN yanıtları olduğu doğrulanmıştır [317].

GEREÇ VE YÖNTEM

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik, Tıbbi Patoloji Anabilim Dallarında ve Deneysel Hayvanlar Ünitesinde gerçekleştirilen çalışmamızda 100 adet 2 aylık erkek Wistar sıçan kullanılmıştır.

3.1. Gruplandırma

Her grupta 25 hayvan olacak şekilde 4 grup oluşturulmuştur.

Grup 1: Saline uygulanan Sham grubu (S)

Grup 2: Saline ve Rosmarinik asit uygulanan Rosmarinik asit grubu (SR)

Grup 3: A β uygulanan Alzheimer hastalığı modeli grubu (AH)

Grup 4: A β ve Rosmarinik asit uygulanan tedavi grubu (AHR)

3.2. Deneysel Protokolü

18 günlük deneysel süresi boyunca, hayvanlar her kafeste 4 sıçan olacak şekilde, 12 saatlik aydınlık/karanlık siklusunda tutulmuşlardır. Bu süre içinde hayvanlar, ticari sıçan yemi ve musluk suyu ile doyana kadar beslenmiştir.

Deneysellerde;

- Amiloid β -42 peptidi (Sigma, Missouri, United States): Sıçanlarda Alzheimer modeli oluşturmak için nörotoksik ajan olarak kullanılmıştır. Amiloid β peptidi 72 saat süreyle 37 C'de inkübasyona bırakılarak fibriller yapıların oluşması için bekletilmiştir.

- Rosmarinik asit (Carbosynth, San Diego, United States): Nöronları koruyucu etki gösteren antioksidan ve kolinerjik ajan olarak kullanılmıştır.

Cerrahi İşlemler

Tüm sıçanlara serum fizyolojik içinde çözülerek hazırlanan Ketamine (100 mg/kg) ve Xylazine (5 mg/kg) intraperitoneal yolla uygulanarak anestezi oluşturulmuştur. Alzheimer modeli oluşturulan sıçanlara (AH ve AHR) A β 42 peptidi (2,2 nmol/10 μ l) intraserebroventriküler (i.c.v.) olarak uygulanmıştır. Anestezik madde verildikten sonra stereotaksik cihaza yerleştirilen sıçanların kafası cihazın kulak çubuklarıyla sabitlenmiştir. Sıçanların kafa derisi orta hattın üstü ile kesilerek açıldıktan sonra referans nokta olan bregma tespit edilmiştir. A β 42 peptidi bilateral olarak lateral ventriküle (AP: -0.8mm, ML: -1.4mm, ve DV: -4.0 mm) Hamilton mikrosiringası (26 G) kullanılarak 1 μ l/dak hızında enjekte edilmiş, enjektör

5 dakika boyunca belirlenen bölgede bırakılmıştır. Sham ve SR gruplarında bulunan sıçanlara aynı miktarda fizyolojik salin i.c.v. olarak enjekte edilmiştir. Ameliyattan sonra 3 gün süreyle sıçanlara 100000 U/gün penisilin ve analjezi için oral olarak 200 mg/kg parasetamol uygulanmıştır.

Ameliyattan itibaren 2 hafta boyunca SR ve AHR gruplarındaki sıçanlara serum fizyolojik içinde çözülerek hazırlanmış rosmarinik asit 50 mg/kg dozunda, SR ve AH gruplarına ise serum fizyolojik gavaj yoluyla uygulanmıştır. İki hafta boyunca kontrol ve deney grubunda bulunan hayvanlar her kafeste 1 hayvan olacak şekilde, 12 saatlik karanlık/aydınlık siklusunda tutulmuştur. Bu süre boyunca hayvanlar, ticari sıçan yemi ve musluk suyuyla beslenerek vücut ağırlıklarındaki haftalık değişiklikler kaydedilmiştir. Bu sürenin sonunda sıçanlara 1.2 g/kg dozunda üretan (serum fizyolojik içinde çözülerek (24 g/100 ml) intraperitoneal yolla uygulanarak anestezi oluşturulmuştur. Stereotaksik cihaza yerleştirilen sıçanların kafatasına dışı turu ile delik açılarak vida elektrotlar duranın yüzeyine tutturulmuştur. Kayıt elektrotları bilateral olarak işitsel korteks (AP:-4,5, MLsağ: -3.5, MLsol:+3.5) ve frontal korteks (AP:+5, MLsağ: -2, MLsol:+2) bölgelerine, referans elektrot oksipital kemiğe yerleştirilmiştir. Elektrotlar yerleştirildikten sonra sıçan stereotaksik cihazdan çıkarılmış ve elektrofizyolojik kayıtları alınmıştır.

Özetle;

i) S grubuna lateral ventriküllere bilateral olarak toplam 10µl salin uygulanmıştır.

ii) SR grubuna lateral ventriküllere bilateral toplam 10µl salin uygulanmıştır. Ameliyat sonrası bir haftalık iyileşme döneminden sonra 2 hafta boyunca gavaj yoluyla hergün 50 mg/kg rosmarinik asit verilmiştir. Rosmarinik asitin 0,05 g'ı 1 ml serum fizyolojik içinde çözülmüştür.

iii) AH grubuna lateral ventriküllere bilateral olarak toplam 2,2 nmol/10µl Aβ42 uygulanmıştır.

iv) AHR grubuna lateral ventriküllere bilateral olarak toplam 2,2 nmol/10µl Aβ42 uygulanmıştır. Ameliyat sonrası bir haftalık iyileşme döneminden sonra 2 hafta boyunca gavaj yoluyla hergün 50 mg/kg rosmarinik asit verilmiştir. Rosmarinik asitin 0,05 g'ı 1 ml serum fizyolojik içinde çözülmüştür.

3.3. İşitsel Uyarılma Potansiyellerinin Kaydedilmesi

İşitsel Oddball Paradigması için standart ve nadir olmak üzere iki tip işitsel uyarı kullanılmıştır. Paradigma ardı ardına verilen standart ses uyarılarına içersine rasgele serpiştirilen nadir uyarılarına içerecek şekilde düzenlenmiştir. Uyarılar 50 ms süreli, 85 dB şiddetinde ve frekans değerleri 2000 Hz ve 2500 Hz olacak şekilde ayarlanmıştır. Uyarı paradigması standart ton 2000 Hz, nadir ton 2500 Hz olacak şekilde uygulanmıştır. Uyarılar arası süresi (ISI) 375 ve 600 ms olacak şekilde iki farklı ses dizisi oluşturulmuş, her bir dizideki 1000 işitsel uyarı 900 standart uyarı, 100

aykırı uyarı (%10 oranında) olacak şekilde ayarlanmıştır. Uyarılar sıçanın kafasına 20 cm mesafedeki hoparlörler aracılığıyla verilmiştir.

Sıçanlardan EEG sinyali sağ frontal (Fsağ), sol frontal (Fsol), sağ temporal (Tsağ) ve sol temporal (Tsol) bölgelerden sürekli olarak kaydedilmiştir (Brainamp EEG/EP Amplifier, Brain Products, Munich, Germany). EEG kayıtları sırasında 0.1–1000 Hz band geçiren filtre ve 50 Hz Notch filtre uygulanmış ve potansiyeller 1000 Hz örnekleme hızında sayısallaştırılmıştır (Brainvision Recorder, Brain Products, Munich, Germany).

3.4. Olaya İlişkin Potansiyellerin Analizi

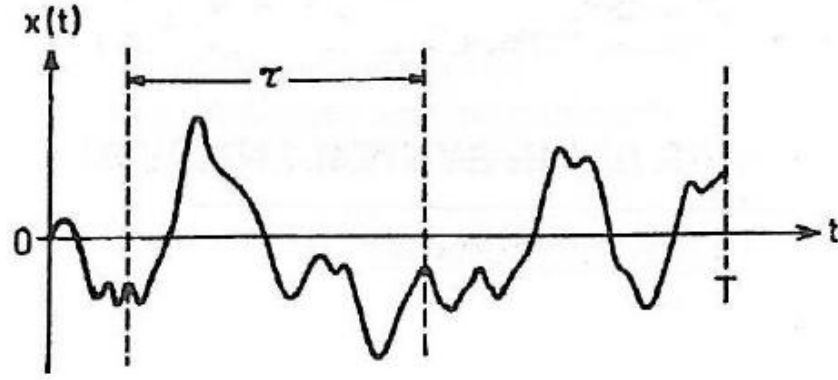
Olaya ilişkin potansiyeller bilgisayara kaydedildikten sonra potansiyel kayıtları uyarı öncesi 100 ms ve uyarı sonrası 375 ve 600ms'lik süpürümlere bölünmüş ve çevrim-dışı tekniği ile artefaktlı süpürümler (epoch) kayıttan temizlenmiştir. Artefakt temizleme işlemi takiben, her sıçan için standart ve nadir uyarılarından sonra zamana bağlı olarak ortaya çıkan ortalama OİP cevapları elde edilmiştir. 100 ms'lik prestimulus zaman aralığı kullanılarak baseline düzeltilmesi yapılmıştır. Elde edilen OİP'ler P1: 20-50ms, N1: 40-80 ms, P2: 70-145 ms, N2: 155-250 ms olacak şekilde zaman pencerelerinde incelenmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında dört temel bileşen olan P1, N1, P2 ve N2 cevaplarının tepeden-tepeye genlikleri ve latens değerleri belirlenmiştir.

Uyumsuzluk negativitesi bileşeni OİP eğrileri ile aykırı tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama OİP eğrisinden standart tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama OİP eğrisi çıkarılarak elde edilen fark dalgaları kullanılarak değerlendirilmiştir. Uyumsuzluk negativitesi bileşeninin analizi için nadir ve standart uyarı cevaplarının tepe değerlerinin görsel olarak incelenmesi neticesinde 50-120 ms ve 120-180 ms olmak üzere iki zaman penceresi belirlenmiştir. Uyumsuzluk negativitesi cevabı OİP eğrilerinde nadir tona bağlı olarak ortaya çıkan cevapların standart tona bağlı olarak ortaya çıkan cevaplardan istatistiksel olarak farklı olduğu bölgeler olarak tanımlanmıştır. İstatistiksel analizler neticesinde OİP cevaplarında anlamlı fark tespit edilen zaman pencerelerinde fark eğrilerindeki maksimum sapma kullanılarak MMN cevabı ölçülmüştür.

3.4.1. Olaya İlişkin Potansiyellerin Matematiksel Analizleri

Güç Spektrumu analizi:

Çalışmamızda elde edilen zaman serilerini incelemek amacıyla frekans analizinde kullanılan güç spektral yoğunluk fonksiyonu (güç spektrumu) yöntemi uygulanmıştır. Güç spektral yoğunluk fonksiyonu otokorelasyon fonksiyonu kullanılarak elde edilir. Otokorelasyon fonksiyonu, bir verinin, örneğin $x(t)$, t ve $t+\tau$ zamanındaki (τ =gecikme zamanı) değerlerinin birbirleri ile çarpımının tüm T zamanına bölünerek ortalama alınması ile hesaplanmaktadır.



$$R_{xx}(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T x(t)x(t+\tau)dt,$$

$$S_{xx}(f) = 2 \int_{-\infty}^{\infty} R_{xx}(\tau) \exp(-i2\pi f\tau) d\tau$$

Şekil 3. 1. $x(t)$ sinyalinin T zamandaki örnek görünümü. R_{xx} : Otokorelasyon fonksiyonunun matematiksel ifadesi, S_{xx} : Güç spektral yoğunluk fonksiyonunun matematiksel ifadesi.

Güç spektral yoğunluk fonksiyonu ise otokorelasyon fonksiyonunun Fourier Dönüşümü (FD) ile elde edilir. Denklemde görülen t , zamanı; f , frekansı; R_{xx} , zaman bölgesindeki sinyali, S_{xx} ise frekans bölgesindeki sinyali göstermektedir. Beyin analiz programı (Brainvision Analyzer 2.0 EEG, Brain Products, Munich, Germany) yardımıyla artefakt temizleme işleminden sonra geriye kalan süpürümlerin ortalaması alınmış ve bu ortalama Hızlı Fourier Dönüşümüne (HFD) uğratılmıştır. Elde edilen güç spektrumundan alfa, delta ve teta frekans bandlarının güç değerleri belirlenmiştir.

Koherans analizi:

Koherans fonksiyonu, $x(t)$ ve $y(t)$ gibi iki sinyalin arasındaki ilişkiyi ölçen bir fonksiyondur ve matematiksel olarak aşağıdaki gibi ifade edilir.

$$COH^2_{xy}(f) = \frac{|S_{xy}(f)|^2}{S_{xx}(f) S_{yy}(f)}$$

$S_{xy}(f)$, $x(t)$ ve $y(t)$ arasındaki çapraz spektral yoğunluk fonksiyonunu, $S_{xx}(f)$ ve $S_{yy}(f)$ ise sırası ile $x(t)$ ve $y(t)$ 'nin güç spektral yoğunluk fonksiyonlarını ifade etmektedir. Çapraz korelasyon veya çapraz güç spektrumu olarak da adlandırılan çapraz spektral yoğunluk fonksiyonu, $x(t)$ 'nin t zamanındaki ve $y(t)$ 'nin $t+\tau$ zamanındaki değerlerinin birbirleri ile çarpımının tüm T zamanına bölünerek ortalama alınması ile elde edilir. Koherans değeri her zaman 0 ile 1 arasında bir değer alır ve bu değer $x(t)$ ve $y(t)$ sinyalleri ilişkili sinyaller ise 1'e yakın veya 1, değil ise 0'a yakın veya 0 olur. Çalışmamızda farklı elektrot bölgeleri arasındaki koherans değerleri beyin analiz programı (Brainvision Analyzer 2.0 EEG, Brain Products, Munich, Germany) yardımıyla hesaplanmıştır.

3.5. Biyokimyasal Yöntemler

İşitsel potansiyel kayıtlarının alınmasından hemen sonra ürethan anestezisi (i.p. %20'lik, 5ml/kg) altında kardiyak kanül yerleştirilmiştir. Kanül aracılığıyla verilen heparinli izotonik ile beyin dokuları perfüze edilerek kandan arındırılmıştır. Beyin dokuları sıvı nitrojen içerisinde dondurulmuş ve ardından 1 mM EDTA içeren 50 mM soğuk K_2HPO_4 (pH = 7) tamponunda, buz üzerinde homojenize edilerek (PRO 200 Homogenizater, PRO Scientific Inc., Connecticut, USA), biyokimyasal parametrelerin ölçümleri için $-80^\circ C$ ' de saklanmıştır. Histolojik analizler için Somogy-Tachaci fiksatifile (0.1 M fosfat tamponunda 4% paraformaldehyde, 0.1% glutaraldehyde, pH 7.3) perfüzyon yapıldıktan sonra beyin dokuları çıkartılmıştır.

3.5.1. Doku Tiobarbütirik Asit Reaktif Ürünlerinin Ölçümleri

Beyin dokularında TBARS ölçümleri, Wasowicz ve arkadaşlarının yöntemine göre yapılmıştır [318]. Bu metodun temel prensibi, lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA'nın, TBA ile reaksiyona girmesi ve oluşan bileşiğin bütanol fazına ekstrakte edilerek 525 nm eksitasyon ve 547 nm emisyon dalga boyunda spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanır.

Kullanılan Malzemeler:

1. 29 mM TBA (TBA, Sigma-T5500): 0.418 g, 50 ml distile su ve 50 ml glacial asetik asit(Acetic acid glacial extra pure, Merck-56) içinde çözülmüştür.
2. 5 M Hydrochloric acid (HCl, Merck-314)
3. n-bütanol (n-Bütanol, Merck-329)
4. Standart solüsyonu: Tetraetoksipropan (1,1,3,3-tetraethoxy-propane, Sigma-T9889) stok solüsyonundan distile su ile sulandırılarak hazırlanmıştır.

Perfüze edilerek çıkarılan ve $-80^\circ C$ ' de saklanan beyin dokularının bir hemisferi randomize olarak TBARS ölçümleri için ayrılmış ve ayrılan beyin dokuları 1 mM EDTA içeren 50 mM soğuk K_2HPO_4 (pH= 7) tamponunda buz üzerinde

(Biofuge15R, Heroeus, Germany) homojenize edilmiştir. Süpernatantlar homojenatların 4 °C'de, 10000 x g'de, 15 dakika, santrifüj edilmesiyle elde edilmiştir.

Bir ml distile su içeren tüpe 50 ml doku süpernatantı konulduktan sonra, 1 ml TBA (29 mmol/L) eklenmiştir. Tüp iyice karıştırıldıktan sonra, 1 saat süreyle 95- 100 derece arasında kaynatılmıştır. Numuneler soğutulduktan sonra 25 ml HCl (5 mol/L) ve 3.5 ml n-bütanol eklenerek vortekslenmiş ve bu işlemi takiben 3000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek, bütanol fazı ayrılmıştır. Bütanol ekstraktının floresansı, eksitasyon dalga boyu 525 nm, emisyon dalga boyu 547 nm olarak spektrofotometrede okunmuştur.

TBARS miktarının hesaplanması:1,1,3,3,-tetra-etoksi-propan standardı numune gibi çalışılarak standart grafiği oluşturulmuştur. Dokuların TBARS miktarı bu grafik yardımıyla hesaplandıktan sonra µmol/g protein olarak saptanmıştır.

3.5.2. Protein Tayini

Beyin dokularında protein tayini modifiye Bradford yöntemine dayanan bir kit ile yapılmıştır [319].

Reaktifler:

1. Standart solüsyon: 2µg/µl bovin serum albümin (Albümin Bovine, Sigma, A- 8022)
2. Coomassie Plus Protein Assay Reagent (CPPA, Pierce-1856210) Reaktifi

İşlemler: 1µl doku süpernatantı 999µl distile su ile sulandırıldıktan (1:1000) sonra üzerine 1 ml CPPA reaktifi eklenerek absorbans 595 nm'de spektrofotometrik olarak okunmuştur. Standart çalışması ise numune yerine artan konsantrasyonlarda 1:1000 sulandırmaya sahip BSA kullanılarak yapılmıştır.

Protein Miktarının Hesaplanması: Dokulardaki protein miktarları standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır.

3.5.3. 4-Hidroksi 2- Nonenal Seviyesinin Tayini

Beyin dokularında 4-HNE eklentilerinin tayini dokuya uyumlu ticari bir kit (Cat. #STA-838. OxiSelect™ HNE Adduct ELISA Kit) kullanılarak yapılmıştır.

Prensip: Protein örneklerindeki 4-HNE eklentilerinin miktarı kit yardımıyla ölçülen absorbans değerlerinin bilinen 4-HNE-BSA standart eğrisi ile karşılaştırılması prensibine dayanarak belirlenmiştir. Bu amaçla BSA standart ya da protein örnekleri (10 µg/mL) kuyucuklara uygulanarak 2 saat süreyle 37 °C'de bekletilmiştir. Daha sonra 4-HNE protein eklentilerinin tespiti için kuyucuklar sırasıyla anti-HNE antikoru ve HRP konjuge sekonder antikoru ile muamele edilmiştir. EIA kiti ile yapılan ölçüm sonrasında örneklerdeki 4-HNE miktarı standart eğri kullanılarak µg/ml doku olarak hesaplanmıştır.

Reaktifler:

1. 96 kuyucuklu protein bağlayıcı plate
2. Anti-HNE antikor (1000x)
3. Sekonder Antikor, HRP konjuge (1000x)
4. Assay diluent
5. 10x yıkama tamponu
6. Substrat solüsyonu
7. Stop solüsyonu
8. Redükte BSA solüsyonu

Reaktiflerin hazırlanması:

- **1X yıkama tamponu:** 10X konsantre yıkama tamponu, 1X deionize su ile dilüe edilerek hazırlanmıştır.
- **Anti-HNE ve Sekonder antikor:** Kullanmadan hemen önce assay dilüent kullanılarak antikorlar 1:1000 oranında dilüe edilmiştir.

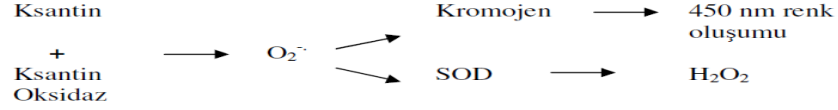
İşlemler:Öncelikle bilinmeyen protein örnekleri 10 µg/mL olacak şekilde 1X PBS' de dilüe edilip ardından 10 µg/mL protein örnekleri ve HNE-BSA standartlarından 100 µl kuyucuklara eklenip gece boyunca +4 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Her bir kuyucuk 250 µl 1 X PBS ile iki kez yıkanmıştır. Son yıkamanın ardından kuyucuklar boşaltılıp, fazla kalan yıkama solüsyonu mikrowell strip yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucuğa 200 µl Assay dilüent eklenip oda sıcaklığında orbital karıştırıcı üzerinde 1-2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklar 250 µl 1X yıkama tamponu ile üç kez yıkanmıştır. Son yıkamanın ardından kuyucuklar boşaltılıp fazla kalan yıkama tamponu uzaklaştırılmıştır. Plate üzerinde kullanılmış olan bütün kuyucuklara 100 µl dilüe anti-HNE antikoru eklenip oda sıcaklığında orbital karıştırıcı üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Bir önceki yıkama işlemine göre tekrar üç defa yıkanmıştır. Kullanılan tüm kuyucuklara dilüe sekonder antikordan (HRP-konjuge) 100 µl eklenip, orbital karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklar 250 µl 1X yıkama tamponu ile beş kez yıkanmıştır. Substrat solüsyonu oda sıcaklığına gelinceye kadar ısıtılıp boş kuyucuklar dâhil her bir kuyucuğa bu solüsyondan 100 µl eklenip oda sıcaklığında orbital karıştırıcı üzerinde 2 ile 30 dakika arasında inkübe edilmiştir. Son olarak enzim reaksiyonunu durdurmak için her bir kuyucuğa stop solüsyonundan 100 µl eklenerek, her bir kuyucuğun 450 nm'deki absorbansı zaman kaybı olmadan okunmuştur (Zamanla renk solması olacağından işlemin çok hızlı bir şekilde yapılması gerekmektedir).

3.5.5. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivite Tayini

Beyin dokularında SOD enzim aktivite tayini, ticari bir kit (Superoxide Dismutase Enzyme Assay Kit, Cayman-706002) ile yapılmıştır.

Prensip: Tayin kompetatif inhibisyon yöntemine dayanmaktadır. Bu yöntemde reaksiyon ortamında sürekli olarak O_2^- oluşturan XO-hipoksantin sistemi mevcuttur.

Bu sistemin açığa çıkardığı $O_2^{\cdot-}$ reaksiyon ortamına ilave edilen kromojeni indirger ve 450nm'de ölçülebilen renk oluşumuna neden olur. Dokularda ne kadar SOD enzimi varsa, renk oluşumu o kadar az olacaktır.



Reaktifler:

1. 10X Ölçüm Tampon
2. 10X Örnek Tamponu
3. Radikal Dedektör
4. SOD Standardı
5. Ksantin Oksidaz

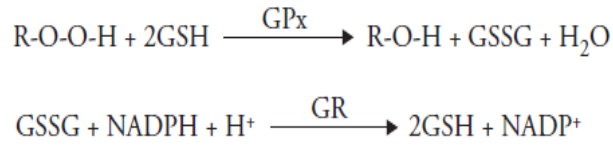
İşlemler: 3 ml ölçüm tamponu 27 ml distile su ile sulandırılarak 1X ölçüm tamponu, 2 ml örnek tamponu ise 18 ml distile su ile sulandırılarak 1X örnek tamponu hazırlanmıştır. Folyo kağıdı ile kaplanmış bir tüp içerisinde 50µl radikal detektör, 19,95 ml dilüe ölçüm tamponu ile sulandırılmıştır. Stok solüsyonu için 1,98 ml örnek tamponuna 20 µl SOD standardı eklenmiş ve yedi adet temiz tüp A'dan G' ye işaretlenerek farklı konsantrasyonlarda SOD standardı oluşturulmuştur. 50 µl ksantin oksidaz solüsyonu, 1,95 ml dilüe örnek tamponu ile sulandırılmıştır. Her standart ve her numune çift çalışılmıştır. 96'lı plate kuyucuklarına öncelikle 200 µl dilüe radikal detektör konulduktan sonra her bir standart için SOD standartlarından 10 µl , her bir örnek için ise 10 µl süpernatant ilave edilmiştir. Hazırlanmış olan dilüe ksantin oksidaz solüsyonundan her bir kuyucuğa 20'ser µl eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Plate birkaç saniye yavaşça çalkalandıktan sonra kapağı kapatılarak bir karıştırıcı üzerinde oda ısısında 20 dakikalık inkübasyona bırakılmıştır. Absorbanslar 450 nm'de bir plate okuyucu ile okunmuştur.

SOD enzim aktivitesinin hesaplanması: Dokulardaki SOD enzim aktivitesi oluşturulan SOD standart eğrisiyle hesaplanmıştır. Maksimum renk oluşumunu %50 inhibe eden SOD miktarı bir ünite SOD aktivitesi olarak kabul edilmiştir.

3.5.6. Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivite Tayini

Beyin dokularında GSH-Px enzim aktivite tayini, ticari bir kit (Glutathione Peroxidase Assay Kit, Cayman-703102) ile yapılmıştır.

Prensip: GSH-Px, hidrojen peroksit veya organik hidroperoksitlerin suya veya alkollere indirgenmesini sağlayan reaksiyonları katalizleyen bir enzim ailesinin genel adıdır. Elektron donorü olarak indirgenmiş glutatyonu kullanır.



NADPH'in NADP⁺ 'ye oksidasyonu, 340 nm dalga boyunda meydana gelen absorbansda azalma ile sonuçlanır. GSH-Px aktivitesinin sınırlı olduğu koşullarda, 340 nm dalga boyundaki absorbansda meydana gelen azalma örnekteki GSH-Px aktivitesi ile doğru orantılıdır. Bu nedenle NADP⁺'nin enzim aktivitesiyle ortamdan uzaklaştırılması sonucu 340 nm'de absorbansın azalması ölçülmüştür.

Reaktifler:

1. GSH-Px Ölçüm Tamponu (10x)
2. GSH-Px Örnek Tamponu (10x)
3. GSH-Px (Kontrol)
4. GSH-Px Co-Substrat Karışımı
5. GSH-Px Kümen Hidroperoksit

İşlemler: 3 ml ölçüm tamponu 27 ml distile su ile sulandırılarak 1X ölçüm tamponu, 2 ml örnek tamponu ise 18 ml distile su ile sulandırılarak 1X örnek tamponu hazırlanmıştır. 10 µl enzim, 490 µl dilüe örnek tamponu ile sulandırılarak buz üstünde tutulmuştur (dilüe enzim buz üzerinde 4 saat stabil kalabilir). Reaktifler hazırlandıktan sonra arka plan veya non-enzimatik aktiviteyi ölçmek için plate üzerinde üç kuyucuğa 120 µl ölçüm tamponu, 50 µl co-substrat karışım, pozitif kontrol için ise üç kuyucuğa 100 µl ölçüm tamponu, 50 µl co-substrat karışımı ve 20 µl dilüe GSH-Px eklenmiştir. Örnek kuyucuklarına ise total miktar aynı olmak üzere 100 µl ölçüm tamponu, 50 µl co-substrat karışımı ve 20 µl örnek eklenmiştir. Tekrarlanabilir sonuçlar alabilmek için kuyucuklara eklenen GSH-Px miktarı, dakikadaki absorbans azalması 0,02 ve 0,135 arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra kuyucukların tamamına Kümen Hidroperksit hızlı bir şekilde eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Her bir dakikada 340 nm'deki absorbanslar plate reader yardımıyla okunmuştur.

