



**ALZHEİMER RAT MODELİNDE TAURİN UYGULAMASININ BİLİŞSEL
FONKSİYONLAR, APOPTOZ, MİKRORNA-34A, İNFLAMASYON VE
OKSİDATİF STRES BELİRTEÇLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Burak KAYABAŞI

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. SİBEL DİNÇER**

AĞUSTOS 2023

**ALZHEİMER RAT MODELİNDE TAURİN UYGULAMASININ BİLİŞSEL
FONKSİYONLAR, APOPTOZ, MİKRORNA-34A, İNFLAMASYON VE
OKSİDATİF STRES BELİRTEÇLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Burak KAYABAŞI

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. SİBEL DİNÇER**

**Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TTU-2022-7774 proje numarasıyla desteklenmiştir.**

AĞUSTOS 2023

TEZ SINAV TUTANAĞI



Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tez Sınav Tutanağı

Adı ve Soyadı	Burak Kayabaşı
Baba Adı	[REDACTED]
Doğum Yeri/Tarihi	[REDACTED]
Diploma Tarihi / Diploma No	[REDACTED]
Mezun Olduğu Fakülte	[REDACTED]
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	Fizyoloji AD
İhtisas Süresi	[REDACTED] [REDACTED]
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	[REDACTED]
Sınav Tarihi	[REDACTED]

UZMANLIK TEZİNİN ADI: Alzheimer Rat Modelinde Taurin Uygulamasının Bilişsel Fonksiyonlar, Apoptoz, MikroRNA-34a, İnflamasyon Ve Oksidatif Stres Belirteçleri Üzerine Etkisi

JÜRİ KARARI:

JÜRİ ÜYELERİ

BAŞKAN

ÜYE

ÜYE

TEŞEKKÜR

Türkiye Cumhuriyeti'nin kurucusu olan, ülkemizin bağımsızlığını koruyarak bilimin var olabildiği çağdaş bir devlet haline gelmemize öncülük eden atamız Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK'e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunuyorum. Bir Türk genci olarak açtığı yolda, gösterdiği hedefe durmadan yürüyeceğime söz veriyorum.

Hem lisans öğrenciliğim yıllarında hem de uzmanlık eğitimim süresince derin bilgi ve tecrübeleriyle yoluma ışık tutan, öğrencisi olmaktan her zaman onur duyduğum ve değerlerini örnek aldığım; beni sıradan bir öğrenci olmaktan çıkarıp, gerçek bir bilim insanı olarak yetiştiren akademik yol göstericim olan değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Sibel DİNÇER'e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Bir ferdi olmaktan ve hizmet etmekten gurur duyduğum Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD.'nın öğretim üyeleri olarak engin akademik bilgilerini benimle paylaşan ve üzerimde emekleri olan; Prof. Dr. K. Gonca AKBULUT, Prof. Dr. Çiğdem ÖZER, Prof. Dr. Şevin GÜNEY, Dr. Öğr. Üyesi A. Meltem SEVGİLİ ve Öğr. Gör. Dr. Pelin TÜRKKAN hocalarıma; western blot tekniği uygulamalarında yardımını esirgemeyen ve çalışmama destek olan Dr. Öğr. Üyesi Nida ASLAN KARAKELLE'ye; histolojik çalışmalarımızın yapılmasında emeği geçen ve destek olan Dr. Öğr. Üyesi Zeynep YİĞMAN ve Çisem YEŞİL KAYABAŞI'ya; Morris Su Tankı testi uygulamalarında deneyimlerini benimle paylaşan ve cihaz donanımlarıyla bana destek veren Tıbbi Biyoloji AD öğretim üyesi Prof. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM'a teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Her koşulda yanımda olan, karşılaştığım engeller karşısında yoluma ışık tutup beni cesaretlendiren canım eşim Çisem'e, hayatım boyunca desteklerini her zaman hissettiğim; akademi dünyasını keşfetmemi sağlayan ve rol modelim olan, üzerimde çokca emeği olan annem Prof. Dr. Nuran KAYABAŞI'ya, her zaman arkamda olduğunu bildiğim en büyük destekçim babam Kadir KAYABAŞI'ya, varlıkları güç veren kardeşlerim Dr. Berkay KAYABAŞI ve Batuhan ERDOĞAN'a, öğrettiklerine müteşekkir olduğum ebedi hocam Müzeyyen KOCA'ya teşekkür ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	iv
ÇİZELGE VE TABLOLARIN LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
ÖZET	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Alzheimer Hastalığı	5
2.1.1 Alzheimer Hastalığının Tarihçesi, Epidemiyolojisi ve Etyolojisi	5
2.1.2. Alzheimer Hastalık Patogenezi ve Öne Sürülen Hipotezler	9
2.1.3. Alzheimer Hastalığı ve Apoptozis	15
2.1.4. Alzheimer Hastalığı ve Oksidatif Stres.....	19
2.1.5. Alzheimer Hastalığı ve İnflamasyon	21
2.1.6. Alzheimer Hastalığında Deneysel Modeller	23
2.2. miRNA.....	25
2.2.1. Genel Bilgiler.....	25
2.2.2. Alzheimer Hastalığı ve miRNA'lar	25
2.2.3. miR-34a'nın Alzheimer Hastalığındaki Yeri.....	26
2.3. Taurin.....	28
2.3.1. Genel Bilgiler.....	28
2.3.2. Taurin ve Apoptozis.....	29
2.3.3. Taurin ve miR-34a	30