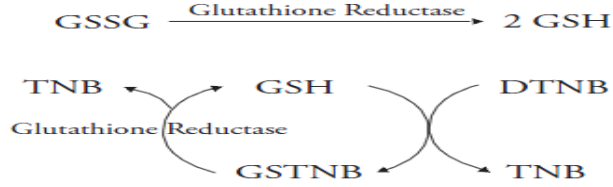
GSH-Pxenzim aktivitesinin hesaplanması: GSH-Px enzim aktivitesi aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{GSH Px aktivitesi} = \left(\frac{\frac{\Delta A_{340}}{dk}}{0,00373 \mu M^{-1}} \right) \times \left(\frac{0,19 ml}{0,02 ml} \right) \times \text{örnek dilüsyonu} = \text{nmol/dk/ml}$$

3.6.7. Glutatyon Tayini

GSH ölçümleri ticari bir kit (Cat. #703002. Cayman Chemical Ann Arbor, MI) ile yapılmıştır.

Prensip:GSH'nın sülfidril grubu, 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyona girer ve ürün olarak sarı renkli 5-thio-2-nitrobenzoik asit (TNB) meydana çıkar. Oluşan TNB miktarı GSH oluşum miktarı ile orantılıdır. Bu nedenle 405 nm'de TNB miktarını tayin etmek GSH miktarının tam olarak ölçülmesini sağlar.



Reaktifler:

1. Metafosforik asit tamponu (MES, 2X)
2. GSSG standardı
3. Kofaktör karışımı
4. Enzim karışımı
5. DTNB
6. Trietanolamin reaktifi (TEAM, 4 M)
7. 2-Vinil-pridin (1 M)

İşlemler:150 µl doku süpernatantı içerisine 150 µl metafosforik asit (MPA) reaktifi ilave edilerek oda ısısında 5 dakika inkübe edilmiştir. Bu işlemi takiben 5000g'de 5 dakika santrifüj yapılarak her bir dokudan elde edilen süpernatantlar GSH ölçümleri için iki ayrı ependorf tüpe 100 er µl olacak şekilde aktarılmıştır. GSH ölçümü için 100 µl süpernatant üzerine 5 µl trietanolamine (TEAM) reaktifi ilave edilerek karıştırılmıştır. Karışımdan alınan 50 µl numune üzerine, MES (2-N-morfolin etansülfonik asit), kofaktör karışımı (NADP ve glukoz-6-fosfatın liyofilize formunu içerir), enzim karışımı (glutatyon redüktaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz içerir), DTNB (5,5'- ditiobis-2- nitrobenzoik asit) ve distile su içeren 150 µl ölçüm kokteyli ilave edilerek karanlıkta inkübe edilmiştir. 25 dakikalık inkübasyonu takiben 405 nm'de absorban değerleri okunmuştur.

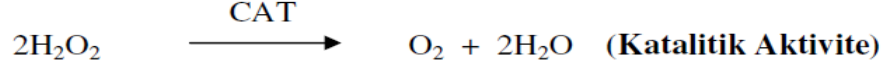
GSH Miktarlarının Hesaplanması:GSSG standardı aynen numune gibi çalışılarak standart grafiği oluşturulmuştur. Dokulardaki GSH bu grafik yardımıyla hesaplandıktan sonra µmol/mg protein olarak ifade edilmiştir.

3.5.8. Katalaz Enzim Aktivite Tayini

Beyin dokularında katalaz (CAT) enzim aktivite tayini ticari florometrik kit (Amplex®Red A22180) aracılığı ile yapılmıştır.

Prensip: Katalaz H₂O₂ ile reaksiyonu sonucu O₂'e ve su üretilir. Daha sonra ortamda kalan H₂O₂Amplex Red bileşiği ile reaksiyona girerek horseradish peroksidaz (HRP) enzimi varlığında resorufin bileşini oluşturmaktadır. Oluşan bu resorufin bileşiğinin

530-560 nm egzitasyon 590 nm emisyon dalga boylarında floresansı ölçülerek CAT aktivitesi tayin edilmiştir.



Reaktifler:

1. Amplex Red reaktifi
2. Dimetil sülfoksit (DMSO)
3. Horseradish peroksidaz enzimi (HRP)
4. Hidrojen peroksit
5. 5X reaksiyon tamponu (250 mM Tris-HCl)
6. Katalaz enzimi

İşlemler: 1g doku/3 mL olacak şekilde fosfat tamponu içine konulan beyin dokusu buz içinde homojenize edilmiştir (Pro 200, Pro Scientific Inc.Oxford CT, USA.). Homojenatlar 10.000 g'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Katalazın bilinen aktivitesine ait 590 nm'deki floresans değerleri kullanılarak standart grafikleri elde edilmiştir. Örnekler ile dilüsyon çalışması yapılarak, numunelerin standartlara ait floresans grafiğinin sınırları içinde olduğu doğrulanmıştır. Katalaz tayini için örnekler plate'e alınarak 40 µM H₂O₂ reaksiyon solüsyonu ile oda ısısında 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 0.4 U/ml HRP içeren 100 µM'lık Amplex Red reaksiyon solüsyonu ile 37 °C'lik etüvde karanlıkta 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda örnekler 590 nm emisyon dalga boyunda spektrofotometrik olarak okunmuştur.

CAT Enzim Aktivitesinin Hesaplanması: Dokulardaki CAT enzim aktivitesi oluşturulan standart eğri ile hesaplanmıştır.

3.5.9. Asetilkolin/Asetilkolinesteraz Tayini

Toplam ACh miktarı ve AChE aktivitesi ticari florometrik kit (Amplex®Red A12217) aracılığı ile ölçülmüştür.

Prensip:Asetilkolinin parçalanmasıyla oluşan kolinin oksidasyonu ile oluşan betain ve H₂O₂ Amplex Red bileşiği ile reaksiyona girerek horseradish peroksidaz (HRP) enzimi varlığında resorufin bileşini oluşturmaktadır. Oluşan bu resorufin bileşiğinin 530-560 nm egzitasyon 590 nm emisyon dalga boylarında floresansı ölçülerek ACh miktarı tayin edilmiştir.

Reaktifler ve kimyasallar:

1. Amplex Red reaktifi
2. Dimetil sülfoksit (DMSO)
3. Horseradish peroksidaz enzimi

4. Hidrojen peroksit
5. 5X reaksiyon tamponu (250 mM Tris-HCl)
6. *Alcaligenes sp.* kökenli kolin oksidaz enzimi
7. Asetilkolin klorid
8. *Electric eel* kaynaklı Asetilkolinesteraz enzimi

Yöntem: 1g doku/3 mL olacak şekilde 20 mM sodyum fosfat tamponu içine konulan beyin dokusu buz içinde homojenize edilmiştir (Pro 200, Pro Scientific Inc. Oxford CT, USA.). Homojenatlar 12.000 g'de 30 dk santrifüj edilmiştir. ACh ve AChE' nin bilinen konsantrasyon ve aktivitesine ait 590 nm'deki floresans değerleri kullanılarak standart grafikleri elde edilmiştir. Örnekler ile dilüsyon çalışması yapılarak, numunelerin standartlara ait floresans grafiğinin sınırları içinde olduğu doğrulanmıştır. Asetilkolin tayini için örnekler plate'e alınarak 2 U/ml HRP, 0.2 U/ml kolin oksidaz ve 1 U/ml AChE içeren 400 µM'lık Amplex Red reaksiyon solüsyonu ile oda ısısında karanlıkta 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda örnekler 590 nm'de spektrofotometrik olarak okunmuştur. Asetilkolinesteraz tayini için örnekler plate'e alınarak 2 U/ml HRP, 0.2 U/ml kolin oksidaz ve 100 µM ACh içeren 400 µM'lık Amplex Red reaksiyon solüsyonu ile oda ısısında karanlıkta 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Numunelerin ACh içeriği ve AChE aktivitesi standart grafiğine göre hesaplanmıştır. Sonuçlar protein değerleri ile normalize edilerek ACh miktarı µmol/mg protein AChE aktivitesi mU/mg protein olarak ifade edilmiştir.

3.6. İmmünohistokimyasal Analizler

Beyin dokusundan alınan 4 mikron kalınlığındaki parafin kesitler, Poly-L-Lizin kaplı lamlar üzerine alınarak 56 derecelik etüvde bekletilmiştir. İmmünokimyasal boyamalar Ventana 'BenchMark ULTRA fully automated staining' cihazı yardımıyla otomatik immünohistokimyasal boyama protokolüne göre yapılmıştır. 75 derecede 4 dakika inkübe edilen kesitler deparafinasyon için üç kere EZPrep solüsyonundan geçirilmiş ve yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Daha sonra tekrar 4 dakika süreyle 75 derecede inkübe edilen kesitler yıkanarak deparafinize edilmiştir. Kesitler antijenik maskenin giderilmesi için Cell Conditioner No. 2 ve Coverslip solüsyonları ile beşer kere 95 derecede 4 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bunu takiben 8 dakika süreyle soğumaya bırakılan kesitler reaksiyon tamponu ile yıkanmıştır. UV INHIBITOR uygulanan kesit 37 derecede 4 dakika bekletilmiş ve tekrar reaksiyon tamponu ile yıkanmıştır. Kesitler Aβ, GFAP, sinaptofizin ya da AChE primer antikolarıyla 32 dakika 37 derecede inkübe edilmişlerdir. Kontrol kesitlerine primer antikor yerine normal fare immünoglobulinleri uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda reaksiyon tamponu ile yıkanan kesitler 37 derecede 4 dakika bekletilmiş ve tekrar yıkanmıştır. Kesitler AMPLIFIER A ve coverslip uygulanarak sekiz dakika inkübe edilmişlerdir. Tekrar reaksiyon tamponu ile yıkama yapıldıktan sonra AMPLIFIER B uygulanıp sekiz dakika bekletildikten sonra tekrar yıkama yapılmıştır. Kesitler sinyali geliştirmek için UV HRP UNIV MULT ile sekiz dakika süreyle muamele edilmiş ve üç kere reaksiyon tamponu ile yıkanmışlardır. Sinyali geliştirmek için kesitler UV diamino benzidin (DAB), UV DAB H2O2 ve LCS uygulanarak sekiz dakika bekletilmiştir. Bu işlemin ardından yıkanan kesitler sekiz dakika boyunda UV COPPER

ile muamele edilmiştir. Yıkanan kesitler hematoksilen ile dört dakika zıt boyama yapıldıktan sonra BLUING REAGENT ile muamele edilmiştir. Tekrar seri yıkama protokolü uygulanan kesitler ardından kapatma solüsyonu ile kapatılmışlardır. Bütün gruplar aynı muamelelerden geçirilerek boyanmışlardır.

İmmünohistokimya için ayrılan beyinlerden buz üzerinde izole edilen sıçan beyin dokuları derhal % 10'luk formalin (Formalin, ADR-Advanced Diagnostic Research 12010742500) alındı ve formalin içinde bir gece fikse edilmiştir. Daha sonra akan suda 3 saat boyunca yıkandı ve %70, %80, %90 ve %100'lük artan alkol serilerinden geçirerek dehidratasyon sağlanmıştır. Ksilol (Xylol, Merck-K33776585 441) ile şeffaflaştırma işlemi uygulandıktan sonra dokular parafine gömülmüştür. Parafin bloklardan kesit aleti (Leica RM2125RT) ile alınan 5 mikron kalınlığında kesitler Poly-L-Lizin kaplı lamlara (Polysine; Menzel GmbH&Co KG, Brounschweig, Germany) alındıktan sonra, hematoksilen-eozin ve immünohistokimyasal boyama teknikleri uygulanmıştır.

3.7. Elektron mikroskobu incelemesi

Herhangi bir sıçan rasgele seçilerek hipokampus dokusundan alınan parçalar glutaraldehid ile fikse edilmiştir. Daha sonra dokular osmium tetra oksit içerisinde iki saat bekletilmiştir. Artan alkol serilerinden geçirilen dokular araldit içerisinde gömülmüştür. Temporal korteks ve medial septum bölgesinde ultra yapısal analizler yapılmıştır. Nükleus ve mitokondrideki morfolojik değişimler, lipofüsin birikimi ve sinaptik dejenerasyon incelenmiştir. Bölgeler 6000 x büyültme gücü ile analiz edilmiştir.

3.8. Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistiksel değerlendirme SPSS paket programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Biyokimyasal veriler Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve onu takiben Tukey Post Hoc Testi ile incelenmiştir. Olaya ilişkin potansiyel verileri deney gruplar (S, SR, AH, AHR) olgular arası faktör (between subjects), ISI değeri (375, 600) ve uyarı türü (standart, nadir) de aynı olgu grubu içi (within subjects) faktörler olmak üzere olarak Karışık Faktörlü ANOVA (Mixed-Design ANOVA) ve yinelenen ölçümler (repeated measures) ANOVA testleriyle değerlendirilmiştir. İmmünohistokimyasal sonuçlar Kruskal Wallis Analizi ve onu takiben Mann-Whitney U Testi ile analiz edilmiştir. $P < 0,05$ 'i sağlayan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

4.1. Genel Görünüm

Deney süresince hayvanların genel görünüm ve davranışlarında herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.

4.2. Ağırlık Değişimi

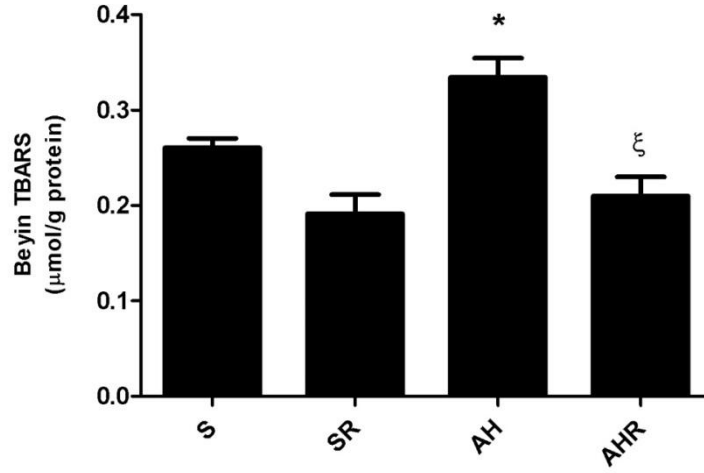
Deney süresi boyunca hayvanların ağırlık takipleri ve yem tüketimleri haftalık olarak yapılmıştır. Tüm deney gruplarında ağırlık artışları gözlenmiştir, ancak ağırlık değişimlerinin ve yem tüketimlerinin gruplar arasında anlamlı bir fark göstermediği saptanmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4. 1. Sham ve deney grubu hayvanlarının ağırlık değişimleri.

Gruplar	1.hafta (g)	2. hafta (g)	yem tüketimi (g/gün/100 gr)
S	288.3 ± 8.3	295.0 ± 9.3	12.5 ± 2.0
SR	290.2 ± 9.2	294.5 ± 8.5	11.0 ± 2.3
AH	286.0 ± 8.9	291.5 ± 10.2	11.0 ± 2.1
AHR	288.2 ± 13.2	293. ± 11.3	13.2± 1.4

4.3. Doku Tiobarbitürik Asit Reaktif Ürünleri Sonuçları

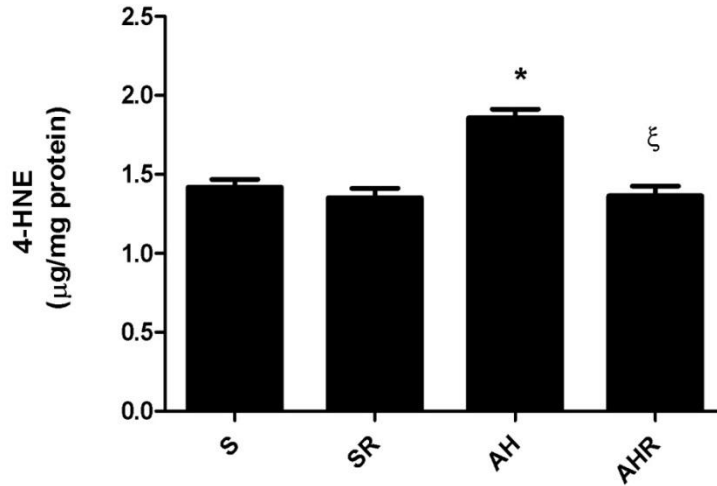
Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin TBARS sonuçları Şekil 4.1 ve Tablo 4.2' de verilmiştir. Tüm grupların TBARS değerleri tek yönlü ANOVA testi ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($F(3,35)=12.45$, $p < 0.001$). S ve SR grupları ile karşılaştırıldığında beyin TBARS değerlerinin AH grubunda anlamlı bir şekilde arttığı izlenmiştir. AH ile AHR grubu karşılaştırıldığında ise beyin TBARS sonuçlarının AHR grubunda fark edilir düzeyde azaldığı gözlenirken, AHR ve S, SR grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür.



Şekil 4. 1. Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin TBARS değerleri (n=10, sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. * p < 0.01 S grubundan fark, § p < 0.01 AH grubundan fark)

4.4. 4-Hidroksi 2- Nonenal Aktivitesi Sonuçları

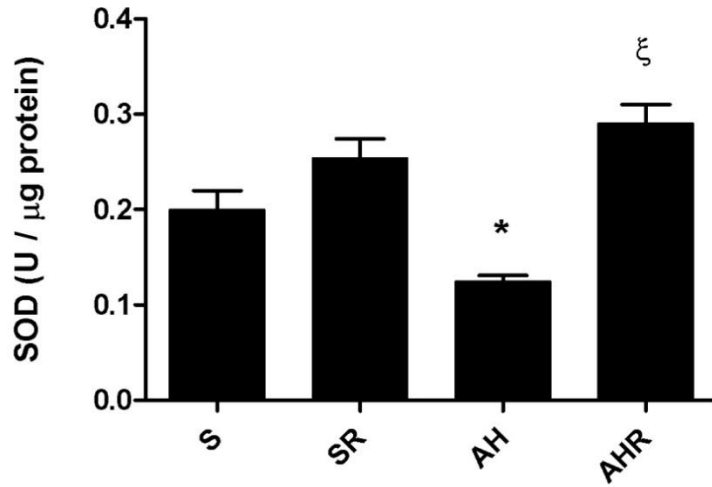
Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin 4-HNE sonuçları Şekil 4.2 ve Tablo 4.2'de verilmiştir. 4-HNE değerlerinin tek yönlü ANOVA testi ile analizinde gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir (F(3,35)= 17.77, p < 0.001). S ve SR grupları ile karşılaştırıldığında beyin 4-HNE değerlerinin AH grubunda anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. AH ile AHR grubu kıyaslandığında beyin 4-HNE değerinin AHR grubunda anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür. AHR ve S, SR grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4. 2. Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin 4-HNE değerleri (n=10, sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. * p < 0.01 S grubundan fark, § p < 0.01 AH grubundan fark)

4.5. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktiviteleri Sonuçları

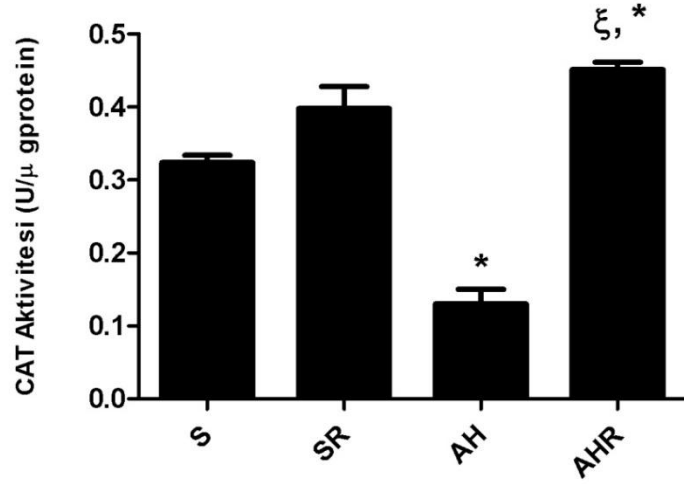
Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin SOD aktiviteleri Şekil 4.3 ve Tablo 4.2' de verilmiştir. Tüm grupların SOD aktivite değerleri tek yönlü ANOVA testi ile incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($F(3,35)=18.13$, $p < 0.001$). Yapılan post-hoc testi sonucunda beyin SOD aktivitesinin, AH grubunda S ve SR gruplarına göre anlamlı düzeyde azaldığı izlenirken, AHR grubunda AH grubuna göre anlamlı derecede arttığı saptanmıştır. S ve SR grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.



Şekil 4. 3. Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin SOD aktivitesi değerleri (n=10, sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. * $p < 0.01$ S grubundan fark, ^ξ $p < 0.01$ AH grubundan fark)

4.6. Katalaz Enzim Aktivitesi Sonuçları

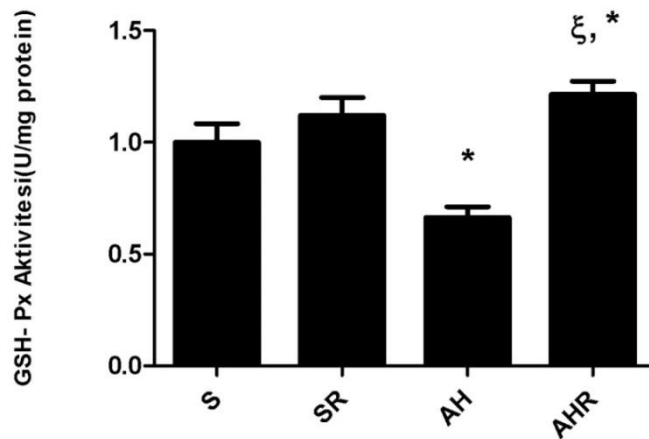
Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin CAT aktiviteleri Şekil 4.4 ve Tablo 4.2'de verilmiştir. Tüm grupların CAT aktivite değerleri tek yönlü ANOVA testi ile incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($F(3,35)=44.97$, $p < 0.001$). Beyin CAT aktivitesinin AH grubunda, S ve SR gruplarına göre istatistiksel yönden anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir. Diğer yandan AHR grubunun CAT aktivite değerlerinin S ve AH gruplarına göre anlamlı derecede arttığı bulunmuştur.



Şekil 4. 4. Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin CAT aktiviteleri (n=10, sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. * p < 0.001 S grubundan fark, ξ p < 0.001 AH grubundan fark)

4.7. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi Sonuçları

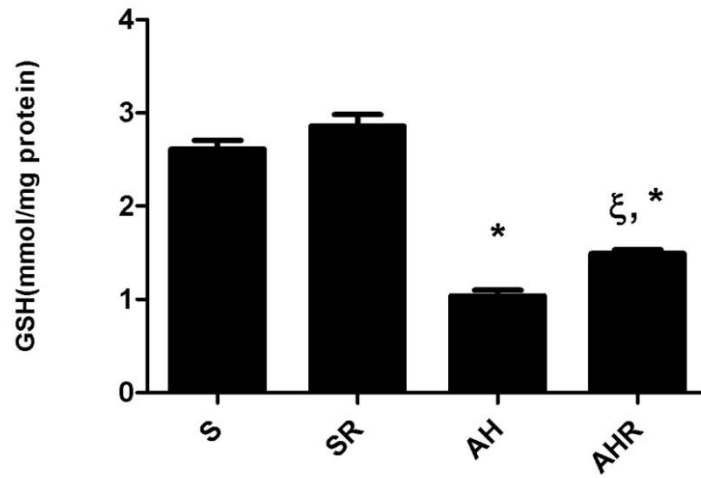
Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin GSH-Px aktiviteleri Şekil 4.5 ve Tablo 4.2’de verilmiştir. Tüm grupların GSH-Px aktivite değerleri tek yönlü ANOVA testi ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir (F(3,34)= 32.47, p < 0.001). Yapılan post-hoc testi sonucunda beyin GSH-Px aktivitesinin AH grubunda S ve SR gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. AHR grubunun GSH-Px aktivitesinin ise S ve AH gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur.



Şekil 4. 5. Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin GSH-Px aktiviteleri (n=10, sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. * p < 0.05 S grubundan fark, ξ p < 0.001 AH grubundan fark)

4.8. Glutasyon Sonuçları

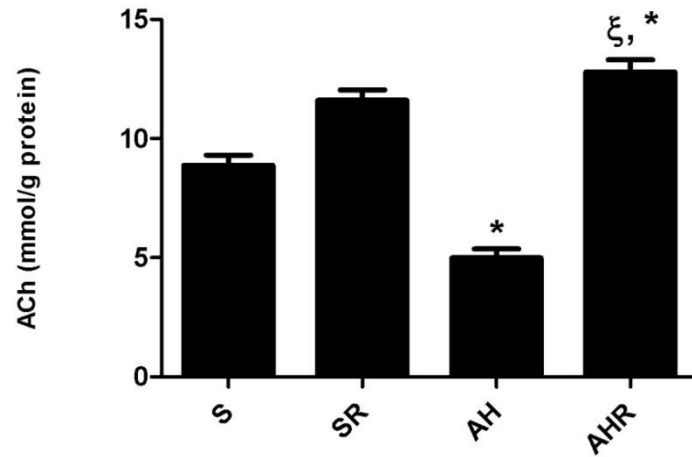
Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin GSH değerleri Şekil 4.6 ve Tablo 4.2'de verilmiştir. Tüm grupların GSH değerleri tek yönlü ANOVA testi ile incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($F(3,35)=101.67$, $p < 0.001$). Yapılan post-hoc testi sonucunda beyin GSH değerlerinin AH grubunda, S ve SR gruplarına göre önemli derecede azaldığı bulunmuştur. Diğer yandan AHR grubunun GSH değerinin AH gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı izlenirken, S ve SR gruplarının GSH değerinden anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır.



Şekil 4. 6. Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin GSH aktiviteleri ($n=10$, sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. * $p < 0.001$ S grubundan fark, ξ $p < 0.01$ AH grubundan fark)

4.9. Asetilkolin Sonuçları

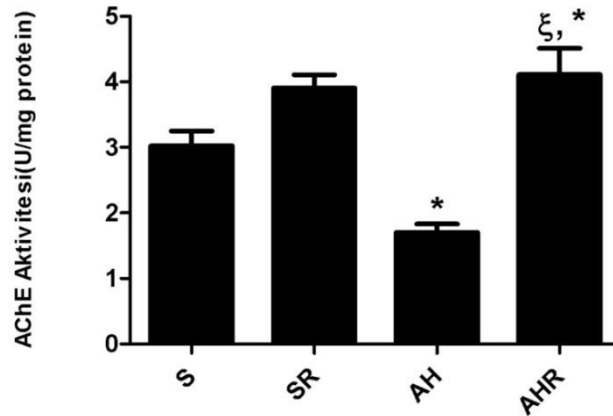
Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin ACh değerleri Şekil 4.7 ve Tablo 4.2'de verilmiştir. Tüm grupların ACh değerleri tek yönlü ANOVA testi ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($F(3,32)=58.40$, $p < 0.001$). Gerçekleştirilen post-hoc analizleri neticesinde beyin ACh değerinin AH grubunda, S ve SR gruplarına göre istatistiksel yönden anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Diğer yandan AHR grubunun ACh değerinin S, SR ve AH gruplarına göre anlamlı derecede arttığı bulunmuştur.



Şekil 4. 7. Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin ACh değerleri (n=10, sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. * p < 0.01 S grubundan fark, § p < 0.001 AH grubundan fark)

4.10. Asetilkolinesteraz Aktivitesi Sonuçları

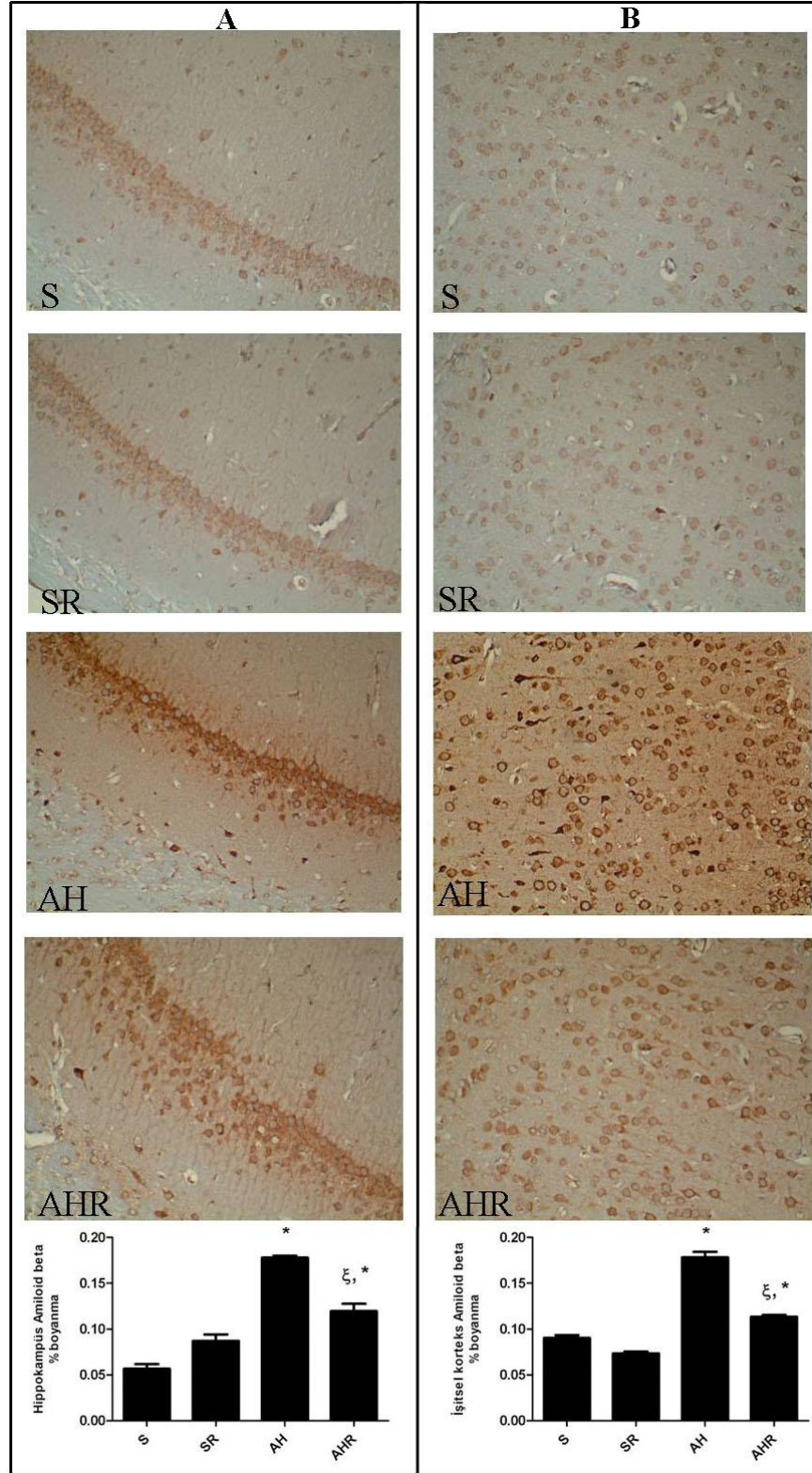
Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin AChE aktiviteleri Şekil 4.8 ve Tablo 4.2'de verilmiştir. Tüm grupların AChE aktivite değerleri tek yönlü ANOVA testi ile kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir (F(3,34)= 20.47, p < 0.001). Yapılan post-hoc testi sonucunda beyin AChE aktivitesinin AH grubunda S ve SR gruplarına göre anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir. Diğer yandan, AHR grubunun AChE aktivitesinin ise S, SR ve AH gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.



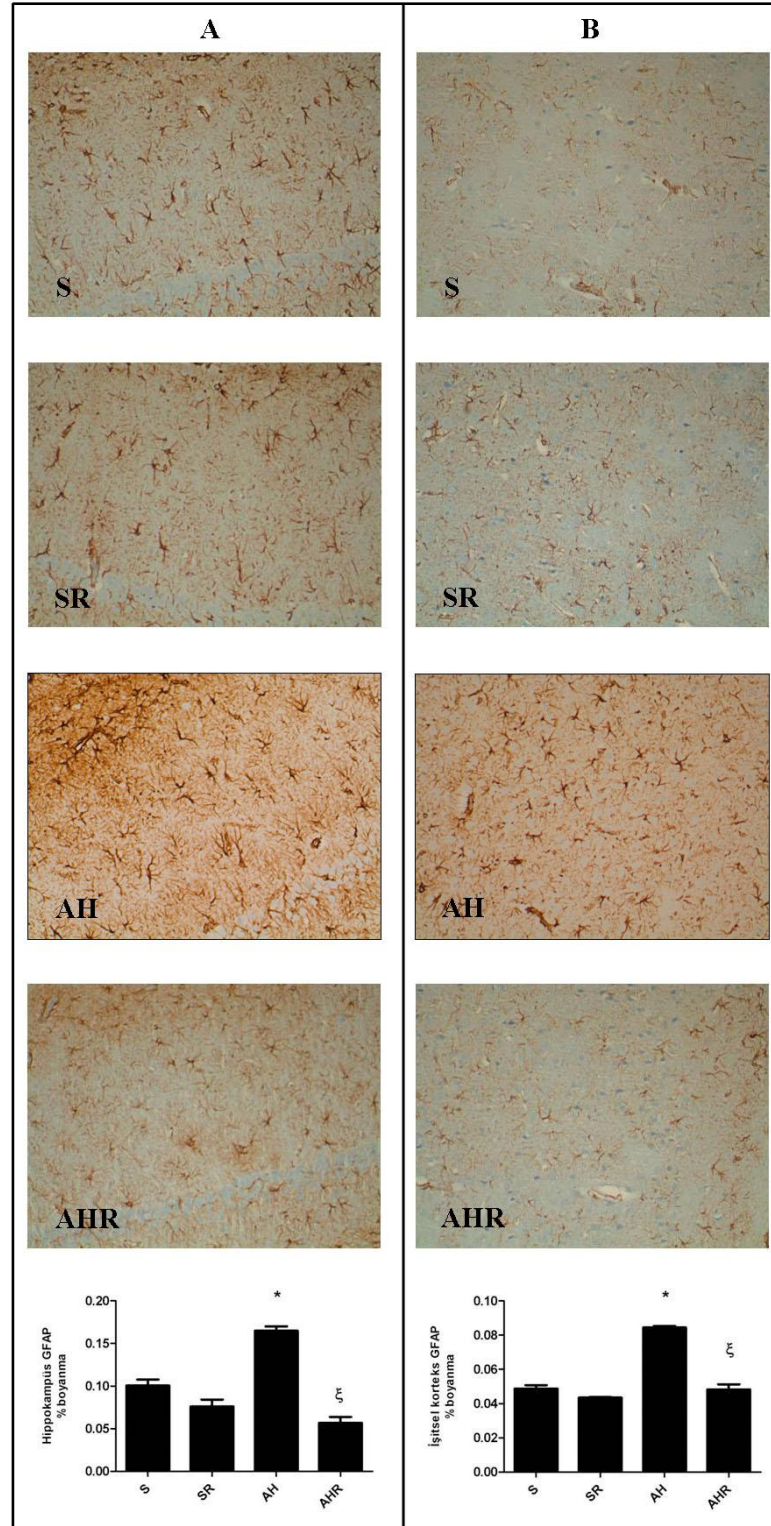
Şekil 4. 8. Sham ve deney grubu hayvanlarının beyin AChE aktiviteleri (n=10, sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. * p < 0.05 S grubundan fark, § p < 0.001 AH grubundan fark)

4.11. İmmühistokimyasal Boyama Sonuçları

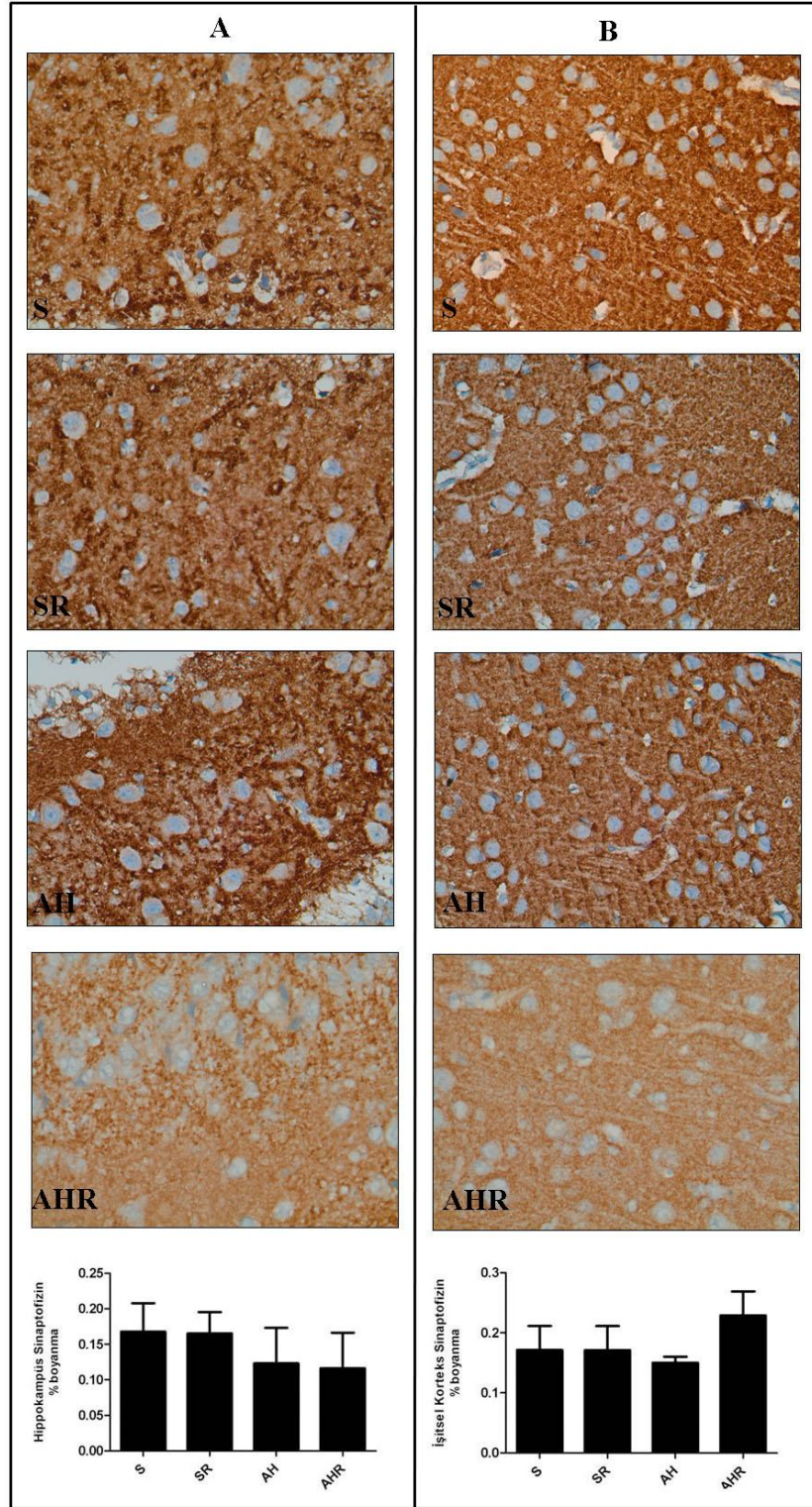
Sham ve deney gruplarında hipokampus ve işitsel korteksdeki A β , GFAP ve sinaptofizin immünboyamaları ve kantitatif analizleri Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Amiloid β 42 enjekte edilen hayvanlarda beyin parankimasında belirgin A β immünreaksiyonları izlenmektedir. AHR grubunda A β boyanmalarının AH grubuna göre anlamlı derecede azaldığı dikkati çekmektedir. Diğer yandan, AH grubunda GFAP immünreaktivitesinin diğer gruplara göre belirgin bir şekilde arttığı görülmüştür. Bu artışın AHR grubunda önemli derecede azaldığı belirlenmiştir. Sinaptofizin immün boyamaları incelendiğinde gruplar arasında sinaptofizin ekspresyonunda herhangi bir farklılığın olmadığı saptanmıştır.



Şekil 4. 9. Sham ve deney gruplarında immünohistokimyasal Aβ boyama sonuçları. A : HipokampusAβ boyanması (20× büyütme) ve kantitatif analiz sonuçları, B: İşitsel korteksAβ boyanması (20× büyütme) ve kantitatif analiz sonuçları. (n = 4, sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir, * p < 0.05 S grubundan fark, ^ξ p < 0.001 AH grubundan fark)



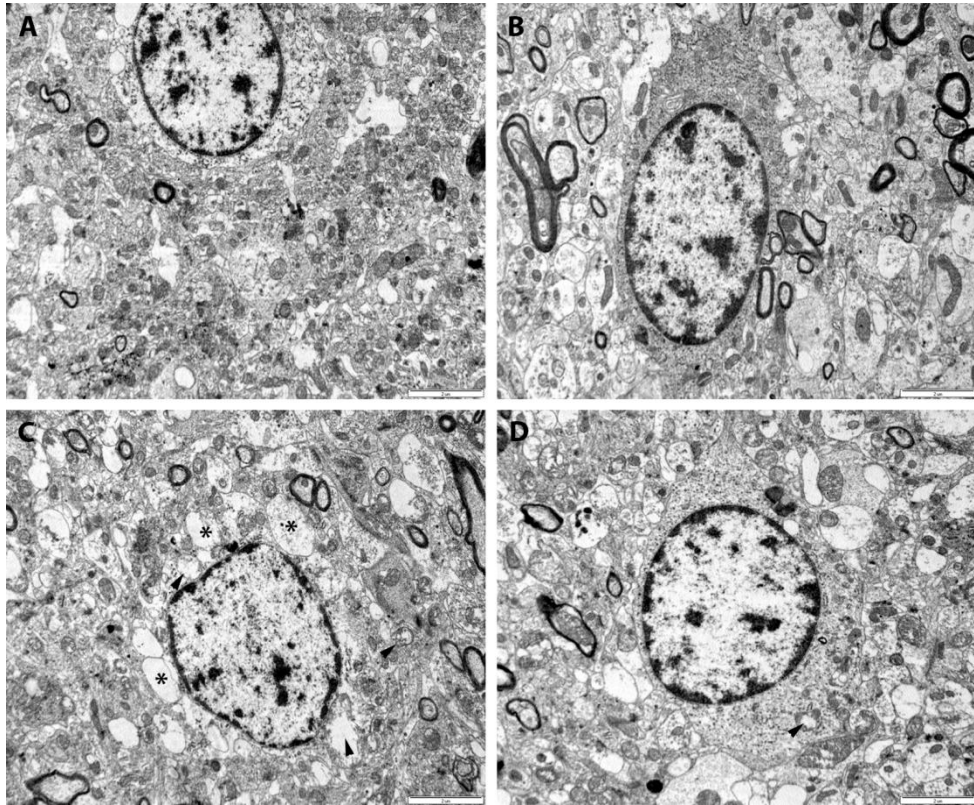
Şekil 4. 10. Sham ve deney gruplarında immünohistokimyasal GFAP boyama sonuçları. A : HipokampusGFAP boyanması (20× büyütme) ve kantitatif analiz sonuçları, B: İşitsel korteks GFAP boyanması (20× büyütme) ve kantitatif analiz sonuçları. (n = 4, sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir, * p < 0.05 S grubundan fark, ^ξ p < 0.001 AH grubundan fark)



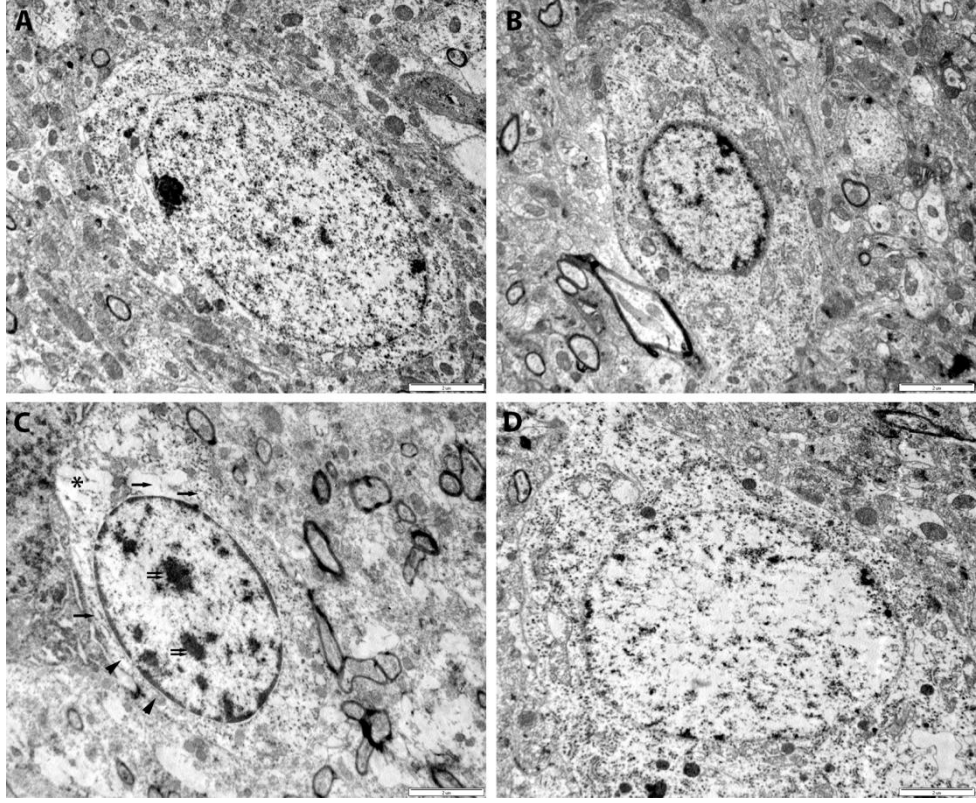
Şekil 4. 11. Sham ve deney gruplarında immünohistokimyasal sinaptofizin boyama sonuçları. A : Hipokampüssinaptofizin boyanması (40× büyütme) ve kantitatif analiz sonuçları, B: İşitsel korteks sinaptofizin boyanması (40× büyütme) ve kantitatif analiz sonuçları. (n = 4, sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir)

4.12. Elektron Mikroskop Analizi Sonuçları

Bazal önbeyin ve temporal korteks incelendiğinde, S ve SR gruplarında nükleus ve perikaryon yapısının normal olduğu görülmektedir (Şekil 4.10A,B; Şekil4.11A,B). Normal sitoplazma ve organel yapıları izlenmektedir. Bazal ön beyinde AH grubunda mitokondriyonlardadeformasyon (ok başı) vesitoplazmada içeriksiz ödeme bağlı boşluklar dikkati çekmektedir (Şekil 4.10 C). Temporal kortekste ise AH grubunda mitokondriyonlarda deformasyon (ok başı), sitoplazmada vakuoller (yıldız), ödemöz endoplazmik retikulum (oklar) ve nükleer kondensasyon (çift oklar) izlenmektedir (Şekil 4.11 C). Tedavi grubunda ise sitoplazmada az miktarda vakuol, mitokondriyel deformasyon (ok başı) izlenirken organellerin normal yapıda olduğu ve membran bütünlüğünün korunduğu saptanmıştır.



Şekil 4. 12. Sham ve deney gruplarında bazal önbeyinde elektron mikroskopu incelemeleri,A : Sgrubu, B: SR grubu, C: AH grubu, D: AHR grubu. Mitokondriyonlar (ok başları), vakuoller (yıldız) ile gösterilmektedir.



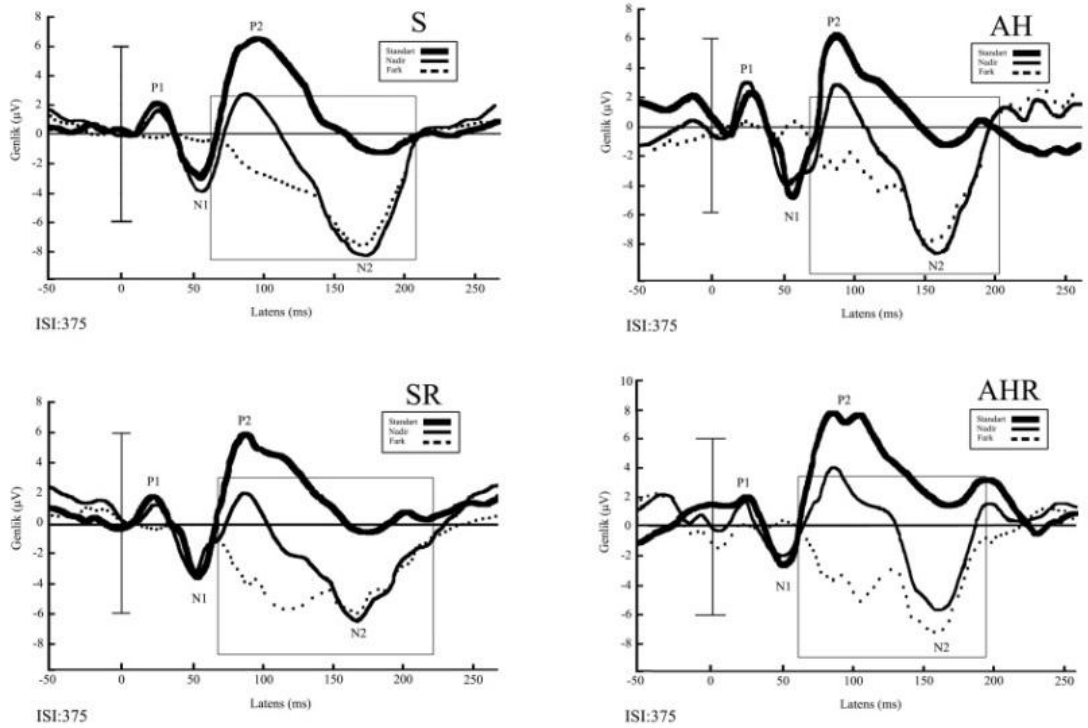
Şekil 4. 13. Sham ve deney gruplarında işitsel korteksde elektron mikroskopu incelemeleri,A : S grubu, B: SR grubu, C: AH grubu, D: AHR grubu. Mitokondriyonlar (ok başları), vakuoller (yıldız), şişmiş endoplasmik retikulum (oklar), nükleer kondensasyon (çift oklar) ile gösterilmektedir.

Tablo 4. 2. Sham ve deney grubu hayvanlarının biyokimyasal sonuçları

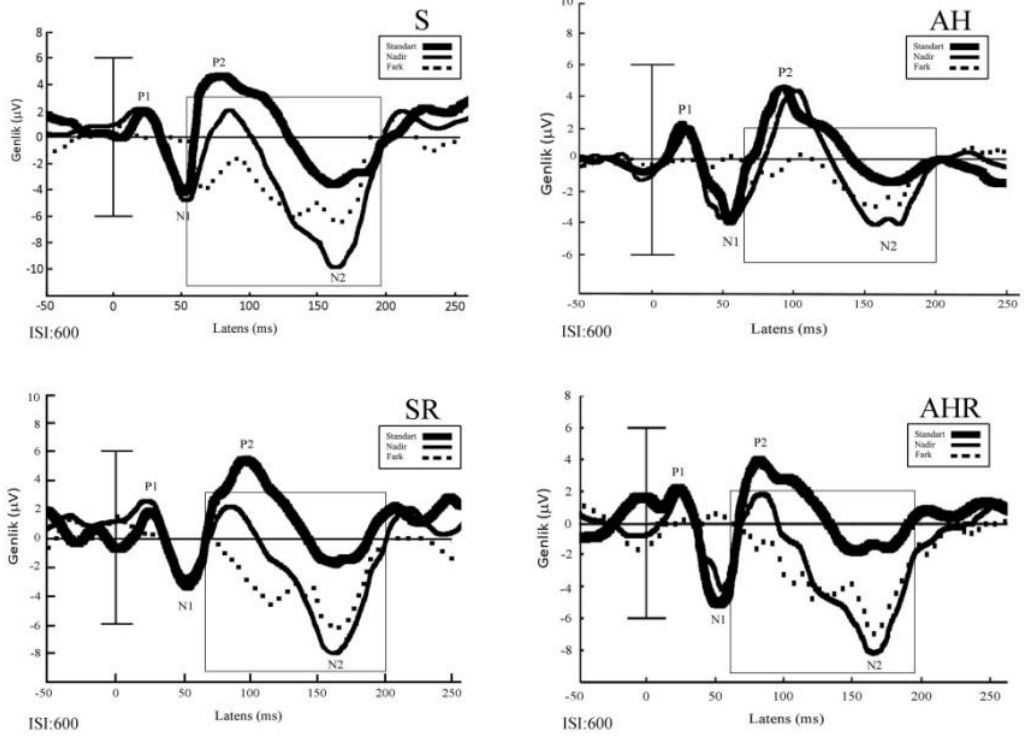
Gruplar	TBARS ($\mu\text{mol/gprotein}$)	4-HNE ($\mu\text{mol/mgprotein}$)	SOD (U/ $\mu\text{gprotein}$)	CAT (U/ $\mu\text{gprotein}$)	GSH-Px (U/mgprotein)	GSH (mmol/mgprotein)	ACh (mmol/gprotein)	AChE (U/mgprotein)
S	0,26 \pm 0,01	1,42 \pm 0,04	0,19 \pm 0,02	0,32 \pm 0,01	1,00 \pm 0,08	2,61 \pm 0,09	8,88 \pm 0,42	3,02 \pm 0,22
SR	0,19 \pm 0,02	1,35 \pm 0,06	0,25 \pm 0,02	0,39 \pm 0,03	1,12 \pm 0,08	2,86 \pm 0,02	11,60 \pm 0,43	3,90 \pm 0,19
AH	0,33 \pm 0,02 *	1,86 \pm 0,05 *	0,12 \pm 0,01 *	0,13 \pm 0,02 *	0,66 \pm 0,04 *	1,04 \pm 0,05 *	4,99 \pm 0,38 *	1,70 \pm 0,12 *
AHR	0,21 \pm 0,02 ξ	1,36 \pm 0,06 ξ	0,29 \pm 0,02 ξ	0,45 \pm 0,01 * ξ	1,21 \pm 0,05 * ξ	1,49 \pm 0,03 * ξ	12,79 \pm 0,50 * ξ	4,11 \pm 0,40 * ξ

4.13. Olaya İlişkin Potansiyel (OİP) ve Uyumsuzluk Negativitesi (MMN) Sonuçları

Tüm gruplarda her bir sıçan için standart ve nadir tonlara verilen yanıtların ortalaması alınarak elde edilen OİP'lerin pik genlikleri ve latensleri belirlenmiştir. Nadir tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama OİP eğrisinden, standart tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama OİP eğrisi çıkarılarak her bir sıçana ait fark eğrileri elde edilmiştir. Tüm deney gruplarından elde edilen standart ve nadir cevaplarının ortalaması Şekil 4.14' de sunulmuştur. Olaya İlişkin Potansiyellerin pik latenslerinin ve tepeden tepeye genliklerinin ortalama değerleri ve standart hataları Tablo 4.3, Tablo 4.4, Tablo 4.5 ve Tablo 4.6 'da verilmiştir. Olaya İlişkin Potansiyellerin tüm latens ve genlik değerlerine 2 (uyarı türü: standart, nadir) x 2 (uyarılar arası süre (ISI): 375 ms, 600 ms) x 4 (deney grupları: S, SR, AH, AHR) Karışık Faktörlü ANOVA (Mixed-Design ANOVA) uygulanmıştır.