	Sayfa
2.3.4. Taurin ve Oksidatif Stres	30
2.3.5. Taurin ve İnflamasyon	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1. Gereç.....	33
3.1.1. Deney Hayvanları	33
3.1.2. Kullanılan Laboratuvar Aletleri ve Cihazları	33
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar, Antikorlar ve Kitler	35
3.1.4. Kullanılan Çözeltiler.....	36
3.2. Yöntem.....	39
3.2.1. Deney Grupları ve Deney Planı	39
3.2.2. Amiloid Beta 1-42 Oligomerizasyonunun Gösterilmesi.....	40
3.2.3. Stereotaksik Cerrahi İşlem.....	41
3.2.4. Taurin Uygulaması.....	43
3.2.5. Morris Su Tankı (MST) Testi	44
3.2.6. Western Blot Yöntemi	47
3.2.7. qPCR Testi.....	52
3.2.8. ELISA, TAS-TOS, MDA ve GSH Testleri	54
3.2.9. Kongo Red Boyama.....	58
3.2.10 İstatistiksel Analiz.....	60
4. BULGULAR	61
4.1. Sıçanların Beden Ağırlık Değişimleri.....	61
4.2. Amiloid Beta 1-42'nin Oligomerizasyonunun Gösterilmesi	61
4.3. Morris Su Tankı (MST) Testi Sonuçları.....	63
4.4. Western Blot Sonuçları	68
4.5. miR-34a (qPCR) Sonuçları.....	73
4.6. TAS ve TOS Sonuçları	75

	Sayfa
4.7. MDA ve GSH Sonuçları	81
4.8. ELISA Sonuçları	86
4.9. Korelasyon Analizleri	92
4.10. Kongo Red Boyama Sonuçları	94
5. TARTIŞMA	97
6. SONUÇ, KISITLILIKLAR VE ÖNERİLER	111
6.1. Sonuç	111
6.2. Kısıtlılıklar	112
6.3. Öneriler	113
KAYNAKLAR	115
EKLER	133
EK-1. Etik Kurul Onayı	134
ÖZGEÇMİŞ	136

ÇİZELGE VE TABLOLARIN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3-1 Kullanılan Laboratuvar Aletleri ve Cihazları	33
Çizelge 3-2 Kullanılan Kimyasallar.....	35
Çizelge 3-3 Kullanılan Antikorlar ve Kitler	36

Tablo	Sayfa
Tablo 4-1 Sıçan Ağırlıkları İstatistiksel Analizler	61
Tablo 4-2 MST Testi (14.-18. günler) Kaçış Latans Süreleri	63
Tablo 4-3 MST Testi (14.-18. günler) 5.Gün Hedef Kadrandaki Geçirilen Süreler.....	64
Tablo 4-4 MST Testi (28.-32. Günler) Kaçış Latans Süreleri	66
Tablo 4-5 MST Testi (28.-32. günler) 5.Gün Hedef Kadrandaki Geçirilen Süreler.....	67
Tablo 4-6 Bax Proteinini (Western Blot) İstatistiksel Veriler	69
Tablo 4-7 Bcl-2 Proteinini (Western Blot) İstatistiksel Veriler	70
Tablo 4-8 Aktif Kaspaz-3 Proteinini (Western Blot) İstatistiksel Veriler	71
Tablo 4-9 Bax/Bcl-2 Oranı (Western Blot) İstatistiksel Veriler	72
Tablo 4-10 miR-34a (Plazma) İstatistiksel Veriler	74
Tablo 4-11 miR-34a (Beyin) İstatistiksel Veriler	75
Tablo 4-12 Serum OSI İstatistiksel Veriler	76
Tablo 4-13 Beyin OSI İstatistiksel Veriler	77
Tablo 4-14 Serum TOS İstatistiksel Veriler	78
Tablo 4-15 Serum TAS İstatistiksel Veriler	79
Tablo 4-16 Beyin TOS İstatistiksel Veriler	80
Tablo 4-17 Beyin TAS İstatistiksel Veriler	81
Tablo 4-18 Beyin MDA İstatistiksel Veriler	82
Tablo 4-19 Serum MDA İstatistiksel Veriler.....	83
Tablo 4-20 Beyin GSH İstatistiksel Veriler.....	84