Şekil 4. 14. Sham ve deney grubu hayvanlarından kaydedilen OİP'ler ve bileşenleri (ISI:375 ms)



Şekil 4. 15. Sham ve deney grubu hayvanlarından kaydedilen OİP'ler ve bileşenleri (ISI:600 ms)

Deney grupları arasında yapılan karşılaştırmada uyarı türü ve uyarılar arasındaki süreden bağımsız olarak OİP'lerin tüm bileşenleri için latens değerlerinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir ($p > 0.05$) (Tablo 4.3, Tablo 4.4). Benzer şekilde, hem uyarı türünün ve hem de uyarılar arası sürenin OİP latens değerlerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde etkilemediği saptanmıştır ($p > 0.05$).

Tablo 4.3. Sham ve deney grubu hayvanlarından 375 ms ISI değerinde standart ve nadir uyarıya yanıt olarak ortaya çıkan OİP bileşenlerinin latensleri (ms)

	Gruplar	P1		N1		P2		N2	
		Standart	Nadir	Standart	Nadir	Standart	Nadir	Standart	Nadir
Fsağ	S	30,22± 2,07	33,33± 1,33	67,67± 2,11	67,56± 2,10	94,11± 2,02	96,44± 3,78	159,78± 2,39	157,56± 3,83
	SR	28,00± 1,66	22,30± ,98	58,30± 2,82	59,80± 1,72	84,20± 4,47	81,00± 2,67	147,20± 5,42	151,40± 5,15
	AH	28,30± 1,33	29,30± 0,90	55,30± 2,51	57,30± 2,49	85,30± 1,11	85,60± 3,29	148,20± 4,80	147,00± 4,53
	AHR	27,40± 2,13	25,20± 1,64	56,60± 3,57	52,00± 1,98	87,60± 3,56	85,80± 1,99	142,60± 4,99	151,70± 4,26
Fsol	S	27,56± 1,16	27,78± ,70	57,11± 1,95	52,89± 1,01	85,89± 4,17	77,00± 3,82	161,89± 2,30	156,89± 3,77
	SR	28,40± 1,80	24,60± 1,15	56,00± 2,17	52,60± 1,93	92,50± 7,37	85,90± 2,90	151,60± 5,95	152,90± 2,56
	AH	30,40± 1,73	26,00± 1,71	56,40± 2,34	53,20± 1,72	89,20± 2,09	87,20± 2,17	154,20± 5,39	150,00± 4,36
	AHR	27,20± 1,16	24,60± 1,23	56,00± 2,37	51,20± 1,91	84,80± 3,17	88,00± 2,91	157,10± 4,31	155,30± 2,60
Tsağ	S	27,33± 1,97	26,89± 1,49	57,56± 3,05	58,22± 2,66	95,89± 5,74	93,33± 5,13	152,44± 6,01	153,56± 3,01
	SR	26,80± 2,33	27,70± 2,52	52,10± 2,37	56,40± 2,11	78,30± 2,85	78,80± 1,87	154,70± 4,14	153,10± 5,60
	AH	29,20± 1,64	29,80± 1,85	58,40± 2,06	60,20± 3,16	92,20± 1,05	89,80± 3,87	152,80± 3,44	159,80± 5,93
	AHR	24,60± 1,69	26,70± 1,81	56,60± 3,68	57,00± 3,09	88,00± 2,11	86,90± 4,02	159,70± 3,98	159,50± 4,89
Tsol	S	27,78± 1,75	27,33± 1,89	56,67± 1,91	57,78± 1,87	90,22± 2,25	88,89± 2,63	157,67± 2,93	156,44± 2,78
	SR	30,00± 2,21	29,20± 2,44	58,10± 2,29	57,40± 2,24	85,70± 3,55	80,50± 2,37	152,90± 5,43	152,20± 2,61
	AH	30,40± 1,51	27,00± 1,67	62,00± 0,89	61,20± 2,07	91,80± 1,25	89,90± 4,11	152,30± 4,48	149,60± 5,09
	AHR	27,60± 2,06	27,40± 2,57	53,20± 2,90	56,20± 3,25	86,00± 1,19	86,60± 2,65	146,00± 5,97	148,30± 5,59

Tablo 4. 4. Sham ve deney grubu hayvanlarından 600 ms ISI değerinde standart ve nadir uyarıya yanıt olarak ortaya çıkan OİP bileşenlerinin latensleri (ms)

	Gruplar	P1		N1		P2		N2	
		Standart	Nadir	Standart	Nadir	Standart	Nadir	Standart	Nadir
Fsağ	S	30,00± 1,60	28,44± 1,94	56,67± 2,36	56,44± 2,05	87,22± 2,69	86,56± 2,74	155,67± 5,18	159,56± 6,22
	SR	28,80± 1,84	25,00± 2,52	58,00± 2,46	53,00± 3,21	91,00± 2,78	82,30± 2,47	158,40± 5,15	155,40± 4,40
	AH	29,10± 1,69	28,90± 1,91	59,60± 2,00	53,30± 1,87	87,50± 1,68	89,70± 5,03	160,10± 3,43	158,30± 4,29
	AHR	26,80± 1,08	27,40± 1,68	57,80± 2,85	54,10± 2,12	91,70± 1,98	75,80± 1,74	160,20± 2,15	152,60± 2,79
Fsol	S	25,78± 1,22	24,67± 1,82	53,78± 1,55	54,56± 2,08	85,89± 2,20	83,00± 2,47	163,11± 3,87	149,22± 2,07
	SR	23,60± 1,36	25,50± 1,13	51,40± 3,28	51,90± 2,33	78,80± 2,78	90,78± 2,27	159,30± 3,00	162,40± 4,18
	AH	25,90± 1,39	28,50± 1,11	53,60± 1,67	54,80± ,89	82,10± 2,32	83,10± 2,96	161,10± 2,42	160,80± 2,03
	AHR	26,30± ,70	25,40± 1,07	56,90± 1,32	59,80± 2,66	85,30± 2,20	82,40± 1,56	162,60± 2,79	152,80± 2,02
Tsağ	S	24,67± 1,49	26,33± 1,86	54,56± 3,07	54,44± 2,33	87,67± 3,21	86,78± 2,26	157,33± 4,34	161,22± 3,81
	SR	26,50± 2,03	25,10± ,67	54,20± 2,56	52,70± 1,85	82,30± 2,54	86,20± 1,82	159,70± 3,95	159,10± 3,58
	AH	27,70± 2,00	28,80± 2,09	55,20± 3,31	56,70± 2,59	85,50± 2,66	83,80± 2,98	163,30± 4,20	158,30± 4,49
	AHR	24,40± 1,18	26,80± 1,43	53,90± 1,44	57,70± ,90	79,40± 4,11	83,20± 2,28	159,50± 2,64	153,30± 3,52
Tsol	S	26,56± 2,14	28,00± 4,49	57,22± 2,55	54,00± 2,08	89,56± 2,78	86,00± 2,81	158,89± 3,90	163,00± 2,19
	SR	27,60± 1,90	26,90± 1,78	57,00± 2,22	55,00± 1,82	89,50± 3,10	79,50± 2,84	159,40± 3,65	156,80± 4,60
	AH	27,10± 1,51	28,00± 2,09	51,40± 2,67	55,10± 1,84	83,20± 3,28	84,70± 3,13	156,20± 3,01	159,40± 2,73
	AHR	27,00± 1,71	27,50± 1,26	58,70± 1,18	50,80± 1,07	81,90± 2,93	83,10± 1,49	157,40± 3,10	157,90± 2,16

Tepeden tepeye genlik değerlerinin Karışık Faktörlü ANOVA ile analizi sonucunda sol frontal bölgede tüm genlik değerleri için gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$). Sağ frontal ve temporal bölgelerde ise N1P2 ve N2P2 genlik değerlerinde gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Sağ frontal ve temporal bölgelerde uyarı türünün ve ISI

değerinin N1P2 ve N2P2 genlik değerlerini anlamlı düzeyde etkilediği saptanmıştır ($p < 0.05$). Aynı zamanda N1P2 ve N2P2 genlik değerleri için [uyarı türü x deney grupları] ve [ISI x deney grupları] etkileşimlerinin anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Bu anlamlı etkileşim değerleri uyarı türünün ve ISI değerinin N1P2 ve N2P2 genlik değerlerine etkisinin gruplara göre değiştiğine işaret etmektedir. Ayrıca, N1P2 ve N2P2 genlikleri için uyarı türü ve ISI arasında istatistiksel olarak anlamlı bir etkileşim olduğu saptanmıştır. Bu sonuç uyarı türünün N1P2 ve N2P2 genliklerine etkisinin belirli bir ISI değeri için daha güçlü olduğunu göstermektedir. Bu etkileşimlerin ve gruplar arasında belirlenen farklılıkların daha detaylı analizi için N1P2 ve N2P2 genlikleri 375 ms ve 600 ms olmak üzere iki farklı ISI değerleri için yinelenen ölçümler ANOVA (Repeated Measure ANOVA) ile analiz edilmiştir.

Uyarılar arası sürenin 375 ms olduğu OİP'lerde uyarı türünün N1P2 ve N2P2 genliklerine anlamlı derecede etki ettiği ($p < 0.05$) ancak deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur ($p > 0.05$). İki eş arasında fark testi (Paired T Testi) ile tepeden tepeye genlik değerlerinin grup içi karşılaştırmalarında, tüm gruplarda standart uyarı cevaplarıyla karşılaştırıldığında nadir uyarı cevaplarında N1P2 genlik değerlerinin anlamlı derecede azalırken, P2N2 genlik değerlerinin ise önemli derecede arttığı tespit edilmiştir.

Uyarılar arası sürenin 600 ms olduğu OİP'lerde uyarı türünün N1P2 ve N2P2 genliklerine anlamlı derecede etki ettiği ($p < 0.05$) ve genlik değerlerinde gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Standart ve nadir uyarı cevapları ayrı ayrı tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirildiğinde, sağ frontal ve temporal bölgelerde nadir uyarı cevaplarının N1P2 ve N2P2 genlik değerlerinde gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p < 0.01$). Bunu takiben yapılan posthoc Tukey testi sonucunda AH grubunda diğer gruplara göre N1P2 genlik değerinin arttığı, N2P2 genlik değerlerinin ise anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir (Tablo 4.4). Tedavi grubu AHR 'de N1P2 ve N2P2 genlik değerlerinin AH grubuna göre anlamlı derecede değiştiği ve SR grubunun genlik değerlerine yakın olduğu saptanmıştır. İki eş arasında fark testi (Paired T Testi) AH grubu dışındaki tüm gruplarda nadir uyarı cevaplarındastandard uyarı cevaplarına göre N1P2 genliğinin azaldığını, P2N2 genliğinin ise önemli derecede arttığını göstermiştir.

Tablo 4. 5. Sham ve deney grubu hayvanlarından 375 ms ISI değerinde standart ve nadir uyarıya yanıt olarak ortaya çıkan tepeden tepeye OİP genlikleri (μV) (ψ : $p < 0.05$ standart yanıtla göre fark)

Bölgeler	Gruplar	P1N1		N1P2		P2N2	
		Standart	Nadir	Standart	Nadir	Standart	Nadir
Fsağ	S	6,70 \pm 0,76	5,36 \pm 0,39	7,14 \pm 0,45	7,07 \pm 0, 62	5,81 \pm 0,94	6,69 \pm 0,44
	SR	4,30 \pm 0,48	4,96 \pm 0,50	6,99 \pm 0,58	4,63 \pm 0,55	4,22 \pm 0,48	5,66 \pm 0,35
	AH	4,83 \pm 0,46	4,07 \pm 0,20	7,83 \pm 0,76	4,67 \pm 0,42	5,66 \pm 0,34	5,48 \pm 0,58
	AHR	4,80 \pm 0,57	4,46 \pm 0,62	7,40 \pm 0,39	4,39 \pm 0,46	5,51 \pm 0,60	5,78 \pm 0,39
Fsol	S	5,78 \pm 0,66	6,99 \pm 0,40	11,17 \pm 0,64	6,58 \pm 0,59 ψ	6,37 \pm 0,41	12,33 \pm 0,55 ψ
	SR	4,97 \pm 0,52	5,42 \pm 0,32	10,07 \pm 0,47	4,90 \pm 0,53 ψ	5,23 \pm 0,37	11,07 \pm 0,63 ψ
	AH	4,97 \pm 0,14	5,04 \pm 0,30	9,21 \pm 0,62	5,55 \pm 0,25 ψ	5,54 \pm 0,36	10,92 \pm 0,76 ψ
	AHR	4,45 \pm 0,52	4,64 \pm 0,45	10,33 \pm 0,32	4,67 \pm 0,54 ψ	5,46 \pm 0,59	10,35 \pm 0,36 ψ
Tsağ	S	6,38 \pm 0,58	6,40 \pm 0,48	12,31 \pm 0,63	5,28 \pm 0,36 ψ	6,77 \pm 0,51	12,06 \pm 0,82 ψ
	SR	6,30 \pm 0,34	5,83 \pm 0,53	10,72 \pm 0,68	6,36 \pm 0,55 ψ	6,05 \pm 0,25	11,89 \pm 0,53 ψ
	AH	5,47 \pm 0,42	4,32 \pm 0,39	8,81 \pm 0,33	5,13 \pm 0,29 ψ	5,15 \pm 0,41	10,60 \pm 0,37 ψ
	AHR	5,34 \pm 0,44	5,78 \pm 0,52	9,34 \pm 0,51	5,38 \pm 0,25 ψ	5,17 \pm 0,27	9,51 \pm 0,70 ψ
Tsol	S	5,20 \pm 0,37	5,99 \pm 0,48	12,75 \pm 0,64	5,76 \pm 0,25 ψ	6,36 \pm 0,33	13,03 \pm 0,60 ψ
	SR	5,90 \pm 0,41	5,85 \pm 0,61	11,51 \pm 0,61	5,10 \pm 0,46 ψ	5,93 \pm 0,34	10,63 \pm 0,26 ψ
	AH	6,40 \pm 0,59	6,30 \pm 0,59	11,07 \pm 0,60	5,04 \pm 0,37 ψ	5,60 \pm 0,19	11,55 \pm 0,63 ψ
	AHR	4,78 \pm 0,34	4,80 \pm 0,30	10,68 \pm 0,71	5,13 \pm 0,58 ψ	6,04 \pm 0,31	11,23 \pm 0,53 ψ

Tablo 4. 6. Sham ve deney grubu hayvanlarından 600 ms ISI değerinde standart ve nadir uyarıya yanıt olarak ortaya çıkan tepeden tepeye OİP genlikleri (μV) (ψ : $p<0.05$ standart yanıtı göre fark , * : $p<0.05$ Sham grubuna göre fark, ξ : $p<0.05$ AH grubuna göre fark)

	Gruplar	P1N1		N1P2		P2N2	
		Standart	Nadir	Standart	Nadir	Standart	Nadir
Fsağ	S	5,23 \pm 0,58	5,36 \pm 0,29	7,28 \pm 0,60	5,80 \pm 0,23	5,91 \pm 0,25	5,21 \pm 0,19
	SR	4,37 \pm 0,14	4,87 \pm 0,33	8,51 \pm 0,25	6,07 \pm 0,16	5,61 \pm 0,32	5,71 \pm 0,24
	AH	4,86 \pm 0,59	6,66 \pm 0,43	7,25 \pm 0,65	5,04 \pm 0,33	6,07 \pm 0,67	5,97 \pm 0,45
	AHR	6,01 \pm 0,51	6,06 \pm 0,29	7,93 \pm 0,37	6,22 \pm 0,43	6,33 \pm 0,59	6,58 \pm 0,57
Fsol	S	5,11 \pm 0,61	5,23 \pm 0,66	10,85 \pm 0,44	6,66 \pm 0,63 ψ	6,85 \pm 0,32	13,01 \pm 0,67 ψ
	SR	5,46 \pm 0,42	5,37 \pm 0,69	12,05 \pm 1,17	6,44 \pm 0,60 ψ	5,56 \pm 0,21	10,70 \pm 0,41 ψ
	AH	5,91 \pm 0,62	6,93 \pm 0,55	10,10 \pm 0,24	9,78 \pm 0,50 *	5,96 \pm 0,40	7,99 \pm 0,40 *
	AHR	6,43 \pm 0,37	6,41 \pm 0,47	11,17 \pm 0,59	7,01 \pm 0,51 ψ ξ	6,48 \pm 0,52	12,51 \pm 0,81 $\psi\xi$
Tsağ	S	4,79 \pm 0,41	6,77 \pm 0,59	9,78 \pm 0,45	4,69 \pm 0,49 ψ	5,96 \pm 0,52	11,83 \pm 0,26 ψ
	SR	5,58 \pm 0,55	6,96 \pm 0,29	11,27 \pm 0,63	5,49 \pm 0,19 ψ	6,71 \pm 0,42	13,58 \pm 0,54 ψ
	AH	6,75 \pm 0,82	7,39 \pm 0,53	9,94 \pm 0,23	9,28 \pm 0,45 *	6,59 \pm 1,11	8,06 \pm 0,54 *
	AHR	6,70 \pm 0,45	6,02 \pm 0,41	10,48 \pm 0,47 ξ	5,56 \pm 0,28 ψ ξ	5,50 \pm 0,42	11,10 \pm 0,94 $\psi\xi$
Tsol	S	6,28 \pm 0,19	6,74 \pm 0,35	11,04 \pm 0,47	5,91 \pm 0,39 ψ	6,10 \pm 0,43	13,05 \pm 0,67 ψ
	SR	5,08 \pm 0,24	5,35 \pm 0,32	11,11 \pm 0,50	5,73 \pm 0,28 ψ	5,33 \pm 0,33	10,25 \pm 0,39 ψ
	AH	6,31 \pm 0,50	6,51 \pm 0,89	9,26 \pm 0,20	9,06 \pm 0,24 *	6,30 \pm 0,26	8,50 \pm 0,43 *
	AHR	6,33 \pm 0,21	6,12 \pm 0,39	10,50 \pm 0,68	6,01 \pm 0,64 ψ ξ	6,48 \pm 0,20	11,36 \pm 0,35 $\psi\xi$

Fark eğrilerinden 50-120 ms ve 120-180 ms olarak belirlenen zaman aralıklarında ölçülen MMN genlikleri tek yönlü ANOVA ile değerlendirilmiştir. Sağ frontal ve temporal elektrot bölgelerinde 375 ms ISI değerinde elde edilen MMN genliklerinde gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Aynı

bölgelerde 600 ms ISI değerinde elde edilen MMN genliklerinin AH grubunda diğer gruplara göre önemli derecede azaldığı izlenmiştir (Tablo 4.7). Tedavi grubunda ise MMN genliklerinin S grubuyla aynı seviyede olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4. 7. Sham ve deney gruplarına ait MMN yanıtları (μV) (*: $p < 0.05$ Sham grubuna göre fark, ξ : $p < 0.05$ AH grubuna göre fark)

	Gruplar	ISI 375		ISI 600	
		50-120 ms	120-180 ms	50-120 ms	120-180 ms
Fsağ	S	1,92±0,52	2,67±0,24	1,18±0,44	2,84±0,52
	SR	2,15±0,37	1,35±0,11	2,35±0,48	1,74±0,27
	AH	1,82±0,28	2,50±0,21	2,04±0,40	2,16±0,58
	AHR	1,36±0,26	2,72±0,34	2,82±0,47	2,80±0,36
Fsol	S	5,74±0,36	6,18±0,34	5,21±0,39	6,57±0,57
	SR	5,46±0,52	6,51±0,51	4,95±0,39	5,07±0,19
	AH	5,11±0,35	6,29±0,41	3,67±0,26*	3,02±0,10*
	AHR	4,47±0,64	6,43±0,77	5,26±0,23 ξ	5,52±0,26 ξ
Tsağ	S	5,36±0,24	6,23±0,55	5,19±0,50	6,50±0,42
	SR	6,12±0,35	5,77±0,19	5,30±0,35	5,40±0,35
	AH	5,10±0,28	6,75±0,28	3,40±0,28*	3,11±0,19*
	AHR	5,01±0,31	5,59±0,70	4,84±0,39 ξ	5,54±0,49 ξ
Tsol	S	6,76±0,65	6,78±0,57	5,13±0,71	6,22±0,31
	SR	5,51±0,56	5,80±0,46	5,29±0,27	5,96±0,52
	AH	5,68±0,34	6,16±0,51	3,59±0,32*	3,45±0,25*
	AHR	5,21±0,35	5,95±0,28	4,84±0,18 ξ	6,09±0,31 ξ

Olaya ilişkin potansiyel eğrilerinin güç spektrumları incelendiğinde tüm gruplarda alfa ve beta frekans bandlarındaki güç değerlerinin oldukça düşük olduğu dikkati çekmiştir. Bu nedenler analizler delta ve teta frekans bandlarında gerçekleştirilmiştir. Delta ve teta frekans bandlarının güç değerleri 2 (uyarı türü: standart, nadir) x 2 (uyarılar arası süre (ISI): 375 ms, 600 ms) x 4 (deney grupları: S, SR, AH, AHR) Karışık Faktörlü ANOVA (Mixed-Design ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Deney grupları arasında yapılan karşılaştırmada tüm elektrot bölgeleri için uyarı türü ve uyarılar arasındaki süreden bağımsız olarak delta bandı güç değerlerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$) (Tablo 4.8). Benzer şekilde, hem uyarı

türünün ve hem de uyarılar arası sürenin delta bandı gücünü etkilemediği belirlenmiştir ($p > 0.05$).

Karışık Faktörlü ANOVA analizi sol frontal bölgede teta bandı güç değerlerinde gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir ($p > 0.05$) (Tablo 4.8). Sağ frontal ve temporal bölgelerde ise teta gücünde gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Sağ frontal ve temporal bölgelerde uyarı türünün ve ISI'nın teta gücünü anlamlı düzeyde etkilediği saptanmıştır ($p < 0.05$). Ayrıca teta güç değerleri için [uyarı türü x deney grupları] ve [ISI x deney grupları] etkileşimlerinin anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Bu anlamlı etkileşim değerleri farklı uyarı türünün ve ISI değerinin teta gücüne etkisinin deney grubuna bağlı olarak değiştiğini vurgulamaktadır. Ayrıca, teta gücü için uyarı türü ve ISI arasında istatistiksel olarak anlamlı bir etkileşim olduğu saptanmıştır. Bu bulgu uyarı türünün teta gücüne etkisinin belirli bir ISI değerinde daha fazla olduğuna işaret etmektedir. Bu sonuçların daha detaylı analizi için 375 ms ve 600 ms'lik ISI değerlerinde elde edilen teta güç değerleri yinelenen ölçümler ANOVA (Repeated Measure ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Uyarılar arası sürenin 375 ms olduğu OİP'lerde uyarı türünün teta gücüne anlamlı derecede etki ettiği ($p < 0.05$) ancak deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$). Teta gücünün iki eş arasında fark testiyle (Paired T Testi) grup içi karşılaştırmasında tüm gruplarda nadir uyarı cevaplarındaki teta gücünün standart uyarı cevaplarına göre anlamlı düzeyde arttığı izlenmiştir.

Uyarılar arası sürenin 600 ms olduğu OİP'lerde uyarı türünün teta güç değerlerine anlamlı derecede etki ettiği ($p < 0.05$) ve teta güç değerlerinde gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Standart ve nadir uyarı cevapları tek yönlü ANOVA ile incelendiğinde, sağ frontal ve temporal bölgelerde gruplar arasında nadir uyarıyla ilişkili teta gücünde anlamlı bir fark olduğunu bulunmuştur. Bunu takiben yapılan posthoc Tukey testi sonucunda teta güç değerlerinin AH grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Tedavi grubunda teta güç değerinin AH grubuna göre anlamlı derecede arttığı ve SR grubundan farklı olmadığı izlenmiştir. İki eş arasında fark testi (Paired T Testi) AH grubu dışındaki tüm gruplarda nadir uyarı cevaplarındaki teta bandı güç değerlerinin standart uyarı cevaplarındakine göre anlamlı düzeyde yükseldiğini göstermiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4. 8. Sham ve deney grupları güç değerleri (μV^2) (*: $p < 0.05$ Sham grubuna göre fark, $^{\xi}$ $p < 0.05$ AH grubundan fark)

	Gruplar	ISI 375				ISI 600			
		DELTA (μV^2)		TETA (μV^2)		DELTA (μV^2)		TETA (μV^2)	
		Standart	Nadir	Standart	Nadir	Standart	Nadir	Standart	Nadir
Fsağ	S	6,02± 0,98	7,26± 2,76	5,70± 1,09	6,55± 2,45	4,94± 0,48	5,27± 0,75	4,40± 0,41	5,07± 0,47
	SR	7,20± 1,59	7,55± 1,39	5,64± 2,39	6,54± 1,05	7,38± 1,91	6,12± 1,03	4,70± 0,98	5,24± 0,81
	AH	7,06± 1,66	6,54± 1,17	6,00± 0,90	5,02± 0,49	5,38± 1,20	6,54± 2,01	3,90± 0,88	5,28± 1,55
	AHR	7,84± 2,37	5,84± 0,87	7,38± 1,92	6,08± 0,35	7,00± 1,15	7,72± 2,64	6,68± 0,67	7,32± 1,77
Fsol	S	8,93± 2,09	7,83± 2,20	6,69± 0,57	12,83± 1,12 ψ	7,97± 0,70	6,12± 0,48	4,57± 0,50	9,27± 0,32 ψ
	SR	9,04± 2,60	8,08± 1,89	6,74± 0,71	11,42± 0,65 ψ	7,06± 1,82	8,34± 0,86	4,18± 0,39	9,14± 0,27 ψ
	AH	9,53± 2,73	9,14± 1,48	6,14± 0,57	9,89± 0,28 ψ	8,40± 1,23	7,16± 1,68	5,84± 0,46	5,40± 1,33 *
	AHR	9,78± 2,22	8,48± 0,57	6,96± 0,45	9,62± 0,68 ψ	6,92± 0,53	7,82± 3,24	5,46± 0,48	12,10± 1,02 $\psi\xi$
Tsağ	S	7,20± 2,91	10,49± 1,40	7,89± 0,51	10,95± 0,59 ψ	9,87± 1,51	9,91± 0,85	4,90± 0,69	9,55± 0,39 ψ
	SR	9,48± 0,57	10,70± 3,70	7,30± 0,57	12,70± 0,56 ψ	11,74± 2,36	10,02± 2,02	5,16± 0,42	10,05± 0,42 ψ
	AH	9,53± 1,69	10,42± 1,84	6,54± 0,90	9,22± 0,96 ψ	8,30± 1,94	10,73± 2,33	6,62± 0,93	5,32± 0,66 *
	AHR	9,80± 1,36	7,92± 2,27	7,76± 0,32	12,52± 0,86 ψ	10,74± 1,63	9,54± 1,71	6,80± 0,46	11,52± 0,69 $\psi\xi$
Tsol	S	11,51± 1,51	8,07± 1,57	7,14± 0,61	12,09± 0,68 ψ	10,42± 2,69	7,94± 1,28	4,69± 0,46	9,90± 0,47
	SR	12,36± 1,60	13,94± 2,53	8,84± 0,51	13,78± 0,38 ψ	13,66± 2,58	13,54± 3,27	6,48± 0,58	10,40± 0,56 ψ
	AH	12,76± 2,36	10,92± 3,19	7,54± 0,49	12,08± 0,73 ψ	8,09± 1,61	10,15± 1,86	5,96± 1,03	5,92± 0,35 *
	AHR	10,72± 2,68	9,60± 1,86	8,28± 0,38	12,70± 0,59 ψ	8,30± 1,04	7,15± 2,14	5,74± 0,39	11,24± 0,41 $\psi\xi$

Koherens değerlerinin analizinde deney grupları (S, SR, AH, AHR)olgular arası faktör (between subjects), ISI değeri (375 ms, 600 ms), elektrot eşleşmesi (Fsağ-Fsol, Tsağ-Tsol, Fsağ-Tsağ, Fsağ-Tsol, Fsol-Tsağ, Fsol-Tsol), uyarı türü (standart, nadir)de aynı olgu grubu içi(within subjects) faktör olarak kullanıldı. Delta koheransının ANOVA analizi elektrot eşleşmesinin etkisinin anlamlı olduğunu göstermiş, tüm yanıtlarda delta bandında Fsağ-Fsol ve Tsağ-Tsol koherens değerlerinin diğer elektrot eşleşmelerine göre daha yüksek olduğu izlenmiştir. Ayrıca ISI değerinin ve uyarı tütünün delta bandı koherans değerlerine herhangi bir etki göstermediği

bulunmuştur. Delta bandındaki Fsağ-Fsol ve Tsağ-Tsol koherens değerlerinde gruplar arasında anlamlı bir farkın olmadığı belirlenmiştir (Tablo 4.9).

Tablo 4. 9. Sham ve deney grupları delta bandı koherans değerleri (z-değeri)

	Gruplar	Fsağ-Fsol	Tsağ-Tsol	Fsağ-Tsağ	Fsağ-Tsol	Fsol-Tsağ	Fsol-Tsol
ISI375 standart	S	0,859± 0,013	0,666± 0,023	0,165± 0,030	0,116± 0,015	0,119± 0,008	0,116± 0,015
	SR	0,825± 0,013	0,655± 0,050	0,145± 0,019	0,148± 0,028	0,146± 0,016	0,156± 0,027
	AH	0,761± 0,028	0,626± 0,020	0,168± 0,015	0,100± 0,011	0,155± 0,022	0,16± 0,019
	AHR	0,823± 0,036	0,614± 0,062	0,206± 0,028	0,189± 0,021	0,195± 0,022	0,196± 0,036
ISI375 nadir	S	0,860± 0,024	0,670± 0,023	0,206± 0,040	0,175± 0,017	0,216± 0,016	0,181± 0,022
	SR	0,823± 0,042	0,599± 0,032	0,145± 0,012	0,214± 0,074	0,201± 0,027	0,225± 0,069
	AH	0,744± 0,033	0,663± 0,036	0,201± 0,026	0,184± 0,015	0,329± 0,042	0,244± 0,061
	AHR	0,808± 0,042	0,50± 0,034	0,173± 0,049	0,123± 0,012	0,206± 0,054	0,140± 0,020
ISI600 standart	S	0,844± 0,019	0,676± 0,028	0,158± 0,025	0,199± 0,038	0,191± 0,047	0,163± 0,028
	SR	0,843± 0,021	0,695± 0,033	0,144± 0,011	0,23± 0,030	0,224± 0,030	0,330± 0,053
	AH	0,800± 0,022	0,699± 0,032	0,184± 0,031	0,150± 0,046	0,254± 0,080	0,206± 0,065
	AHR	0,849± 0,040	0,676± 0,032	0,455± 0,103	0,300± 0,055	0,419± 0,105	0,353± 0,074
ISI600 nadir	S	0,825± 0,029	0,699± 0,042	0,276± 0,091	0,161± 0,027	0,224± 0,022	0,161± 0,048
	SR	0,809± 0,036	0,724± 0,030	0,194± 0,018	0,270± 0,065	0,205± 0,018	0,266± 0,071
	AH	0,843± 0,030	0,718± 0,025	0,284± 0,043	0,176± 0,016	0,306± 0,053	0,210± 0,024
	AHR	0,829± 0,030	0,678± 0,019	0,255± 0,074	0,220± 0,054	0,191± 0,020	0,228± 0,060

Teta koheransının ANOVA analizi elektrot eşleşmesinin etkisinin anlamlı olduğubulunmuş, tüm yanıtlarda teta bandında Fsağ-Fsol ve Tsağ-Tsol koherens değerlerinin diğer elektrot eşleşmelerine göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. İlâveten, ısı değerinin delta bandı koherans değerlerine herhangi bir etkisinin olmadığı saptanmıştır. Teta bandındaki Tsağ-Tsol koherens değerlerinde gruplar arasında anlamlı bir farkı olduğu ve grup x uyarı türü etkileşiminin anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Posthoc analizlerde her iki ISI değerinde nadir uyarıya cevap olarak ortaya çıkan Tsağ-Tsol elektrotları arasındaki teta bandı koherans değerlerinin AH gruplarında diğer gruplara göre anlamlı derecede azaldığı bulunmuştur. AHR

grubunda ise bu azalışın olmadığı ve koherens değerlerinin S grubu seviyesinde olduğu dikkati çekmektedir (Tablo 4.10).

Tablo 4. 10. Sham ve deney grupları teta bandı koherans değerleri (z-değeri) (*: p<0.05 Sham grubuna göre fark, ^ξ p < 0.05 AH grubundan fark)

	Gruplar	Fsağ-Fsol	Tsağ-Tsol	Fsağ-Tsağ	Fsağ-Tsol	Fsol-Tsağ	Fsol-Tsol
ISI375 standart	S	0,766± 0,028	0,618± 0,029	0,111± 0,013	0,085± 0,009	0,090± 0,008	0,084± 0,007
	SR	0,773± 0,023	0,616± 0,021	0,299± 0,098	0,125± 0,017	0,165± 0,026	0,150± 0,035
	AH	0,754± 0,021	0,624± 0,035	0,174± 0,022	0,118± 0,010	0,229± 0,017	0,166± 0,013
	AHR	0,746± 0,049	0,528± 0,043	0,194± 0,043	0,200± 0,010	0,240± 0,080	0,171± 0,017
ISI375 nadir	S	0,760± 0,015	0,596± 0,017	0,194± 0,029	0,132± 0,009	0,181± 0,023	0,143± 0,012
	SR	0,808± 0,033	0,616± 0,021	0,169± 0,020	0,180± 0,012	0,154± 0,015	0,166± 0,016
	AH	0,776± 0,022	0,318± 0,026 *	0,115± 0,026	0,170± 0,033	0,114± 0,010	0,171± 0,049
	AHR	0,684± 0,032	0,645± 0,021 ^ξ	0,164± 0,017	0,148± 0,017	0,230± 0,019	0,205± 0,013
ISI600 standart	S	0,790± 0,042	0,646± 0,024	0,249± 0,104	0,151± 0,022	0,239± 0,082	0,190± 0,025
	SR	0,764± 0,018	0,556± 0,027	0,174± 0,028	0,162± 0,011	0,184± 0,023	0,183± 0,014
	AH	0,786± 0,030	0,624± 0,028	0,143± 0,042	0,103± 0,014	0,103± 0,021	0,141± 0,031
	AHR	0,808± 0,025	0,669± 0,029	0,168± 0,033	0,115± 0,015	0,111± 0,013	0,168± 0,028
ISI600 nadir	S	0,815± 0,023	0,701± 0,025	0,278± 0,052	0,130± 0,009	0,251± 0,045	0,218± 0,031
	SR	0,828± 0,021	0,713± 0,037	0,405± 0,096	0,413± 0,073	0,358± 0,066	0,304± 0,084
	AH	0,809± 0,012	0,292± 0,015 *	0,248± 0,034	0,190± 0,029	0,206± 0,027	0,207± 0,026
	AHR	0,813± 0,021	0,630± 0,027 ^ξ	0,134± 0,014	0,080± 0,030	0,080± 0,017	0,085± 0,026

TARTIŞMA

En yaygın nörodejeneratif hastalıklardan biri olan Alzheimer hastalığı yaşlı bireylerde görülen bunama vakalarının %80'ini teşkil etmektedir[320]. Alzheimer hastalığı histopatolojik olarak hücre dışında biriken amiloid plaklar ve hücre içinde gözlenen nörofibriler yumaklar (NFT) ile karakterize edilmektedir[2]. Amiloid plaklar A β peptidlerinin polimerize olarak fibriller şeklinde β -sheet formunda birikiminden oluşmaktadır. Daha önceki araştırmalarda A β peptidlerinin ya doğrudan hücre yüzeyindeki fonksiyonel protein kompleksleriyle etkileşerek ya da dolaylı olarak astrosit ve mikroglia aktivasyonu ile normal fizyolojik süreçleri bozarak nörodejeneratif değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir[6]. Projemizde A β 42 peptidinin oksidatif stres düzeyine, antioksidan sisteme ve kolinerjik nöronlara etkilerinin incelenmesinin yanı sıra bu etkiler ile işitsel OİP'ler arasında bir ilişki olup olmadığının belirlenmesiyle hastalığın mekanizmasına ilişkin yeni bilgilerin ortaya konması hedeflenmektedir. Ayrıca, A β 42'nin tetiklediği kolinerjik sistem, oksidatif stres ve OİP değişikliklerinde RA'nın terapötik rolü elektrofizyolojik, biyokimyasal ve histolojik parametreler yardımıyla aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Yapılan çalışmalarda amiloid plaklar ve NFT patolojisinin yanı sıra beyinde artan aşırı miktardaki oksidatif stresin de hastalığın önemli karakteristiği olduğunu gösteren birçok kanıt elde edilmiştir. Alzheimer hastalığındaki temel ROS kaynaklarından birinin lezyonlardaki A β peptidi olduğu bildirilmiştir. Alzheimer hastalarında yapılan histopatolojik çalışmalar sonucu özellikle temporal korteksde A β peptidlerinin direkt olarak etkilediği membranlarda artan lipid peroksidasyonun izleri belirlenmiştir[15][16]. Bunun yanı sıra, A β 40 ve A β 42 peptidlerinin çeşitli membran reseptörleri aracılığıyla hücre içi sinyal yollarını tetikleyerek lipid peroksidasyona yol açtığı gösterilmiştir[321]. Amiloid β 'nin indüklediği lipid peroksidasyonun arttırdığı 4-HNE metabolitlerinin önemli membran proteinlerinin fonksiyonlarını ve Ca⁺²homeostazisini bozarak ROS artışına ve nöronal hasara yol açtığı bulunmuştur [17]. Ayrıca, oksidatif süreçler kümelenme özelliği olmayan A β 'yı kümeleşen A β 'ya çevirirken, A β 'nin kendisi de serbest radikal üretimini arttırmakta böylece patolojik bir döngü ortaya çıkmaktadır[322]. Diğer yandan daha önceki A β peptidi ile ilgili çalışmalar, A β 'nin üç formundan (A β 40, A β 42, A β 25-35) özellikle A β 42'nin daha toksik olduğunu ifade etmişlerdir[323]. Bu bulgular göz önünde bulundurularak çalışmamızda A β 42 peptidinin lipid peroksidasyon düzeyine etkisi incelenmiştir. Nitekim, A β 42 peptidinin introserebroventriküler olarak uygulandığı hayvanlarda lipid peroksidasyon göstergesi olan TBARS ve 4-HNE seviyelerinin sham grubundaki hayvanlara göre anlamlı şekilde arttığı görülmüştür. Bu sonucumuz ile Alzheimer hastalarının beyin lipid peroksidasyon düzeylerinin önemli ölçüde arttığını gösteren çalışmaların aynı paralellik içinde olması AH ile ilişkili moleküler süreçlerde

A β 42 kaynaklı lipid peroksidasyonun önemli bir faktör olduğu görüşünü destekler niteliktedir.

Son yıllarda oksidan hasarın AH patogenezisindeki çok yönlü etkilerine işaret eden çalışmalar ışığında vitamin E, C ve lipoik asit gibi antioksidanların yardımcı terapötik ajan olarak kullanılmasının nöronal hasarı azaltabileceği düşüncesi üzerinde durulmaktadır. Bu bağlamda gerçekleştirilen çalışmalarda kurkumin ve ginko biloba gibi bitkisel bileşiklerin, Vitamin E ve lipoik asit gibi diğer bazı antioksidanların serbest radikal düzeyini etkileyerek oksidan hasarı önleyip A β toksisitesini ve nöronal hasarı azalttığı, bunun yanı sıra bazı antioksidanların A β kümelenmesini durdurarak koruma sağladığı saptanmıştır[223, 226, 227]. Ayrıca, klinik uygulamalarda Ginko biloba ve Vitamin E'nin serbest radikal düzeyini azaltıp hastalığın ilerleyişini yavaşlattığı gösterilmiştir [224, 324]. Bu konuda literatürde yer alan olumlu sonuçlara rağmen antioksidanların hastalardaki etkinliği ve kullanımı halen tartışmalıdır. Belirli bir antioksidanın uzun süreli kullanımı neticesinde molekülün pro-oksidan özellik göstererek toksik etkileri olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle hastalığı yavaşlatan yeni ilaçların geliştirilmesi için faydalı etkileri olan toksisitesi düşük multiaktif bileşiklere odaklanılmıştır. Birçok biyolojik aktiviteye sahip olan RA'nın antioksidan özellikleri çeşitli deney sistemlerinde in vivo ve in-vitro olarak ortaya konulmuştur [57, 58, 245]. Alzheimer hastalığına etkisini ölçmeye yönelik bir hücre kültürü çalışmasında RA'nın PC12 hücre kültüründe A β peptidinin indüklediği reaktif oksijen türlerinin oluşmasını, lipid peroksidasyonu, DNA fragmentasyonunu, kaspaz 3 aktivasyonunu ve tau proteininin hiperfosforilasyonunu azalttığı gösterilmiştir [58]. Ayrıca RA'nın A β 25-35 enjekte edilen sıçanlarda artan MDA ve peroksinitrit miktarını düşürerek oksidatif strese karşı koruma sağladığı tespit edilmiştir[245]. Projemizde RA'nın A β 42 indüklü lipid peroksidasyon artışına etkisi MDA ve 4-HNE düzeyleri ölçülerek değerlendirilmiştir. Elde edilen verilerimiz incelendiğinde, RA uygulanan AHR grubunda lipid peroksidasyonun sham grubu ile aynı seviyeye düştüğü belirlenmiştir. Daha önceki çalışmalarla uyum içinde olan bu sonucumuz RA'nın invivo koşullarda lipid peroksidasyonu azaltarak membran yapısının ve fonksiyonlarının korunmasına yardımcı olabileceğini ve 4-HNE'ye bağlı protein modifikasyonlarını önleyebileceğini ortaya koymuştur.

Oksidatif stresin, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma arasındaki dengenin serbest radikaller yönünde değişmesi sonucu ortaya çıktığı göz önüne alındığında, AH'de antioksidan savunma sisteminin etkilenmesi beklenen bir olgudur. Vücudumuzda yer alan en önemli antioksidanların SOD, GSH-Px, CAT ve GSH olduğu bilinmektedir. Projemizde A β 42 peptidinin antioksidan enzim aktiviteleri üzerindeki etkisini ortaya koyabilmek için SOD, CAT GSH-Px gibi antioksidan enzim aktiviteleri ve GSH seviyesi ölçülmüştür. Sonuçlar incelendiğinde SOD, GSH-Px ve CAT aktivitelerinin ve GSH miktarının sham gruba göre AH grubunda azaldığı gözlenmiştir. Literatürde Alzheimer hastalarında yapılan değerlendirmelerde antioksidan enzim aktiviteleri ile ilişkili çelişkili sonuçlar elde edildiği dikkati çekmektedir. Postmortem incelemelerde AH'de belirli beyin bölgelerinde SOD ve CAT aktivitelerinin hem azaldığını hem de arttığını gösteren

yayınlar bulunmaktadır[23, 24]. Diğer yandan, Alzheimer hastalarında GSH-Px aktivitelerinin yükseldiği ya da değişmediğini gösteren çalışmalar mevcuttur[23, 25]. Bu çelişkili sonuçların ölçüm tekniklerindeki farklılıklardan ve hastalıkla ilişkili moleküler değişimlerin dinamik doğasından kaynaklanması muhtemeldir. Hayvanlarda gerçekleştirilen çalışmalarda A β peptidinin SOD ve katalaz enzimlerinin aktivitelerini inhibe ettiği ve A β 42'nin ventriküler enjeksiyonunun hipokampus, parietal korteks ve piriform korteks alanlarında GSH miktarını ve GSH-Px ekspresyonunu azalttığı belirlenmiştir [27, 28]. AH grubunda SOD, CAT, GSH-Px aktivitelerinde ve GSH miktarında gözlenen azalma bu yayınlarla uygunluk içerisindedir. Bu bulgular doğrultusunda A β 42 peptidinin oksidan etkilerinin yanı sıra antioksidan savunma sistemini zayıflatarak da oksidan hasarı şiddetlendirdiği sonucuna varılmıştır.

Daha önceki yayınlarda AH'de azalan antioksidan enzim aktivitelerini ve GSH miktarının arttırmaya yönelik ajanların hastalıkta oksidatif yöne kayan redoks dengesini düzenleyerek koruyucu etki gösterebileceği ifade edilmiştir [146][147]. Literatürde RA içeren bitki ekstraktlarının SOD ve CAT aktivitelerini arttırarak H₂O₂ toksisitesine ve GSH ve SOD ekspresyonunu arttırarak oksidan hasara karşı koruma sağladığı invitro olarak gösterilmiştir[325, 326]. Ayrıca sıçanlarda gerçekleştirilen çalışmalarda RA'nın karaciğer dokusunda sepsise ve yaşlanmaya bağlı olarak azalan SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerini arttırdığı belirlenmiştir[327]. Diğer yandan, RA'nın A β 'nin beyin dokusundaki indüklediği antioksidan sistem değişimlerine etkisine dair herhangi bir invivo çalışma bulunmamaktadır. Bu doğrultuda projemizde RA'nın antioksidan enzim düzeylerine ve GSH miktarına etkisi incelenmiştir. Rosmarinik asit ile tedavi uygulanan AHR grubunda antioksidan enzim aktivitelerinin ve GSH seviyesinin AH grubuna göre anlamlı şekilde arttığı görülmüştür. AHR grubundaki CAT ve GSH-Px aktivitelerinin S ve SR gruplarına göre daha yüksek olduğu, GSH miktarının ise sham seviyesine ulaşmadığı dikkati çekmektedir. Bu bulgular ışığında RA'nın antioksidan sistemde meydana gelen A β indüklü değişikliklerin önüne geçebileceği ve oksidan hasarı azaltmasına ilaveten antioksidan kapasiteyi arttırarak da koruyucu etki gösterebileceği ortaya konmuştur. Rosmarinik asitin bu etkisinde NF-E2 transkripsiyon faktörünün aktivasyonuna bağlı olarak artan antioksidan enzim mRNA düzeylerinin rol alabileceği düşünülmektedir[328]. Ancak A β indüklü toksisitede RA'nın bu sinyal yolağına bağlı nörokoruyucu etkisinin aydınlatılması için ileride planlanacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Alzheimer hastalığına yol açan patofizyolojik mekanizmalardan birinin kolinerjik nöron kaybı ve buna bağlı gelişen kolinerjik ileti bozukluğunu olduğu öne sürülmektedir [29]. Alzheimer hastalarında yapılan otopsi incelemelerinde bazal ön beyindeki kolinerjik nöron kaybının %75'i geçtiği tespit edilmiştir. Bu nöron kaybı serebral korteks alanlarında ve hipokampusda ChAT enziminde belirlenen azalma ile de teyit edilmiştir [29, 30]. Bunun yanısıra, A β peptidinin normal fizyolojik konsantrasyonlarda nörotoksik etki göstermeksizin ACh salınımını ve sentezini azaltarak kolinerjik fonksiyonları modüle ettiği gösterilmiştir[329]. Ancak, invivo ve invitro çalışmalarda yüksek konsantrasyonlarda A β peptidinin ACh seviyesini ve AChE/ChAT aktivitelerini azalttığı ve uzun vadede kolinerjik nöronlara toksik etki

gösterdiği belirlenmiştir[34, 35]. Çalışmamızda, A β uygulanan grupta ACh seviyesinin ve AChE aktivitesinin sham gruba göre anlamlı düzeyde azaldığı saptanmıştır. Bu sonucumuz AH'de gözlenen kolinerjik hipofonksiyonda A β indüklü değişimlerin önemli bir faktör olduğunu gösteren yayınlarla aynı paralelliktedir.

Kolinerjik hasar AH'te tek başına nedensel bir role sahip olmamakla birlikte, kolinerjik fonksiyonlardaki azalma diğer patolojik değişimleri fasilite edip, nörokoruyucu mekanizmaları zayıflatarak hastalığın patofizyolojisinde ve gözlenen kognitif bozuklukta rol almaktadır[118, 119]. Ayrıca kolinerjik anomalilerin davranış ve bilişsel fonksiyonların yanı sıra A β birikiminde de rol oynayabileceği belirtilmiştir[330]. Bu nedenle kolinerjik terapi yaklaşımları halen geçerliliğini korumaktadır. Literatürde RA'nın kolinerjik sisteme etkisini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Hücre kültüründe ve diabetik sıçanlarda gerçekleştirilen çalışmalarda RA'nın AChE aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiş, bu mekanizma aracılığıyla ACh miktarını arttırarak azalan kolinerjik iletiyi düzeltebileceği öne sürülmüştür[331]. Diğer yandan, RA'nın ACh seviyesini ve AChE aktivitesini arttırarak kolinerjik fonksiyonları iyileştirdiği ve ERK/MAPK sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla AChE aktivasyonunu ve dopamin, serotonin, ACh seviyesini arttırdığını gösteren çalışmalar da dikkati çekmektedir[59, 60]. Bu çelişkili sonuçlar dikkate alınarak projemizde RA'nın A β indüklü kolinerjik değişimlere etkisinin aydınlatılması ve AH hastalığındaki kolinerjik hasarı önleyici potansiyelinin ortaya konması amaçlanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde RA ile iki hafta boyunca tedavi uygulanan AHR grubunda ACh seviyesinin ve AChE aktivitesinin AH grubuna göre anlamlı şekilde artarak sham seviyesine ulaştığı tespit edilmiştir. Bu sonucumuz RA uygulaması neticesinde ACh seviyesinin ve AChE aktivitesinin arttığını bildiren yayınlarla uygunluk içerisindedir. Bu bulgular ışığında RA'nın AH'da gözlenen kolinerjik hipofonksiyonun önüne geçebileceği ortaya konmuştur. Böylece RA'nın antioksidan özelliğine ilaveten ACh salınımını arttırmak yoluyla da AH tedavisinde fayda sağlayabileceği şeklindeki hipotezimiz desteklenmiştir. Rosmarinik asitin bu etkisinin altında yatan mekanizmanın nörotrofik etkileri olan ERK sinyal yolağının aktivasyonu ile ACh seviyesinin ve AChE enzim düzeyinin artarak kolinerjik sistemin fasilitasyonu olduğu düşünülebilir. Ancak RA'nın AChE'ye etki mekanizmasının ve olası doz-süre bağımlı etkilerin tam olarak aydınlatılabilmesi için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısına varılmıştır.

Çalışmamızda hipokampus ve işitsel korteksdeki A β birikimi ve buna bağlı ortaya çıkan histolojik değişiklikler immünohistokimyasal metotla incelenmiştir. Yapılan immünohistokimyasal inceleme sonucu S ve SR gruplarında hipokampus ve işitsel korteksde eser miktarda A β pozitif hücreye rastlanırken AH grubunda ekstraselüler bölgede ve özellikle nöronal membran çevresinde yoğun A β immüno lokalizasyonu dikkat çekmiştir. AHR grubunda ise AH grubuna kıyasla A β immünreaksiyonun oldukça azaldığı görülmüştür. Yakın zamanda gerçekleştirilen çalışmalarda RA'nın fibriller A β fA β 'ya bağlanarak fA β 'daki A β moleküllerinin β -sheet konformasyonunu destabilize ettiği, AD transjenik farelerde RA uygulamasının A β birikimlerini azalttığı gözlenmiş, bu polifenolün anti-amiloidojenik özelliğine vurgu yapılmıştır[56, 57]. Bu bulgularla uyumlu olan sonucumuz RA'nın terapötik

etkisinin antioksidan ve kolinerjik özelliklerine ilaveten anti-amiloidojenik etkisine de bağlı olabileceğini göstermektedir.

Alzheimer hastalığında özellikle A β birikimlerinin çevresindeki reaktif astrositlerin varlığı dikkati çekmektedir. Amiloid β , pro-inflammatuar faktörler ve oksidatif stres ile tetiklenen ve astroglisis diye isimlendirilen bu aşırı aktivasyonun astrositlerdeki Ca homeostazisini bozarak ve astrositlerden çeşitli nörotoksik moleküller salınmasına neden olarak dejeneratif değişiklikleri fasilite ettiği bilinmektedir[9]. Reaktif astroglisis astrositlere özgü ara filament proteinlerinden birisi olan glial fibriler asidik proteininin (GFAP) ekspresyonunda artışa yol açtığından GFAP ekspresyonu astroglisis belirteci olarak kullanılmaktadır. Yapılan immünohistokimyasal incelemede AH grubunda hipokampüs ve işitsel korteksde GFAP boyanmasının belirgin olarak arttığı izlenmiştir. Bu sonuç A β peptidinin reaktif astroglisis'i tetiklediğini ifade eden yayınları teyit etmektedir. AHR grubunda ise GFAP boyanmasının AH grubuna göre azalması RA uygulamasının olumlu yanıt verdiğini ve A β indüklü dejeneratif değişikliklerin azaldığını göstermektedir.

Çalışmamızda A β peptidinin sensöri işlemlere etkisini incelemek amacıyla iki farklı 'oddball' paradigma uygulanarak sıçanların frontal ve temporal korteks alanlarından işitsel OİP'ler kaydedilmiştir. Yapılan analizlerde OİP'lerin pik latensleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır. Bu bulgular işitsel sensöri işlemlerdeki ileti hızının A β peptidinin veya RA uygulamasından etkilenmediğini göstermektedir. Nitekim, literatürde yer alan çeşitli yayınlarda Alzheimer hastalarında gerçekleştirilmiş UP ve OİP çalışmalarında işitsel ya da görsel sensöri bileşenlerin latenslerinin değişmediği belirtilmektedir[249]. Uyarılar arasındaki sürenin 375 ms olduğu paradigmada kaydedilen OİP'lerde tepeden tepeye genlik değerleri incelendiğinde P1N1, N1P2 ve P2N2 yanıtlarında gruplar arasında anlamlı fark olmadığı belirlenmiştir. Yapılan araştırmalarda P1-N1 bileşenlerinin erken duyuşal işlevleri ve uyarının fiziksel özelliklerini (şiddet, frekans, spektral ve temporal özelliklerini) yansıttığı, P2-N2 yanıtlarının ise daha üst düzey sensöri işlevlerle ilişkili olduğu ifade edilmektedir[332]. Bu bilgiler ışığında sonuçlarımız A β indüklü biyokimyasal ve yapısal değişimlerin kısa ISI değerlerinde işitsel sensöri fonksiyonları etkilemediğini göstermektedir. Ayrıca grup içi karşılaştırmalarında tüm gruplarda sağ frontal ve temporal bölgelerde N1P2 nadir uyarı yanıtlarının standart uyarı yanıtlarına göre daha düşük genlikte, P2N2 nadir uyarı yanıtlarının ise standart uyarı yanıtlarına göre daha yüksek genlikte olduğu dikkati çekmiştir. Bu sonucumuz nadir uyarının geç sensöri bileşenlerinde dalga morfolojisini negatife kaydırıldığını göstermektedir. Bununla birlikte bu bölgelerden elde edilen fark eğrilerinde ölçülen MMN yanıtlarında da gruplar arasında anlamlı bir değişim olmadığı bulunmuştur. Bu bulgularımız Alzheimer hastalarında kısa ISI değerlerinde işitsel ayırım ve kısa süreli hafıza işlemlerinin etkilenmediğini gösteren çalışmaları destekler niteliktedir[333, 334]. Sol frontal bölgeden elde edilen OİP'lerde ise standart ve nadir uyarı cevapları arasında anlamlı bir farkın olmadığı ve bu bölgede MMN yanıtının gözlenmediği belirlenmiştir. Bu sonuç MMN oluşumunda sağ frontal hemisfer lateralizasyonu olduğunu gösteren dinamik nedensel modelleme çalışmalarını[286] teyit

etmektedir. Oddball paradigmasında uyarılar arasındaki sürenin 600 ms değerinde çıkarıldığı OİP yanıtlarının tepeden tepeye genlik değerleri incelendiğinde standart uyarı yanıtlarında gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Nadir uyarı yanıtları incelendiğinde sağ frontal ve temporal bölgelerde sham grupta belirlenen N1P2 değerindeki azalmanın ve P2N2 değerindeki artışın AH grubunda gözlenmediği saptanmıştır. Ayrıca, grup içi karşılaştırmalarında diğer gruplarda gözlenen nadir uyarı yanıtlarındaki değişimin AH grubunda gerçekleşmediği dikkati çekmiştir. Bu bulgu ile uyumlu olacak şekilde bu bölgelerden elde edilen MMN yanıtlarının AH grubunda sham gruba göre önemli derecede azaldığı bulunmuştur. Alzheimer hastalarında uzun ISI değerlerinde MMN yanıtlarının ortadan kalktığını gösteren bulgularla [308] uyum içinde olan bu sonucumuz Aβ peptidinin işitsel ayırım ve ekoik hafızayla ilişkili süreçleri etkilediğine işaret etmektedir.

Bilişsel işlemlerin temelini nöronal osilasyonların oluşturduğu ve OİP'lerin nöronal osilasyonların bütünleşik etkisini yansıttığı bilinmektedir. Yakın tarihte yapılan çalışmalarda teta osilasyonlarının MMN oluşumunda etkili olduğu saptanmış, nadir uyarının meydana getirdiği MMN dalga formunun spektral genliğinin 3-5 Hz aralığında pik yaptığı gösterilmiştir [287]. Projemizde nadir uyarı cevaplarının teta osilasyonlarının spektral güç yoğunluğu incelendiğinde sağ frontal ve temporal bölgede nadir uyarı için elde edilen OİP'lerin teta güç değerlerinin arttığı izlenmektedir. Bu bulgu nadir uyarıyla ilişkili işlemlerde ve MMN aktivitesinde teta osilasyonlarının önemini gösteren çalışmaları destekler niteliktedir. AH grubunda 600 ms ISI değerindeki nadir uyarı yanıtlarında sağ frontal ve temporal teta gücünün diğer gruplara göre anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Bu sonucumuz AH grubunda azalan MMN genliğini gösteren bulgumuz ile uygunluk içerisindedir. Dolayısıyla, AH grubundaki moleküler değişiklerin OİP'lerin altında yatan osilatör dinamikleri etkilediği bulunmuştur. Bu sonuçlar MMN'nin tahmine dayalı kodlama teorisi çerçevesinde değerlendirildiğinde Aβ indüklü değişimlerin uzun ISI değerinde hiyerarşik seviyeler arasındaki plastisiteyi ve işitsel korteksdeki lokal adaptasyon mekanizmasını bozduğunu göstermektedir. Uzun ISI değerlerinde Alzheimer hastalarında MMN yanıtlarının azaldığını gösteren yayınlarla aynı paralellikte olan bu bulgumuz Aβ peptidinin ekoik hafıza süresindeki azalmada rol oynadığına işaret etmektedir. Alzheimer hastalarında fonksiyonel kortiko-kortikal bağlantılardaki değişimi inceleyen çalışmalarda genel olarak spontan EEG kayıtlarında inter ve intra hemisferik koherans değerlerinin delta, teta ve alfa frekans bandlarında azaldığı belirlenmiştir [335, 336]. Uyarılmış koherans değerlerinin incelendiği az sayıdaki çalışmalarda ise görsel UP kayıtlarında inter ve intra hemisferik alfa ve teta koherans değerlerinin azaldığı [41], görsel OİP kayıtlarında da frontal bölgelerde (F7-F8) ve fronta-parietal (F3-P3) bölgelerdeki teta bandı koherans değerlerinin sağlıklı kontrollere göre düştüğü bulunmuştur [257]. Fizyolojik perspektiften bakıldığında azalan interhemisferik koheransın bu bölgelerde gerçekleşen paralel işlemler arasındaki senkronizasyonun bozulmasıyla, intrahemisferik koherans değerlerindeki azalmanın ise bu nöral ağda yer alan hipokampus gibi başka bir yapının senkronizasyonundaki azalmayla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Projemizde Aβ peptidinin uyarılmış koherans değerlerine etkisi incelenmiştir. Olaya ilişkin yanıtlarda delta ve teta bandındaki

koherans değerleri incelendiğinde, tüm gruplarda Fsağ-Fsol ve Tsağ-Tsol elektrot eğleşmelerinde yüksek koherans değerleri dikkati çekmektedir. Bu elektrot eğleşmelerinde delta bandın koherans değerleri için gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Teta bandında ise AH grubunda temporal korteksdeki nadir uyarı cevaplarındaki interhemisferik koherans değerlerinde diğer gruplara göre anlamlı bir düşüş olduğu saptanmıştır. Alzheimer hastalarında interhemisferik uyarılmış koherans değerlerindeki azalma ile uyumlu olan bu sonuç Aβ peptidi birikiminin oddball paradigmasıyla ilişkili paralel işlemlerdeki senkronizasyonu bozduğunu göstermektedir.

Rosmarinik asit uygulanan tedavi grubundaki OİP yanıtları incelendiğinde, AH grubunda 600 ms ISI değerinde azalan N1P2 ve P2N2 nadir uyarı yanıtlarının anlamlı derecede artarak sham grup düzeyine çıktığı dikkati çekmiştir. Buna paralel olarak, AH grubunda 600 ms ISI değerinde kaybolan MMN yanıtlarının ve azalan nadir uyarıdaki teta gücünün AHR grubunda düzeldiği ve sham grup düzeyine çıktığı izlenmiştir. Ayrıca AHR grubunda nadir uyarı yanıtlarında temporal korteksdeki teta bandı koherans değerinin AH grubuna göre anlamlı derecede artarak kontrol seviyesine geldiği görülmüştür. Bu sonuçlar RA'nın AH grubunda bozulan işitsel ayırım ve hafıza fonksiyonunu düzelttiğini göstermektedir. Literatürde kolinerjik iletinin sensöri kapılama, işitsel ayırım ve ekoik hafıza gibi işitsel sensöri işlemlerdeki modülatör rolüne işaret eden pek çok çalışma bulunmaktadır[337, 338]. Bu alışmalar ışığında AHR grubunun OİP parametrelerinde gözlenen bu değişikliklerde RA uygulamasıyla artan kolinerjik fonksiyonların rol oynayabileceğini düşünmekteyiz. Buna ilaveten RA'nın belirlenen antioksidan etkisinin de oksidatif süreçleri önleyerek bozulan sensöri iletiyi düzeltebileceği gözönünde bulundurulmalıdır.

Böylece, projemizde AH patogenezisinde rol alan Aβ42 peptidinin oksidatif stres düzeyine, antioksidan savunma sistemine ve kolinerjik sisteme etkileri ortaya konmuştur. Ayrıca Aβ42 peptidinin OİP bileşenlerinde ve osilasyonlarda indüklediği değişimler belirlenerek, bu peptidinin sensöri fonksiyonlarla ilişkili nöronal ağlardaki dinamik süreçlere etkisine ışık tutulmuştur. Alzheimer hastalığının multifaktöriyel doğası ve sınırlı tedavi seçenekleri düşünüldüğünde, çoklu biyolojik aktiviteye sahip bileşiklerin terapotik etkinliklerinin anlaşılması oldukça önemlidir. Bu bakımdan RA'nın Aβ indüklü bazı patolojik değişikliklere ve bu bağlamda işitsel OİP'lere etkisi belirlenmiştir. Diğer yandan projemizde Aβ indüklü patolojik değişikliklerin sadece belirli bir kısmının incelendiği ve gözlenen OİP değişikliklerinde farklı nörotransmitter sistemlerinin de etkisinin olabileceği gözardı edilmemelidir. Bununla birlikte, çalışmamız bu konuda planlanacak ileriki çalışmalara basamak oluşturması yanı sıra, literatüre yeni ve önemli bilgiler katmıştır.

SONUÇLAR

Projemizin sonuçları şöylece özetlenebilir;

1. A β 42 peptidinin beyin dokusunda lipid peroksidasyon düzeyini arttırdığını, kolinerjik sistemi baskıladığı ve histopatolojik değişimlere yol açtığını gösteren çalışmalar desteklenirken A β 42 toksisitesinin genel olarak antioksidan kapasiteyi azalttığı bulunmuştur.
2. OİP'lerin değerlendirilmesi sonucunda genel olarak A β 42'nin işitsel algı fonksiyonlarını etkilemezken sensöri hafızayı etkilediği saptanmıştır. Dikkat öncesi işitsel ayırım süreçleriyle ilişkili nöronal ağdaki teta osilasyon yanıtlarında A β 'ya bağlı değişimler olduğu dikkati çekmiştir.
3. Rosmarinik asit uygulanan tedavi grubunda lipid peroksidasyonun azaldığı, antioksidan sistemin aktivasyonunun ve kolinerjik belirteçlerin arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca otomatik işitsel ayırım fonksiyonuyla ilişkili olarak OİP'lerin genlik değerlerinde ve teta yanıtlarında gözlenen A β indüklü değişikliklerin düzeldiği izlenmiştir. Bu sonucumuz RA'nın A β peptidiyle ilişkili fonksiyonel değişimleri antioksidan hasarı önleyip kolinerjik aktiviteyi modüle ederek düzeltebileceğini ve beynin kognitif hedeflere yanıtını arttırmada etkili olabileceğini göstermektedir.
4. A β 'nın birçok moleküler süreci ve nörotransmitteri etkilediği dikkate alınarak OİP genliklerindeki ve teta osilasyonlarındaki değişikliklerin sadece oksidatif stres ve kolinerjik nedenlere bağlı olduğunu öne sürmek zor gözükmektedir. Ayrıca, RA'nın koruyucu etkilerinde farklı mekanizmalarında rol alabileceğini gözönünde bulundurmak gereklidir. Yine de A β indüklü moleküler ve elektrofizyolojik değişimlere RA'nın etkisinin incelenmesi, bu bileşiğin AH'de gözlenen moleküler ve kognitif değişiklikler üzerine terapötik potansiyelinin anlaşılmasında farklı bir perspektif sağlayabilir.

KAYNAKLAR

1. Anand R, Gill KD, Mahdi AA: Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology* 2014, 76:27-50.
2. Ramirez-Bermudez J: Alzheimer's disease: critical notes on the history of a medical concept. *Archives of medical research* 2012, 43(8):595-599.
3. Braak H, Del Tredici K: Neuroanatomy and Pathology of Sporadic Alzheimer's Disease Introduction. *Adv Anat Embryol Cel* 2015, 215:3-14.
4. Kumar A, Dogra S: Neuropathology and therapeutic management of Alzheimer's disease - an update. *Drug Future* 2008, 33(5):433-446.
5. Kurz A, Pernecky R: Novel insights for the treatment of Alzheimer's disease. *Prog Neuro-Psychoph* 2011, 35(2):373-379.
6. Karran E, Mercken M, De Strooper B: The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2011, 10(9):698-U1600.
7. Harris ME, Carney JM, Cole PS, Hensley K, Howard BJ, Martin L, Bummer P, Wang YN, Pedigo NW, Butterfield DA: Beta-Amyloid Peptide-Derived, Oxygen-Dependent Free-Radicals Inhibit Glutamate Uptake in Cultured Astrocytes - Implications for Alzheimers-Disease. *Neuroreport* 1995, 6(14):1875-1879.
8. 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):273-284.
9. Lukiw WJ, Bazan NG: Neuroinflammatory signaling upregulation in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 2000, 25(9-10):1173-1184.
10. Palop JJ, Mucke L: Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci* 2010, 13(7):812-818.
11. Camandola S, Mattson MP: Aberrant subcellular neuronal calcium regulation in aging and Alzheimer's disease. *Bba-Mol Cell Res* 2011, 1813(5):965-973.
12. Tamagno E, Robino G, Obbili A, Bardini P, Aragno M, Parola M, Danni O: H₂O₂ and 4-hydroxynonenal mediate amyloid beta-induced neuronal apoptosis by activating JNKs and p38(MAPK). *Exp Neurol* 2003, 180(2):144-155.
13. Akama KT, Albanese C, Pestell RG, Van Eldik LJ: Amyloid beta-peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NF kappa B-dependent mechanism. *P Natl Acad Sci USA* 1998, 95(10):5795-5800.
14. Gella A, Durany N: Oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Adhes Migr* 2009, 3(1):88-93.

15. Butterfield DA: Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: Implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radical Res* 2002, 36(12):1307-1313.
16. Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM, Drake J: Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging* 2002, 23(5):655-664.
17. Lauderback CM, Hackett JM, Huang FF, Keller JN, Szweda LI, Markesbery WR, Butterfield DA: The glial glutamate transporter, GLT-1, is oxidatively modified by 4-hydroxy-2-nonenal in the Alzheimer's disease brain: the role of A beta 1-42. *J Neurochem* 2001, 78(2):413-416.
18. Huang XD, Cuajungco MP, Atwood CS, Hartshorn MA, Tyndall JDA, Hanson GR, Stokes KC, Leopold M, Multhaup G, Goldstein LE *et al*: Cu(II) potentiation of Alzheimer A beta neurotoxicity - Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction. *Journal of Biological Chemistry* 1999, 274(52):37111-37116.
19. Takeuchi M, Yamagishi S: TAGE (toxic AGEs) hypothesis in various chronic diseases. *Med Hypotheses* 2004, 63(3):449-452.
20. Gsell W, Conrad R, Hicketier M, Sofic E, Frolich L, Wichart I, Jellinger K, Moll G, Ransmayr G, Beckmann H *et al*: Decreased Catalase Activity but Unchanged Superoxide-Dismutase Activity in Brains of Patients with Dementia of Alzheimer-Type. *J Neurochem* 1995, 64(3):1216-1223.
21. Chen G, Wilson R, Boyd P, Mckillop JH, Leitch C, Walker JJ, Burdon RH: Normal Superoxide-Dismutase (Sod) Gene in Pregnancy-Induced Hypertension - Is the Decreased Sod Activity a Secondary Phenomenon. *Free Radical Res* 1994, 21(2):59-66.
22. Padurariu M, Ciobica A, Hritcu L, Stoica B, Bild W, Stefanescu C: Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2010, 469(1):6-10.
23. Aksenov MY, Tucker HM, Nair P, Aksenova MV, Butterfield DA, Estus S, Markesbery WR: The expression of key oxidative stress-handling genes in different brain regions in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 1998, 11(2):151-164.
24. Lovell MA, Ehmman WD, Butler SM, Markesbery WR: Elevated Thiobarbituric Acid-Reactive Substances and Antioxidant Enzyme-Activity in the Brain in Alzheimers-Disease. *Neurology* 1995, 45(8):1594-1601.
25. Marcus DL, Thomas C, Rodriguez C, Simberkoff K, Tsai JS, Strafci JA, Freedman ML: Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 1998, 150(1):40-44.
26. McCaddon A, Hudson P, Hill D, Barber J, Lloyd A, Davies G, Regland B: Alzheimer's disease and total plasma amino thiols. *Biol Psychiat* 2003, 53(3):254-260.
27. Milton NGN: Amyloid-beta binds catalase with high affinity and inhibits hydrogen peroxide breakdown. *Biochem J* 1999, 344:293-296.

28. Kim HC, Yamada K, Nitta A, Olariu A, Tran MH, Mizuno M, Nakajima A, Nagai T, Kamei H, Jhoo WK *et al*: Immunocytochemical evidence that amyloid beta (1-42) impairs endogenous antioxidant systems in vivo. *Neuroscience* 2003, 119(2):399-419.
29. Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR: Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 1982, 215(4537):1237-1239.
30. Lanctot KL, Herrmann N, LouLou MM: Correlates of response to acetylcholinesterase inhibitor therapy in Alzheimer's disease. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* 2003, 28(1):13-26.
31. Perry EK, Tomlinson BE, Blessed G, Perry RH, Cross AJ, Crow TT: Noradrenergic and cholinergic systems in senile dementia of Alzheimer type. *Lancet* 1981, 2(8238):149.
32. Davis KL, Mohs RC, Marin D, Purohit DP, Perl DP, Lantz M, Austin G, Haroutunian V: Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease. *Jama-J Am Med Assoc* 1999, 281(15):1401-1406.
33. Craig LA, Hong NS, McDonald RJ: Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 2011, 35(6):1397-1409.
34. Pedersen WA, Kloczewiak MA, Blusztajn JK: Amyloid beta-protein reduces acetylcholine synthesis in a cell line derived from cholinergic neurons of the basal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93(15):8068-8071.
35. Zheng WH, Bastianetto S, Mennicken F, Ma W, Kar S: Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience* 2002, 115(1):201-211.
36. Hoshi M, Takashima A, Murayama M, Yasutake K, Yoshida N, Ishiguro K, Hoshino T, Imahori K: Nontoxic amyloid beta peptide (1-42) suppresses acetylcholine synthesis - Possible role in cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry* 1997, 272(4):2038-2041.
37. Harkany T, Lengyel Z, Soos K, Penke B, Luiten PG, Gulya K: Cholinotoxic Effects of Beta-Amyloid((1-42)) Peptide on Cortical Projections of the Rat Nucleus Basalis Magnocellularis. *Brain Res* 1995, 695(1):71-75.
38. Behl C, Davis J, Cole GM, Schubert D: Vitamin E protects nerve cells from amyloid beta protein toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 1992, 186(2):944-950.
39. Hensley K, Carney JM, Mattson MP, Aksenova M, Harris M, Wu JF, Floyd RA, Butterfield DA: A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91(8):3270-3274.
40. Jackson CE, Snyder PJ: Electroencephalography and event-related potentials as biomarkers of mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2008, 4(1):S137-S143.
41. Yener GG, Basar E: Sensory evoked and event related oscillations in Alzheimer's disease: a short review. *Cogn Neurodynamics* 2010, 4(4):263-274.

42. Babiloni C, Binetti G, Cassetta E, Dal Forno G, Del Percio C, Ferreri F, Ferri R, Frisoni G, Hirata K, Lanuzza B *et al*: Sources of cortical rhythms change as a function of cognitive impairment in pathological aging: a multicenter study. *Clin Neurophysiol* 2006, 117(2):252-268.
43. Babiloni C, Cassetta E, Binetti G, Tombini M, Del Percio C, Ferreri F, Ferri R, Frisoni G, Lanuzza B, Nobili F *et al*: Resting EEG sources correlate with attentional span in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 2007, 25(12):3742-3757.
44. Babiloni C, Ferri R, Binetti G, Vecchio F, Frisoni GB, Lanuzza B, Miniussi C, Nobili F, Rodriguez G, Rundo F *et al*: Directionality of EEG synchronization in Alzheimer's disease subjects. *Neurobiol Aging* 2009, 30(1):93-102.
45. Yener GG, Guntekin B, Oniz A, Basar E: Increased frontal phase-locking of event-related theta oscillations in Alzheimer patients treated with cholinesterase inhibitors. *Int J Psychophysiol* 2007, 64(1):46-52.
46. Yener G, Guentekin B, Basar E: Event-related delta oscillatory responses of Alzheimer patients. *Eur J Neurol* 2008, 15(6):540-547.
47. Caravaglios G, Costanzo E, Palermo F, Muscoso EG: Decreased amplitude of auditory event-related delta responses in Alzheimer's disease. *Int J Psychophysiol* 2008, 70(1):23-32.
48. Wang J, Ikonen S, Gurevicius K, van Groen T, Tanila H: Alteration of cortical EEG in mice carrying mutated human APP transgene. *Brain Res* 2002, 943(2):181-190.
49. Dringenberg HC: Alzheimer's disease: more than a 'cholinergic disorder' - evidence that cholinergic-monoaminergic interactions contribute to EEG slowing and dementia. *Behav Brain Res* 2000, 115(2):235-249.
50. Pena-Ortega F, Bernal-Pedraza R: Amyloid Beta Peptide slows down sensory-induced hippocampal oscillations. *International journal of peptides* 2012, 2012:236289.
51. Colom LV, Castaneda MT, Banuelos C, Puras G, Garcia-Hernandez A, Hernandez S, Mounsey S, Benavidez J, Lehker C: Medial septal beta-amyloid 1-40 injections alter septo-hippocampal anatomy and function. *Neurobiol Aging* 2010, 31(1):46-57.
52. Huang YD, Mucke L: Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Cell* 2012, 148(6):1204-1222.
53. dos Santos-Neto LL, Toledo MADT, Medeiros-Souza P, de Souza GA: The use of herbal medicine in Alzheimer's disease - A systematic review. *Evid-Based Compl Alt* 2006, 3(4):441-445.
54. Proctor LM, Strachan AJ, Woodruff TM, Mahadevan IB, Williams HM, Shiels IA, Taylor SM: Complement inhibitors selectively attenuate injury following administration of cobra venom factor to rats. *Int Immunopharmacol* 2006, 6(8):1224-1232.
55. Makina T, Ono T, Liu N, Nakamura T, Muso E, Honda G: Suppressive effects of Rosmarinic acid on mesangioproliferative glomerulonephritis in rats. *Nephron* 2002, 92(4):898-904.

56. Ono K, Li L, Takamura Y, Yoshiike Y, Zhu LJ, Han F, Mao X, Ikeda T, Takasaki J, Nishijo H *et al*: Phenolic Compounds Prevent Amyloid beta-Protein Oligomerization and Synaptic Dysfunction by Site-specific Binding. *Journal of Biological Chemistry* 2012, 287(18):14631-14643.
57. Hamaguchi T, Ono K, Murase A, Yamada M: Phenolic Compounds Prevent Alzheimer's Pathology through Different Effects on the Amyloid-beta Aggregation Pathway. *Am J Pathol* 2009, 175(6):2557-2565.
58. Iuvone T, De Filippis D, Esposito G, D'Amico A, Izzo AA: The spice sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cells from amyloid-beta peptide-induced neurotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 2006, 317(3):1143-1149.
59. El Omri A, Han JY, Yamada P, Kawada K, Ben Abdrabbah M, Isoda H: Rosmarinus officinalis polyphenols activate cholinergic activities in PC12 cells through phosphorylation of ERK1/2. *J Ethnopharmacol* 2010, 131(2):451-458.
60. Sasaki K, El Omri A, Kondo S, Han J, Isoda H: Rosmarinus officinalis polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation. *Behav Brain Res* 2013, 238:86-94.
61. Akhondzadeh S, Abbasi SH: Herbal medicine in the treatment of Alzheimer's disease. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias* 2006, 21(2):113-118.
62. Wimo A, and Prince, M.: World Alzheimer Report 2010: The Global Economic Impact of Dementia. In: (*London: Alzheimer's Disease International*). 2010: 1-56.
63. Bertram L, Lill CM, Tanzi RE: The Genetics of Alzheimer Disease: Back to the Future. *Neuron* 2010, 68(2):270-281.
64. Sanchez MM, Heyn SN, Das D, Moghadam S, Martin KJ, Salehi A: Neurobiological Elements of Cognitive Dysfunction in Down Syndrome: Exploring the Role of APP. *Biol Psychiat* 2012, 71(5):403-409.
65. Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerriere A, Vital A, Dumanchin C, Feuillet S, Brice A, Vercelletto M *et al*: APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* 2006, 38(1):24-26.
66. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA: Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993, 261(5123):921-923.
67. Day JJ, Sweatt JD: Epigenetic Mechanisms in Cognition. *Neuron* 2011, 70(5):813-829.
68. Chouliaras L, Rutten BPF, Kenis G, Peerbooms O, Visser PJ, Verhey F, van Os J, Steinbusch HWM, van den Hove DLA: Epigenetic regulation in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 2010, 90(4):498-510.

69. Peleg S: Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice (vol 328, pg 753, 2010). *Science* 2010, 328(5986):1634-1634.
70. Sharp ES, Gatz M: Relationship Between Education and Dementia An Updated Systematic Review. *Alz Dis Assoc Dis* 2011, 25(4):289-304.
71. Van Den Heuvel C, Thornton E, Vink R: Traumatic brain injury and Alzheimer's disease: a review. *Prog Brain Res* 2007, 161:303-316.
72. Daviglus ML, Bell CC, Berrettini W, Bowen PE, Connolly ES, Cox NJ, Dunbar-Jacob JM, Granieri EC, Hunt G, McGarry K *et al*: National Institutes of Health State-of-the-Science Conference Statement: Preventing Alzheimer Disease and Cognitive Decline. *Ann Intern Med* 2010, 153(3):176-U172.
73. Mann DM: The neuropathology of Alzheimer's disease: a review with pathogenetic, aetiological and therapeutic considerations. *Mechanisms of ageing and development* 1985, 31(3):213-255.
74. Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR: An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clinical anatomy* 1995, 8(6):429-431.
75. Terry RD: Some unanswered questions about the mechanisms and etiology of Alzheimer's disease. *Danish medical bulletin* 1985, 32 Suppl 1:22-24.
76. Golde TE: Disease modifying therapy for AD? *J Neurochem* 2006, 99(3):689-707.
77. Christen Y: Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 2000, 71(2):621S-629S.
78. Talwar P, Sinha J, Grover S, Rawat C, Kushwaha S, Agarwal R, Taneja V, Kukreti R: Dissecting Complex and Multifactorial Nature of Alzheimer's Disease Pathogenesis: a Clinical, Genomic, and Systems Biology Perspective. *Molecular neurobiology* 2015.
79. Hardy JA, Higgins GA: Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992, 256(5054):184-185.
80. De Strooper B, Vassar R, Golde T: The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nature reviews Neurology* 2010, 6(2):99-107.
81. Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Jr., Eckman C, Golde TE, Younkin SG: An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 1994, 264(5163):1336-1340.
82. Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT: The Carboxy Terminus of the Beta-Amyloid Protein Is Critical for the Seeding of Amyloid Formation - Implications for the Pathogenesis of Alzheimers-Disease. *Biochemistry-US* 1993, 32(18):4693-4697.
83. Hardy J: Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 1997, 20(4):154-159.
84. Ashe KH, Zahs KR: Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron* 2010, 66(5):631-645.

85. Jucker M: The benefits and limitations of animal models for translational research in neurodegenerative diseases. *Nature medicine* 2010, 16(11):1210-1214.
86. Marchetti C, Marie H: Hippocampal synaptic plasticity in Alzheimer's disease: what have we learned so far from transgenic models? *Reviews in the neurosciences* 2011, 22(4):373-402.
87. Meilandt WJ, Yu GQ, Chin J, Roberson ED, Palop JJ, Wu T, Scearce-Levie K, Mucke L: Enkephalin elevations contribute to neuronal and behavioral impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2008, 28(19):5007-5017.
88. Verret L, Mann EO, Hang GB, Barth AM, Cobos I, Ho K, Devidze N, Masliah E, Kreitzer AC, Mody I *et al*: Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell* 2012, 149(3):708-721.
89. Bero AW, Yan P, Roh JH, Cirrito JR, Stewart FR, Raichle ME, Lee JM, Holtzman DM: Neuronal activity regulates the regional vulnerability to amyloid-beta deposition. *Nat Neurosci* 2011, 14(6):750-756.
90. Wu J, Petralia RS, Kurushima H, Patel H, Jung MY, Volk L, Chowdhury S, Shepherd JD, Dehoff M, Li Y *et al*: Arc/Arg3.1 regulates an endosomal pathway essential for activity-dependent beta-amyloid generation. *Cell* 2011, 147(3):615-628.
91. Benilova I, Karran E, De Strooper B: The toxic Abeta oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* 2012, 15(3):349-357.
92. Li S, Jin M, Koeglsperger T, Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ: Soluble Abeta oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *J Neurosci* 2011, 31(18):6627-6638.
93. Cisse M, Halabisky B, Harris J, Devidze N, Dubal DB, Sun B, Orr A, Lotz G, Kim DH, Hamto P *et al*: Reversing EphB2 depletion rescues cognitive functions in Alzheimer model. *Nature* 2011, 469(7328):47-52.
94. Srikanth V, Maczurek A, Phan T, Steele M, Westcott B, Juskiw D, Munch G: Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2011, 32(5):763-777.
95. Jo J, Whitcomb DJ, Olsen KM, Kerrigan TL, Lo SC, Bru-Mercier G, Dickinson B, Scullion S, Sheng M, Collingridge G *et al*: Abeta(1-42) inhibition of LTP is mediated by a signaling pathway involving caspase-3, Akt1 and GSK-3beta. *Nat Neurosci* 2011, 14(5):545-547.
96. Renner M, Lacor PN, Velasco PT, Xu J, Contractor A, Klein WL, Triller A: Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. *Neuron* 2010, 66(5):739-754.
97. Ronicke R, Mikhaylova M, Ronicke S, Meinhardt J, Schroder UH, Fandrich M, Reiser G, Kreutz MR, Reymann KG: Early neuronal dysfunction by amyloid beta oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors. *Neurobiol Aging* 2011, 32(12):2219-2228.

98. Decker H, Lo KY, Unger SM, Ferreira ST, Silverman MA: Amyloid-beta peptide oligomers disrupt axonal transport through an NMDA receptor-dependent mechanism that is mediated by glycogen synthase kinase 3beta in primary cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 2010, 30(27):9166-9171.
99. Du H, Guo L, Fang F, Chen D, Sosunov AA, McKhann GM, Yan Y, Wang C, Zhang H, Molkenin JD *et al*: Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nature medicine* 2008, 14(10):1097-1105.
100. Sheng ZH, Cai Q: Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nature reviews Neuroscience* 2012, 13(2):77-93.
101. Cohen TJ, Guo JL, Hurtado DE, Kwong LK, Mills IP, Trojanowski JQ, Lee VM: The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation. *Nature communications* 2011, 2:252.
102. Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L: The many faces of tau. *Neuron* 2011, 70(3):410-426.
103. Hoover BR, Reed MN, Su J, Penrod RD, Kotilinek LA, Grant MK, Pitstick R, Carlson GA, Lanier LM, Yuan LL *et al*: Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron* 2010, 68(6):1067-1081.
104. Zempel H, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM: Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *J Neurosci* 2010, 30(36):11938-11950.
105. Wonnacott S: Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* 1997, 20(2):92-98.
106. Zhang H, Sulzer D: Frequency-dependent modulation of dopamine release by nicotine. *Nat Neurosci* 2004, 7(6):581-582.
107. Douglas CL, Baghdoyan HA, Lydic R: Postsynaptic muscarinic M1 receptors activate prefrontal cortical EEG of C57BL/6J mouse. *Journal of neurophysiology* 2002, 88(6):3003-3009.
108. Higley MJ, Soler-Llavina GJ, Sabatini BL: Cholinergic modulation of multivesicular release regulates striatal synaptic potency and integration. *Nat Neurosci* 2009, 12(9):1121-1128.
109. Zhang W, Yamada M, Gomez J, Basile AS, Wess J: Multiple muscarinic acetylcholine receptor subtypes modulate striatal dopamine release, as studied with M1-M5 muscarinic receptor knock-out mice. *J Neurosci* 2002, 22(15):6347-6352.
110. Perry EK, Tomlinson BE, Blessed G, Bergmann K, Gibson PH, Perry RH: Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *British medical journal* 1978, 2(6150):1457-1459.
111. Bartus RT, Emerich DF: Cholinergic markers in Alzheimer disease. *Jama* 1999, 282(23):2208-2209.

112. Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R: Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol* 2002, 68(3):209-245.
113. Gattaz WF, Schmitt A, Maras A: Increased platelet phospholipase A2 activity in schizophrenia. *Schizophrenia research* 1995, 16(1):1-6.
114. Uwano C, Suzuki M, Aikawa T, Ebihara T, Une K, Tomita N, Kosaka Y, Okinaga S, Furukawa K, Arai H *et al*: Rivastigmine dermal patch solves eating problems in an individual with advanced Alzheimer's disease. *Journal of the American Geriatrics Society* 2012, 60(10):1979-1980.
115. Courtney C, Farrell D, Gray R, Hills R, Lynch L, Sellwood E, Edwards S, Hardyman W, Raftery J, Crome P *et al*: Long-term donepezil treatment in 565 patients with Alzheimer's disease (AD2000): randomised double-blind trial. *Lancet* 2004, 363(9427):2105-2115.
116. Winblad B, Engedal K, Soininen H, Verhey F, Waldemar G, Wimo A, Wetterholm AL, Zhang R, Haglund A, Subbiah P *et al*: A 1-year, randomized, placebo-controlled study of donepezil in patients with mild to moderate AD. *Neurology* 2001, 57(3):489-495.
117. Parent MB, Baxter MG: Septohippocampal acetylcholine: involved in but not necessary for learning and memory? *Learning & memory* 2004, 11(1):9-20.
118. Geula C, Nagykerly N, Nicholas A, Wu CK: Cholinergic neuronal and axonal abnormalities are present early in aging and in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008, 67(4):309-318.
119. Perry EK, Johnson M, Kerwin JM, Piggott MA, Court JA, Shaw PJ, Ince PG, Brown A, Perry RH: Convergent cholinergic activities in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1992, 13(3):393-400.
120. Akaike A, Tamura Y, Yokota T, Shimohama S, Kimura J: Nicotine-induced protection of cultured cortical neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity. *Brain Res* 1994, 644(2):181-187.
121. Dajas-Bailador FA, Lima PA, Wonnacott S: The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subtype mediates nicotine protection against NMDA excitotoxicity in primary hippocampal cultures through a Ca(2+) dependent mechanism. *Neuropharmacology* 2000, 39(13):2799-2807.
122. Suzuki M, Yamaguchi T, Ozawa Y, Iwai A, Yamamoto M: Effect of YM796, a novel muscarinic agonist, on the impairment of passive avoidance response in senescence-accelerated mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 1995, 51(4):623-626.
123. Wanibuchi F, Nishida T, Yamashita H, Hidaka K, Koshiya K, Tsukamoto S, Usuda S: Characterization of a novel muscarinic receptor agonist, YM796: comparison with cholinesterase inhibitors in in vivo pharmacological studies. *European journal of pharmacology* 1994, 265(3):151-158.
124. Nordberg A: Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Biol Psychiatry* 2001, 49(3):200-210.
125. Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D: Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 1994, 77(6):817-827.

126. Behl C: Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. *Prog Neurobiol* 1999, 57(3):301-323.
127. Behl C, Moosmann B: Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free radical biology & medicine* 2002, 33(2):182-191.
128. Smith MA, Sayre LM, Monnier VM, Perry G: Radical AGEing in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 1995, 18(4):172-176.
129. Halliwell B, Gutteridge JM: Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of biochemistry and biophysics* 1986, 246(2):501-514.
130. Sagara Y, Dargusch R, Klier FG, Schubert D, Behl C: Increased antioxidant enzyme activity in amyloid beta protein-resistant cells. *J Neurosci* 1996, 16(2):497-505.
131. Behl C, Sagara Y: Mechanism of amyloid beta protein induced neuronal cell death: current concepts and future perspectives. *Journal of neural transmission Supplementum* 1997, 49:125-134.
132. Thomas T, Thomas G, McLendon C, Sutton T, Mullan M: beta-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature* 1996, 380(6570):168-171.
133. Atwood CS, Moir RD, Huang X, Scarpa RC, Bacarra NM, Romano DM, Hartshorn MA, Tanzi RE, Bush AI: Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *The Journal of biological chemistry* 1998, 273(21):12817-12826.
134. Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR: Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *Journal of the neurological sciences* 1998, 158(1):47-52.
135. Beckman JS, Koppenol WH: Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol-Cell Ph* 1996, 271(5):C1424-C1437.
136. Pratico D, Sung S: Lipid peroxidation and oxidative imbalance: Early functional events in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2004, 6(2):171-175.
137. Subbarao KV, Richardson JS, Ang LC: Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. *J Neurochem* 1990, 55(1):342-345.
138. Halliwell B, Gutteridge, J.M.C.: Free radicals in biology and medicine; 2007.
139. Butterfield DA, Kanski J: Methionine residue 35 is critical for the oxidative stress and neurotoxic properties of Alzheimer's amyloid beta-peptide 1-42. *Peptides* 2002, 23(7):1299-1309.
140. Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR: Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88(23):10540-10543.
141. Mecocci P, Macgarvey U, Beal MF: Oxidative Damage to Mitochondrial-DNA Is Increased in Alzheimers-Disease. *Ann Neurol* 1994, 36(5):747-751.
142. Balazs L, Leon M: Evidence of an Oxidative Challenge in the Alzheimers Brain. *Neurochem Res* 1994, 19(9):1131-1137.

143. Marcus DL, Thomas C, Rodriguez C, Simberkoff K, Tsai JS, Strafaci JA, Freedman ML: Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 1998, 150(1):40-44.
144. Marcus DL, Strafaci JA, Freedman ML: Differential neuronal expression of manganese superoxide dismutase in Alzheimer's disease. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 2006, 12(1):BR8-14.
145. Murakami K, Shimizu T, Irie K: Formation of the 42-mer Amyloid beta Radical and the Therapeutic Role of Superoxide Dismutase in Alzheimer's Disease. *Journal of amino acids* 2011, 2011:654207.
146. Turunc Bayrakdar E, Uyanikgil Y, Kanit L, Koylu E, Yalcin A: Nicotinamide treatment reduces the levels of oxidative stress, apoptosis, and PARP-1 activity in Aβ(1-42)-induced rat model of Alzheimer's disease. *Free Radic Res* 2014, 48(2):146-158.
147. Briyal S, Philip T, Gulati A: Endothelin-A receptor antagonists prevent amyloid-beta-induced increase in ETA receptor expression, oxidative stress, and cognitive impairment. *J Alzheimers Dis* 2011, 23(3):491-503.
148. Smith DG, Cappai R, Barnham KJ: The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Biochimica et biophysica acta* 2007, 1768(8):1976-1990.
149. Ma T, Hoeffer CA, Wong H, Massaad CA, Zhou P, Iadecola C, Murphy MP, Pautler RG, Klann E: Amyloid beta-induced impairments in hippocampal synaptic plasticity are rescued by decreasing mitochondrial superoxide. *J Neurosci* 2011, 31(15):5589-5595.
150. Puttfarcken PS, Manelli AM, Neilly J, Frail DE: Inhibition of age-induced beta-amyloid neurotoxicity in rat hippocampal cells. *Exp Neurol* 1996, 138(1):73-81.
151. Clausen A, Xu XB, Bi XN, Baudry M: Effects of the Superoxide Dismutase/Catalase Mimetic EUK-207 in a Mouse Model of Alzheimer's Disease: Protection Against and Interruption of Progression of Amyloid and Tau Pathology and Cognitive Decline. *J Alzheimers Dis* 2012, 30(1):183-208.
152. Rinaldi P, Polidori MC, Metastasio A, Mariani E, Mattioli P, Cherubini A, Catani M, Cecchetti R, Senin U, Mecocci P: Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2003, 24(7):915-919.
153. Pocernich CB, Butterfield DA: Elevation of glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer disease. *Biochimica et biophysica acta* 2012, 1822(5):625-630.
154. Byun K, Bayarsaikhan E, Kim D, Son M, Hong J, Jeong GB, Paek SH, Won MH, Lee B: Activated microglial cells synthesize and secrete AGE-albumin. *Anatomy & cell biology* 2012, 45(1):47-52.
155. Zhao Y, Zhao B: Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013, 2013:316523.
156. Shelat PB, Chalimoniuk M, Wang JH, Strosznajder JB, Lee JC, Sun AY, Simonyi A, Sun GY: Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH

- oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons. *J Neurochem* 2008, 106(1):45-55.
157. Carrillo-Mora P, Luna R, Colin-Barenque L: Amyloid beta: multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects? *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014, 2014:795375.
 158. Guix FX, Ill-Raga G, Bravo R, Nakaya T, de Fabritiis G, Coma M, Miscione GP, Villa-Freixa J, Suzuki T, Fernandez-Busquets X *et al*: Amyloid-dependent triosephosphate isomerase nitrotyrosination induces glycation and tau fibrillation. *Brain* 2009, 132(Pt 5):1335-1345.
 159. Yan SD, Chen X, Schmidt AM, Brett J, Godman G, Zou YS, Scott CW, Caputo C, Frappier T, Smith MA *et al*: Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91(16):7787-7791.
 160. Nishida Y, Yokota T, Takahashi T, Uchihara T, Jishage K, Mizusawa H: Deletion of vitamin E enhances phenotype of Alzheimer disease model mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 350(3):530-536.
 161. Dumont M, Wille E, Stack C, Calingasan NY, Beal MF, Lin MT: Reduction of oxidative stress, amyloid deposition, and memory deficit by manganese superoxide dismutase overexpression in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2009, 23(8):2459-2466.
 162. Quiroz-Baez R, Rojas E, Arias C: Oxidative stress promotes JNK-dependent amyloidogenic processing of normally expressed human APP by differential modification of alpha-, beta- and gamma-secretase expression. *Neurochemistry international* 2009, 55(7):662-670.
 163. Lagalwar S, Guillozet-Bongaarts AL, Berry RW, Binder LI: Formation of phospho-SAPK/JNK is an early event in granules in the hippocampus Alzheimer disease. *J Neuropath Exp Neur* 2006, 65(5):455-464.
 164. Wataya T, Nunomura A, Smith MA, Siedlak SL, Harris PL, Shimohama S, Szweda LI, Kaminski MA, Avila J, Price DL *et al*: High molecular weight neurofilament proteins are physiological substrates of adduction by the lipid peroxidation product hydroxynonenal. *The Journal of biological chemistry* 2002, 277(7):4644-4648.
 165. Kovac A, Zilka N, Kazmerova Z, Cente M, Zilkova M, Novak M: Misfolded truncated protein tau induces innate immune response via MAPK pathway. *J Immunol* 2011, 187(5):2732-2739.
 166. Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE: beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 2001, 21(4):1179-1188.
 167. Buggia-Prevot V, Sevalle J, Rossner S, Checler F: NFkappaB-dependent control of BACE1 promoter transactivation by Abeta42. *The Journal of biological chemistry* 2008, 283(15):10037-10047.
 168. Monnier VM: Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Archives of biochemistry and biophysics* 2003, 419(1):1-15.

169. Brownlee M: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001, 414(6865):813-820.
170. Lapolla A, Fedele D, Traldi P: Glyco-oxidation in diabetes and related diseases. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2005, 357(2):236-250.
171. Kuhla B, Loske C, Garcia De Arriba S, Schinzel R, Huber J, Munch G: Differential effects of "Advanced glycation endproducts" and beta-amyloid peptide on glucose utilization and ATP levels in the neuronal cell line SH-SY5Y. *Journal of neural transmission* 2004, 111(3):427-439.
172. Ortwerth BJ, James H, Simpson G, Linetsky M: The generation of superoxide anions in glycation reactions with sugars, osones, and 3-deoxyosones. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 245(1):161-165.
173. Chen X, Walker DG, Schmidt AM, Arancio O, Lue LF, Yan SD: RAGE: a potential target for A β -mediated cellular perturbation in Alzheimer's disease. *Current molecular medicine* 2007, 7(8):735-742.
174. Cruz-Sanchez FF, Girones X, Ortega A, Alameda F, Lafuente JV: Oxidative stress in Alzheimer's disease hippocampus: a topographical study. *Journal of the neurological sciences* 2010, 299(1-2):163-167.
175. Chen K, Kazachkov M, Yu PH: Effect of aldehydes derived from oxidative deamination and oxidative stress on beta-amyloid aggregation; pathological implications to Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission* 2007, 114(6):835-839.
176. Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR: Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nature reviews Neuroscience* 2004, 5(11):863-873.
177. Clauberg M, Joshi JG: Regulation of serine protease activity by aluminum: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90(3):1009-1012.
178. Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH: Mitochondria are a direct site of A β accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet* 2006, 15(9):1437-1449.
179. Huang Y: Molecular and cellular mechanisms of apolipoprotein E4 neurotoxicity and potential therapeutic strategies. *Current opinion in drug discovery & development* 2006, 9(5):627-641.
180. Kim J, Basak JM, Holtzman DM: The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 2009, 63(3):287-303.
181. Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, Mackey B, Olney J, McKeel D, Wozniak D *et al*: Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97(6):2892-2897.
182. Castellano JM, Kim J, Stewart FR, Jiang H, DeMattos RB, Patterson BW, Fagan AM, Morris JC, Mawuenyega KG, Cruchaga C *et al*: Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-beta peptide clearance. *Science translational medicine* 2011, 3(89):89ra57.

183. Buttini M, Masliah E, Yu GQ, Palop JJ, Chang S, Bernardo A, Lin C, Wyss-Coray T, Huang Y, Mucke L: Cellular source of apolipoprotein E4 determines neuronal susceptibility to excitotoxic injury in transgenic mice. *Am J Pathol* 2010, 177(2):563-569.
184. Dumanis SB, Tesoriero JA, Babus LW, Nguyen MT, Trotter JH, Ladu MJ, Weeber EJ, Turner RS, Xu B, Rebeck GW *et al*: ApoE4 decreases spine density and dendritic complexity in cortical neurons in vivo. *J Neurosci* 2009, 29(48):15317-15322.
185. Li G, Bien-Ly N, Andrews-Zwilling Y, Xu Q, Bernardo A, Ring K, Halabisky B, Deng C, Mahley RW, Huang Y: GABAergic interneuron dysfunction impairs hippocampal neurogenesis in adult apolipoprotein E4 knockin mice. *Cell stem cell* 2009, 5(6):634-645.
186. Jones PB, Adams KW, Rozkalne A, Spires-Jones TL, Hshieh TT, Hashimoto T, von Armin CA, Mielke M, Bacskai BJ, Hyman BT: Apolipoprotein E: isoform specific differences in tertiary structure and interaction with amyloid-beta in human Alzheimer brain. *PloS one* 2011, 6(1):e14586.
187. Harris FM, Brecht WJ, Xu Q, Tesseur I, Kekonius L, Wyss-Coray T, Fish JD, Masliah E, Hopkins PC, Scarse-Levie K *et al*: Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100(19):10966-10971.
188. Chen HK, Liu Z, Meyer-Franke A, Brodbeck J, Miranda RD, McGuire JG, Pleiss MA, Ji ZS, Balestra ME, Walker DW *et al*: Small molecule structure correctors abolish detrimental effects of apolipoprotein E4 in cultured neurons. *The Journal of biological chemistry* 2012, 287(8):5253-5266.
189. Gibson GE, Haroutunian V, Zhang H, Park LC, Shi Q, Lesser M, Mohs RC, Sheu RK, Blass JP: Mitochondrial damage in Alzheimer's disease varies with apolipoprotein E genotype. *Ann Neurol* 2000, 48(3):297-303.
190. Hampel H, Frank R, Broich K, Teipel SJ, Katz RG, Hardy J, Herholz K, Bokde AL, Jessen F, Hoessler YC *et al*: Biomarkers for Alzheimer's disease: academic, industry and regulatory perspectives. *Nat Rev Drug Discov* 2010, 9(7):560-574.
191. Putcha D, Brickhouse M, O'Keefe K, Sullivan C, Rentz D, Marshall G, Dickerson B, Sperling R: Hippocampal hyperactivation associated with cortical thinning in Alzheimer's disease signature regions in non-demented elderly adults. *J Neurosci* 2011, 31(48):17680-17688.
192. Palop JJ, Chin J, Mucke L: A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. *Nature* 2006, 443(7113):768-773.
193. Kim S, Jensen JR, Cisek K, Funk KE, Naphade S, Schafer K, Kuret J: Imaging as a strategy for premortem diagnosis and staging of tauopathies. *Current Alzheimer research* 2010, 7(3):230-234.
194. Giannakopoulos P, Herrmann FR, Bussiere T, Bouras C, Kovari E, Perl DP, Morrison JH, Gold G, Hof PR: Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* 2003, 60(9):1495-1500.

195. Morris JC, Roe CM, Grant EA, Head D, Storandt M, Goate AM, Fagan AM, Holtzman DM, Mintun MA: Pittsburgh compound B imaging and prediction of progression from cognitive normality to symptomatic Alzheimer disease. *Archives of neurology* 2009, 66(12):1469-1475.
196. Villemagne VL, McLean CA, Reardon K, Boyd A, Lewis V, Klug G, Jones G, Baxendale D, Masters CL, Rowe CC *et al*: 11C-PiB PET studies in typical sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2009, 80(9):998-1001.
197. Shimada H, Ataka S, Tomiyama T, Takechi H, Mori H, Miki T: Clinical course of patients with familial early-onset Alzheimer's disease potentially lacking senile plaques bearing the E693Delta mutation in amyloid precursor protein. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 2011, 32(1):45-54.
198. Remes AM, Laru L, Tuominen H, Aalto S, Kemppainen N, Mononen H, Nagren K, Parkkola R, Rinne JO: Carbon 11-labeled pittsburgh compound B positron emission tomographic amyloid imaging in patients with APP locus duplication. *Archives of neurology* 2008, 65(4):540-544.
199. Lopez OL, Baker JT, Wahed AS: Long-term effects of the concomitant use of memantine with cholinesterase inhibition in Alzheimer disease (vol 80, pg 600, 2009). *J Neurol Neurosurg Ps* 2009, 80(9):1056-1056.
200. Green RC, Schneider LS, Amato DA, Beelen AP, Wilcock G, Swabb EA, Zavitz KH, Tarenflur bil Phase 3 Study G: Effect of tarenflur bil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *Jama* 2009, 302(23):2557-2564.
201. Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Hiemke C, Blessing M *et al*: A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *The Journal of clinical investigation* 2004, 113(10):1456-1464.
202. Yang HQ, Pan J, Ba MW, Sun ZK, Ma GZ, Lu GQ, Xiao Q, Chen SD: New protein kinase C activator regulates amyloid precursor protein processing in vitro by increasing alpha-secretase activity. *Eur J Neurosci* 2007, 26(2):381-391.
203. Schor NF: What the Halted Phase III gamma-Secretase Inhibitor Trial May (or May Not) Be Telling Us. *Ann Neurol* 2011, 69(2):237-239.
204. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K *et al*: Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999, 400(6740):173-177.
205. Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, Eisner L, Kirby L, Rovira MB, Forette F *et al*: Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology* 2005, 64(9):1553-1562.
206. Sperling RA, Jack CR, Jr., Black SE, Frosch MP, Greenberg SM, Hyman BT, Scheltens P, Carrillo MC, Thies W, Bednar MM *et al*: Amyloid-related imaging abnormalities in amyloid-modifying therapeutic trials: recommendations

- from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup. *Alzheimers Dement* 2011, 7(4):367-385.
207. Nalivaeva NN, Belyaev ND, Lewis DI, Pickles AR, Makova NZ, Bagrova DI, Dubrovskaya NM, Plesneva SA, Zhuravin IA, Turner AJ: Effect of sodium valproate administration on brain neprilysin expression and memory in rats. *J Mol Neurosci* 2012, 46(3):569-577.
 208. Bauer C, Pardossi-Piquard R, Dunys J, Roy M, Checler F: gamma-Secretase-mediated regulation of neprilysin: influence of cell density and aging and modulation by imatinib. *J Alzheimers Dis* 2011, 27(3):511-520.
 209. Lannfelt L, Blennow K, Zetterberg H, Batsman S, Ames D, Harrison J, Masters CL, Targum S, Bush AI, Murdoch R *et al*: Safety, efficacy, and biomarker findings of PBT2 in targeting Abeta as a modifying therapy for Alzheimer's disease: a phase IIa, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology* 2008, 7(9):779-786.
 210. Schirmer RH, Adler H, Pickhardt M, Mandelkow E: "Lest we forget you--methylene blue...". *Neurobiol Aging* 2011, 32(12):2325 e2327-2316.
 211. Gura T: Hope in Alzheimer's fight emerges from unexpected places. *Nature medicine* 2008, 14(9):894.
 212. Sahara N, Murayama M, Mizoroki T, Urushitani M, Imai Y, Takahashi R, Murata S, Tanaka K, Takashima A: In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. *J Neurochem* 2005, 94(5):1254-1263.
 213. Asuni AA, Boutajangout A, Quartermain D, Sigurdsson EM: Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. *J Neurosci* 2007, 27(34):9115-9129.
 214. Brunden KR, Zhang B, Carroll J, Yao Y, Potuzak JS, Hogan AM, Iba M, James MJ, Xie SX, Ballatore C *et al*: Epothilone D improves microtubule density, axonal integrity, and cognition in a transgenic mouse model of tauopathy. *J Neurosci* 2010, 30(41):13861-13866.
 215. Gozes I, Stewart A, Morimoto B, Fox A, Sutherland K, Schmeche D: Addressing Alzheimer's disease tangles: from NAP to AL-108. *Current Alzheimer research* 2009, 6(5):455-460.
 216. Bien-Ly N, Andrews-Zwilling Y, Xu Q, Bernardo A, Wang C, Huang Y: C-terminal-truncated apolipoprotein (apo) E4 inefficiently clears amyloid-beta (Abeta) and acts in concert with Abeta to elicit neuronal and behavioral deficits in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108(10):4236-4241.
 217. Cramer PE, Cirrito JR, Wesson DW, Lee CY, Karlo JC, Zinn AE, Casali BT, Restivo JL, Goebel WD, James MJ *et al*: ApoE-directed therapeutics rapidly clear beta-amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science* 2012, 335(6075):1503-1506.
 218. Strittmatter WJ: Medicine. Old drug, new hope for Alzheimer's disease. *Science* 2012, 335(6075):1447-1448.
 219. Laskowitz DT, McKenna SE, Song P, Wang H, Durham L, Yeung N, Christensen D, Vitek MP: COG1410, a novel apolipoprotein E-based peptide, improves

- functional recovery in a murine model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2007, 24(7):1093-1107.
220. Hong-Qi Y, Zhi-Kun S, Sheng-Di C: Current advances in the treatment of Alzheimer's disease: focused on considerations targeting Abeta and tau. *Translational neurodegeneration* 2012, 1(1):21.
221. Chohan MO, Iqbal K: From tau to toxicity: emerging roles of NMDA receptor in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2006, 10(1):81-87.
222. Peskind ER, Potkin SG, Pomara N, Ott BR, Graham SM, Olin JT, McDonald S: Memantine treatment in mild to moderate Alzheimer disease: a 24-week randomized, controlled trial. *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry* 2006, 14(8):704-715.
223. Stocker R: Lipoprotein oxidation: mechanistic aspects, methodological approaches and clinical relevance. *Current opinion in lipidology* 1994, 5(6):422-433.
224. Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, Woodbury P, Growdon J, Cotman CW, Pfeiffer E *et al*: A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *The New England journal of medicine* 1997, 336(17):1216-1222.
225. Bowman GL: Ascorbic acid, cognitive function, and Alzheimer's disease: a current review and future direction. *BioFactors* 2012, 38(2):114-122.
226. Siedlak SL, Casadesus G, Webber KM, Pappolla MA, Atwood CS, Smith MA, Perry G: Chronic antioxidant therapy reduces oxidative stress in a mouse model of Alzheimer's disease. *Free Radic Res* 2009, 43(2):156-164.
227. Lim GP, Chu T, Yang F, Beech W, Frautschy SA, Cole GM: The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci* 2001, 21(21):8370-8377.
228. Yang SG, Wang WY, Ling TJ, Feng Y, Du XT, Zhang X, Sun XX, Zhao M, Xue D, Yang Y *et al*: alpha-Tocopherol quinone inhibits beta-amyloid aggregation and cytotoxicity, disaggregates preformed fibrils and decreases the production of reactive oxygen species, NO and inflammatory cytokines. *Neurochemistry international* 2010, 57(8):914-922.
229. Prasad KN, Cole WC, Prasad KC: Risk factors for Alzheimer's disease: role of multiple antioxidants, non-steroidal anti-inflammatory and cholinergic agents alone or in combination in prevention and treatment. *Journal of the American College of Nutrition* 2002, 21(6):506-522.
230. Arlt S, Muller-Thomsen T, Beisiegel U, Kontush A: Effect of one-year vitamin C- and E-supplementation on cerebrospinal fluid oxidation parameters and clinical course in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 2012, 37(12):2706-2714.
231. Regland B, Gottfries CG, Oreland L: Vitamin B12-induced reduction of platelet monoamine oxidase activity in patients with dementia and pernicious anaemia. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* 1991, 240(4-5):288-291.

232. Aisen PS, Schneider LS, Sano M, Diaz-Arrastia R, van Dyck CH, Weiner MF, Bottiglieri T, Jin S, Stokes KT, Thomas RG *et al*: High-dose B vitamin supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *Jama* 2008, 300(15):1774-1783.
233. Hager K, Marahrens A, Kenklies M, Riederer P, Munich G: Alpha-lipoic acid as a new treatment option for Alzheimer type dementia (vol 32, pg 275, 2001). *Arch Gerontol Geriatr* 2010, 51(1):110-110.
234. Quinn JF, Bussiere JR, Hammond RS, Montine TJ, Henson E, Jones RE, Stackman RW: Chronic dietary alpha-lipoic acid reduces deficits in hippocampal memory of aged Tg2576 mice. *Neurobiol Aging* 2007, 28(2):213-225.
235. Moreira PI, Harris PLR, Zhu XW, Santos MS, Oliveira CR, Smith MA, Perry G: Lipoic acid and n-acetyl cysteine decrease mitochondrial-related oxidative stress in Alzheimer disease patient fibroblasts. *J Alzheimers Dis* 2007, 12(2):195-206.
236. Suchy J, Chan A, Shea TB: Dietary supplementation with a combination of alpha-lipoic acid, acetyl-L-carnitine, glycerophosphocoline, docosahexaenoic acid, and phosphatidylserine reduces oxidative damage to murine brain and improves cognitive performance. *Nutr Res* 2009, 29(1):70-74.
237. Ishrat T, Hoda MN, Khan MB, Yousuf S, Ahmad M, Khan MM, Ahmad A, Islam F: Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT). *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 2009, 19(9):636-647.
238. Baum L, Lam CW, Cheung SK, Kwok T, Lui V, Tsoh J, Lam L, Leung V, Hui E, Ng C *et al*: Six-month randomized, placebo-controlled, double-blind, pilot clinical trial of curcumin in patients with Alzheimer disease. *Journal of clinical psychopharmacology* 2008, 28(1):110-113.
239. Ringman JM, Frautschy SA, Teng E, Begum AN, Bardens J, Beigi M, Gylys KH, Badmaev V, Heath DD, Apostolova LG *et al*: Oral curcumin for Alzheimer's disease: tolerability and efficacy in a 24-week randomized, double blind, placebo-controlled study. *Alzheimer's research & therapy* 2012, 4(5):43.
240. Vellas B, Coley N, Ousset PJ, Berrut G, Dartigues JF, Dubois B, Grandjean H, Pasquier F, Piette F, Robert P *et al*: Long-term use of standardised ginkgo biloba extract for the prevention of Alzheimer's disease (GuidAge): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Neurology* 2012, 11(10):851-859.
241. Mulnard RI, Cotman CW, Kawas C, van Dyck CH, Sano H, Doody R, Koss E, Pfeiffer E, Jin S, Gamst A *et al*: Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer disease - A randomized controlled trial. *Jama-J Am Med Assoc* 2000, 283(8):1007-1015.
242. Huang TC, Lu KT, Wo YY, Wu YJ, Yang YL: Resveratrol protects rats from Abeta-induced neurotoxicity by the reduction of iNOS expression and lipid peroxidation. *PLoS one* 2011, 6(12):e29102.

243. Smith MA, Petot GJ, Perry G: Diet and oxidative stress: a novel synthesis of epidemiological data on Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 1999, 1(4-5):203-206.
244. Swarup V, Ghosh J, Ghosh S, Saxena A, Basu A: Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2007, 51(9):3367-3370.
245. Qiao SL, Li WH, Tsubouchi R, Haneda M, Murakami K, Takeuchi F, Nisimoto Y, Yoshino M: Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264.7 macrophages. *Free Radical Res* 2005, 39(9):995-1003.
246. Alkam T, Nitta A, Mizoguchi H, Itoh A, Nabeshima T: A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by A beta(25-35). *Behav Brain Res* 2007, 180(2):139-145.
247. Buzsaki G, Draguhn A: Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 2004, 304(5679):1926-1929.
248. Basar E, Basar-Eroglu C, Guntekin B, Yener GG: Brain's alpha, beta, gamma, delta, and theta oscillations in neuropsychiatric diseases: proposal for biomarker strategies. *Supplements to Clinical neurophysiology* 2013, 62:19-54.
249. Goodin DS, Aminoff MJ: Electrophysiological Differences between Demented and Nondemented Patients with Parkinsons-Disease. *Ann Neurol* 1987, 21(1):90-94.
250. Goodin DS, Aminoff MJ: Electrophysiological Differences between Subtypes of Dementia. *Brain* 1986, 109:1103-1113.
251. Martinelli V, Locatelli T, Comi G, Lia C, Alberoni M, Bressi S, Rovaris M, Franceschi M, Canal N: Pattern visual evoked potential mapping in Alzheimer's disease: Correlations with visuospatial impairment. *Dementia* 1996, 7(2):63-68.
252. Moore NC: Visual evoked responses in Alzheimer's disease: A review. *Clin Electroencephal* 1997, 28(3):137-142.
253. Ruessmann K, Beneicke U: P2-Latency of the Flash Visual Evoked-Potential in Dementia. *International Journal of Neuroscience* 1991, 56(1-4):273-276.
254. Fernandez R, Kavcic V, Duffy CJ: Neurophysiologic analyses of low- and high-level visual processing in Alzheimer disease. *Neurology* 2007, 68(24):2066-2076.
255. Osipova D, Pekkonen E, Ahveninen J: Enhanced magnetic auditory steady-state response in early Alzheimer's disease. *Clin Neurophysiol* 2006, 117(9):1990-1995.
256. Hogan MJ, Swanwick GR, Kaiser J, Rowan M, Lawlor B: Memory-related EEG power and coherence reductions in mild Alzheimer's disease. *Int J Psychophysiol* 2003, 49(2):147-163.
257. Guntekin B, Saatci E, Yener G: Decrease of evoked delta, theta and alpha coherences in Alzheimer patients during a visual oddball paradigm. *Brain Res* 2008, 1235:109-116.

258. Sams M, Paavilainen P, Alho K, Naatanen R: Auditory frequency discrimination and event-related potentials. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 1985, 62(6):437-448.
259. Naatanen R, Tervaniemi M, Sussman E, Paavilainen P, Winkler I: "Primitive intelligence" in the auditory cortex. *Trends Neurosci* 2001, 24(5):283-288.
260. Alho K, Sainio K, Sajaniemi N, Reinikainen K, Naatanen R: Event-related brain potential of human newborns to pitch change of an acoustic stimulus. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 1990, 77(2):151-155.
261. Giard MH, Perrin F, Pernier J, Bouchet P: Brain generators implicated in the processing of auditory stimulus deviance: a topographic event-related potential study. *Psychophysiology* 1990, 27(6):627-640.
262. Naatanen R, Teder W, Alho K, Lavikainen J: Auditory attention and selective input modulation: a topographical ERP study. *Neuroreport* 1992, 3(6):493-496.
263. Kujala T, Tervaniemi M, Schroger E: The mismatch negativity in cognitive and clinical neuroscience: theoretical and methodological considerations. *Biological psychology* 2007, 74(1):1-19.
264. Naatanen R: Mismatch negativity (MMN): perspectives for application. *Int J Psychophysiol* 2000, 37(1):3-10.
265. Tiitinen H, May P, Reinikainen K, Naatanen R: Attentive novelty detection in humans is governed by pre-attentive sensory memory. *Nature* 1994, 372(6501):90-92.
266. Winkler I, Karmos G, Naatanen R: Adaptive modeling of the unattended acoustic environment reflected in the mismatch negativity event-related potential. *Brain Res* 1996, 742(1-2):239-252.
267. Alain C, Woods DL, Knight RT: A distributed cortical network for auditory sensory memory in humans. *Brain Res* 1998, 812(1-2):23-37.
268. Rinne T, Alho K, Ilmoniemi RJ, Virtanen J, Naatanen R: Separate time behaviors of the temporal and frontal mismatch negativity sources. *Neuroimage* 2000, 12(1):14-19.
269. Escera C, Yago E, Corral MJ, Corbera S, Nunez MI: Attention capture by auditory significant stimuli: semantic analysis follows attention switching. *Eur J Neurosci* 2003, 18(8):2408-2412.
270. Levanen S, Ahonen A, Hari R, McEvoy L, Sams M: Deviant auditory stimuli activate human left and right auditory cortex differently. *Cerebral cortex* 1996, 6(2):288-296.
271. Opitz B, Rinne T, Mecklinger A, von Cramon DY, Schroger E: Differential contribution of frontal and temporal cortices to auditory change detection: fMRI and ERP results. *Neuroimage* 2002, 15(1):167-174.
272. Bottcher-Gandor C, Ullsperger P: Mismatch negativity in event-related potentials to auditory stimuli as a function of varying interstimulus interval. *Psychophysiology* 1992, 29(5):546-550.
273. Jaaskelainen IP, Ahveninen J, Bonmassar G, Dale AM, Ilmoniemi RJ, Levanen S, Lin FH, May P, Melcher J, Stufflebeam S *et al*: Human posterior auditory

- cortex gates novel sounds to consciousness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(17):6809-6814.
274. Naatanen R, Jacobsen T, Winkler I: Memory-based or afferent processes in mismatch negativity (MMN): A review of the evidence. *Psychophysiology* 2005, 42(1):25-32.
 275. Winkler I, Tervaniemi M, Naatanen R: Two separate codes for missing-fundamental pitch in the human auditory cortex. *The Journal of the Acoustical Society of America* 1997, 102(2 Pt 1):1072-1082.
 276. Atienza M, Cantero JL: Complex sound processing during human REM sleep by recovering information from long-term memory as revealed by the mismatch negativity (MMN). *Brain Res* 2001, 901(1-2):151-160.
 277. Naatanen R, Paavilainen P, Alho K, Reinikainen K, Sams M: Do Event-Related Potentials Reveal the Mechanism of the Auditory Sensory Memory in the Human-Brain. *Neurosci Lett* 1989, 98(2):217-221.
 278. Naatanen R, Lehtokoski A, Lennes M, Cheour M, Huotilainen M, Iivonen A, Vainio M, Alku P, Ilmoniemi RJ, Luuk A *et al*: Language-specific phoneme representations revealed by electric and magnetic brain responses. *Nature* 1997, 385(6615):432-434.
 279. Horvath J, Czigler I, Jacobsen T, Maess B, Schroger E, Winkler I: MMN or no MMN: No magnitude of deviance effect on the MMN amplitude. *Psychophysiology* 2008, 45(1):60-69.
 280. Hari R, Rif J, Tiihonen J, Sams M: Neuromagnetic mismatch fields to single and paired tones. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 1992, 82(2):152-154.
 281. Rosburg T, Trautner P, Dietl T, Korzyukov OA, Boutros NN, Schaller C, Elger CE, Kurthen M: Subdural recordings of the mismatch negativity (MMN) in patients with focal epilepsy. *Brain* 2005, 128(Pt 4):819-828.
 282. Yuille A, Kersten D: Vision as Bayesian inference: analysis by synthesis? *Trends Cogn Sci* 2006, 10(7):301-308.
 283. Mumford D: On the Computational Architecture of the Neocortex .2. The Role of Corticocortical Loops. *Biol Cybern* 1992, 66(3):241-251.
 284. Friston KJ: Learning and inference in the brain. *Neural Networks* 2003, 16(9):1325-1352.
 285. Friston K: A theory of cortical responses. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 2005, 360(1456):815-836.
 286. Garrido MI, Friston KJ, Kiebel SJ, Stephan KE, Baldeweg T, Kilner JM: The functional anatomy of the MMN: a DCM study of the roving paradigm. *Neuroimage* 2008, 42(2):936-944.
 287. Fuentemilla L, Marco-Pallares J, Munte TF, Grau C: Theta EEG oscillatory activity and auditory change detection. *Brain Res* 2008, 1220:93-101.
 288. Javitt DC, Shelley A, Ritter W: Associated deficits in mismatch negativity generation and tone matching in schizophrenia. *Clin Neurophysiol* 2000, 111(10):1733-1737.

289. Ko D, Kwon S, Lee GT, Im CH, Kim KH, Jung KY: Theta Oscillation Related to the Auditory Discrimination Process in Mismatch Negativity: Oddball versus Control Paradigm. *J Clin Neurol* 2012, 8(1):35-42.
290. Sallinen M, Kaartinen J, Lyytinen H: Is the Appearance of Mismatch Negativity during Stage-2 Sleep-Related to the Elicitation of K-Complex. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 1994, 91(2):140-148.
291. Muller BW, Achenbach C, Oades RD, Bender S, Schall U: Modulation of mismatch negativity by stimulus deviance and modality of attention. *Neuroreport* 2002, 13(10):1317-1320.
292. Arnott SR, Alain C: Stepping out of the spotlight: MMN attenuation as a function of distance from the attended location. *Neuroreport* 2002, 13(17):2209-2212.
293. Otten LJ, Alain C, Picton TW: Effects of visual attentional load on auditory processing. *Neuroreport* 2000, 11(4):875-880.
294. Sussman E, Ritter W, Vaughan HG, Jr.: Attention affects the organization of auditory input associated with the mismatch negativity system. *Brain Res* 1998, 789(1):130-138.
295. Sussman ES, Horvath J, Winkler I, Orr M: The role of attention in the formation of auditory streams. *Perception & psychophysics* 2007, 69(1):136-152.
296. Cusack R, Deeks J, Aikman G, Carlyon RP: Effects of location, frequency region, and time course of selective attention on auditory scene analysis. *Journal of experimental psychology Human perception and performance* 2004, 30(4):643-656.
297. Woldorff MG, Gallen CC, Hampson SA, Hillyard SA, Pantev C, Sobel D, Bloom FE: Modulation of early sensory processing in human auditory cortex during auditory selective attention. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90(18):8722-8726.
298. Umbricht D, Krljes S: Mismatch negativity in schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophrenia research* 2005, 76(1):1-23.
299. Baldeweg T, Klugman A, Gruzelier J, Hirsch SR: Mismatch negativity potentials and cognitive impairment in schizophrenia. *Schizophrenia research* 2004, 69(2-3):203-217.
300. Kreitschmann-Andermahr I, Rosburg T, Demme U, Gaser E, Nowak H, Sauer H: Effect of ketamine on the neuromagnetic mismatch field in healthy humans. *Brain research Cognitive brain research* 2001, 12(1):109-116.
301. Friston KJ, Frith CD: Schizophrenia: a disconnection syndrome? *Clinical neuroscience* 1995, 3(2):89-97.
302. Baldeweg T, Richardson A, Watkins S, Foale C, Gruzelier J: Impaired auditory frequency discrimination in dyslexia detected with mismatch evoked potentials. *Ann Neurol* 1999, 45(4):495-503.
303. Kraus N, McGee TJ, Carrell TD, Zecker SG, Nicol TG, Koch DB: Auditory neurophysiologic responses and discrimination deficits in children with learning problems. *Science* 1996, 273(5277):971-973.

304. Tremblay K, Kraus N, McGee T: The time course of auditory perceptual learning: neurophysiological changes during speech-sound training. *Neuroreport* 1998, 9(16):3557-3560.
305. van Zuijen TL, Simoens VL, Paavilainen P, Naatanen R, Tervaniemi M: Implicit, intuitive, and explicit knowledge of abstract regularities in a sound sequence: an event-related brain potential study. *Journal of cognitive neuroscience* 2006, 18(8):1292-1303.
306. Woods DL: Auditory selective attention in middle-aged and elderly subjects: an event-related brain potential study. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 1992, 84(5):456-468.
307. Pekkonen E, Rinne T, Reinikainen K, Kujala T, Alho K, Naatanen R: Aging effects on auditory processing: an event-related potential study. *Experimental aging research* 1996, 22(2):171-184.
308. Pekkonen E, Jousmaki V, Kononen M, Reinikainen K, Partanen J: Auditory sensory memory impairment in Alzheimer's disease: an event-related potential study. *Neuroreport* 1994, 5(18):2537-2540.
309. Nordberg A, Lilja A, Lundqvist H, Hartvig P, Amberla K, Viitanen M, Warpman U, Johansson M, Hellstromlindahl E, Bjurling P *et al*: Tacrine Restores Cholinergic Nicotinic Receptors and Glucose-Metabolism in Alzheimer Patients as Visualized by Positron Emission Tomography. *Neurobiol Aging* 1992, 13(6):747-758.
310. Knott V, Harr A: Aging, Smoking History, and Erps in Single and Dual-Task Performance. *Psychophysiology* 1995, 32:S47-S47.
311. Riekkinen P, Paakkonen A, Karhu J, Partanen J, Soininen H, Laakso M, Riekkinen P: THA disrupts mismatch negativity in Alzheimer disease. *Psychopharmacology* 1997, 133(2):203-206.
312. Engeland C, Mahoney C, Mohr E, Ilivitsky V, Knott VJ: Acute nicotine effects on auditory sensory memory in tacrine-treated and nontreated patients with Alzheimer's disease - An event-related potential study. *Pharmacol Biochem Be* 2002, 72(1-2):457-464.
313. Ruusuvirta T, Penttonen M, Korhonen T: Auditory cortical event-related potentials to pitch deviances in rats. *Neurosci Lett* 1998, 248(1):45-48.
314. Astikainen P, Ruusuvirta T, Wikgren J, Penttonen M: Memory-based detection of rare sound feature combinations in anesthetized rats. *Neuroreport* 2006, 17(14):1561-1564.
315. Tikhonravov D, Neuvonen T, Pertovaara A, Savioja K, Ruusuvirta T, Naatanen R, Carlson S: Effects of an NMDA-receptor antagonist MK-801 on an MMN-like response recorded in anesthetized rats. *Brain Res* 2008, 1203:97-102.
316. Eriksson J, Villa AEP: Event-related potentials in an auditory oddball situation in the rat. *Biosystems* 2005, 79(1-3):207-212.
317. Harms L, Fulham WR, Todd J, Budd TW, Hunter M, Meehan C, Penttonen M, Schall U, Zavitsanou K, Hodgson DM *et al*: Mismatch Negativity (MMN) in Freely-Moving Rats with Several Experimental Controls. *PloS one* 2014, 9(10).

318. Wasowicz W, Neve J, Peretz A: Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clinical chemistry* 1993, 39(12):2522-2526.
319. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72:248-254.
320. Anand R, Gill KD, Mahdi AA: Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology* 2014, 76 Pt A:27-50.
321. Butterfield DA, Hensley K, Harris M, Mattson M, Carney J: beta-Amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, 200(2):710-715.
322. Bigelow DJ, Squier TC: Redox modulation of cellular signaling and metabolism through reversible oxidation of methionine sensors in calcium regulatory proteins. *Biochimica et biophysica acta* 2005, 1703(2):121-134.
323. Varadarajan S, Kanski J, Aksenova M, Lauderback C, Butterfield DA: Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A beta(1--42) and A beta(25--35). *J Am Chem Soc* 2001, 123(24):5625-5631.
324. Le Bars PL, Katz MM, Berman N, Itil TM, Freedman AM, Schatzberg AF: A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of Ginkgo biloba for dementia. North American EGb Study Group. *Jama* 1997, 278(16):1327-1332.
325. Chkhikvishvili I, Sanikidze T, Gogia N, McHedlishvili T, Enukidze M, Machavariani M, Vinokur Y, Rodov V: Rosmarinic acid-rich extracts of summer savory (*Satureja hortensis* L.) protect Jurkat T cells against oxidative stress. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013, 2013:456253.
326. Fallarini S, Miglio G, Paoletti T, Minassi A, Amoroso A, Bardelli C, Brunelleschi S, Lombardi G: Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in in vitro models of neuronal death. *British journal of pharmacology* 2009, 157(6):1072-1084.
327. Bacanlı M, Aydın S, Taner G, Goktas HG, Sahin T, Basaran AA, Basaran N: Does rosmarinic acid treatment have protective role against sepsis-induced oxidative damage in Wistar Albino rats? *Human & experimental toxicology* 2015.
328. Yeh CT, Yen GC: Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression. *J Nutr* 2006, 136(1):11-15.
329. Kar S, Issa AM, Seto D, Auld DS, Collier B, Quirion R: Amyloid beta-peptide inhibits high-affinity choline uptake and acetylcholine release in rat hippocampal slices. *J Neurochem* 1998, 70(5):2179-2187.
330. Kar S, Slowikowski SPM, Westaway D, Mount HTJ: Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Psychiatr Neurosci* 2004, 29(6):427-441.

331. Fale PL, Borges C, Madeira PJA, Ascensao L, Araujo MEM, Florencio MH, Serralheiro MLM: Rosmarinic acid, scutellarein 4'-methyl ether 7-O-glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* ("falso boldo"). *Food Chem* 2009, 114(3):798-805.
332. Key AP, Dove GO, Maguire MJ: Linking brainwaves to the brain: an ERP primer. *Developmental neuropsychology* 2005, 27(2):183-215.
333. Kazmerski VA, Friedman D, Ritter W: Mismatch negativity during attend and ignore conditions in Alzheimer's disease. *Biol Psychiat* 1997, 42(5):382-402.
334. Pekkonen E: Mismatch negativity in aging and in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Audiol Neuro-Otol* 2000, 5(3-4):216-224.
335. Knott V, Mohr E, Mahoney C, Ilivitsky V: Electroencephalographic coherence in Alzheimer's disease: comparisons with a control group and population norms. *Journal of geriatric psychiatry and neurology* 2000, 13(1):1-8.
336. Babiloni C, Frisoni G, Vecchio F, Lizio R, Pievani M, Geroldi C, Fracassi C, Vernieri F, Ursini F, Rodriguez G *et al*: Global Functional Coupling of Resting EEG Rhythms is Abnormal in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease A Multicenter EEG Study. *J Psychophysiol* 2009, 23(4):224-234.
337. Klinkenberg I, Sambeth A, Blokland A: Cholinergic gating of hippocampal auditory evoked potentials in freely moving rats. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 2013, 23(8):988-997.
338. Pekkonen E, Hirvonen J, Jaaskelainen IP, Kaakkola S, Huttunen J: Auditory sensory memory and the cholinergic system: implications for Alzheimer's disease. *Neuroimage* 2001, 14(2):376-382.

ÖZGEÇMİŞ

Deniz KANTAR GÖK, 1979 yılında Bursa'da doğdu, ilk öğrenimini Ankara'da orta ve lise öğrenimini Antalya'da tamamladı. 1998 yılında Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fizik Mühendisliği Bölümü'nde üniversite eğitimine başladı. Lisans diplomasını 2005 yılında aldı ve 2007 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Yüksek Lisans diplomasını 2010 yılında aldı ve 2010 yılında aynı bölümde Doktora eğitimine başladı. Yabancı dili İngilizce'dir.