Tablo	Sayfa
Tablo 4-21 Serum GSH İstatistiksel Veriler.....	85
Tablo 4-22 Serum TNF- α İstatistiksel Veriler.....	86
Tablo 4-23 Beyin TNF- α İstatistiksel Veriler.....	87
Tablo 4-24 Serum IL-1 β İstatistiksel Veriler.....	88
Tablo 4-25 Beyin IL-1 β İstatistiksel Veriler.....	89
Tablo 4-26 Serum IL-10 İstatistiksel Veriler.....	90
Tablo 4-27 Beyin IL-10 İstatistiksel Veriler.....	91
Tablo 4-28 Plazma miR-34a-Bcl-2 Korelasyon Analizi.....	92
Tablo 4-29 Beyin IL-10-Bcl-2 Korelasyon Analizi.....	92
Tablo 4-30 Beyin TOS-Bax Korelasyon Analizi.....	92
Tablo 4-31 Serum OSI-Beyin OSI Korelasyon Analizi	93
Tablo 4-32 Beyin IL-10-Bax Korelasyon Analizi	93

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2-1 Toksik Amiloid Beta Oluşma Mekanizması	11
Şekil 2-2 Amiloid Beta Kaskad Hipotezine Göre Hastalık Patogenez Süreci.....	12
Şekil 2-3 Alzheimer Hastalığında Apoptotik Süreç.....	16
Şekil 2-4 Oksidatif Stres ve Alzheimer Hastalığı.....	20
Şekil 2-5 Nöroinflamasyon ve Alzheimer Hastalığı.....	22
Şekil 2-6 A β aracılı Alzheimer Benzeri Hastalık Modeli Oluşturulması	24
Şekil 2-7 Taurin ve Etkileri.....	29
Şekil 3-1 Deney Takvimi.....	40
Şekil 3-2 Paxinos atlası, Lateral Ventriküller.....	43
Şekil 4-1 MST Testi (14.-18. günler) Kaçış Latans Sürelerimin Günlere Göre Değişimi	64
Şekil 4-2 MST Testi (14.-18. günler) 5.Gün Hedef Kadranda Geçirilen Süreler.....	65
Şekil 4-3 MST Testi (28.-32. günler) Kaçış Latans Süreleri	66
Şekil 4-4 MST Testi (28.-32. günler) Kaçış Latans Sürelerinin Günlere Göre Değişimi	66
Şekil 4-5 MST Testi (28.-32. günler) 5.Gün Hedef Kadranda Geçirilen Süreler.....	68
Şekil 4-6 Bax Proteini (Western Blot).....	69
Şekil 4-7 Bcl-2 Proteini (Western Blot).....	70
Şekil 4-8 Aktif Kaspaz-3 (Cleaved Caspase-3) Proteini (Western Blot).....	71
Şekil 4-9 Bax/Bcl-2 Oranı (Western Blot).....	73
Şekil 4-10 Plazma miR-34a	74
Şekil 4-11 Beyin miR-34a	75
Şekil 4-12 Serum OSI.....	76
Şekil 4-13 Beyin OSI.....	77
Şekil 4-14 Serum TOS.....	78
Şekil 4-15 Serum TAS.....	79

Şekil	Sayfa
Şekil 4-16 Beyin TOS	80
Şekil 4-17 Beyin TAS	81
Şekil 4-18 Beyin MDA	82
Şekil 4-19 Serum MDA	83
Şekil 4-20 Beyin GSH	84
Şekil 4-21 Serum GSH.....	85
Şekil 4-22 Serum TNF- α	86
Şekil 4-23 Beyin TNF- α	87
Şekil 4-24 Serum IL-1 β	88
Şekil 4-25 Beyin IL-1 β	89
Şekil 4-26 Serum IL-10	90
Şekil 4-27 Beyin IL-10	91

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2-1 A: Dr. Alois Alzheimer; B: Auguste Deter; C: Orijinal Postmortem Gümüş Boyamalı Histolojik Kesitler; D: Plak (Auguste Deter'in beyin kesiti); E: Nörofibriler Yumak	6
Resim 2-2 a: Oskar Fischer ve b: Nöritik Plak Evrelemesi	7
Resim 3-1 Yapılan Stereotaksik Cerrahiye Ait Görsel	42
Resim 3-2 Metilen mavisi ile stereotaksik koordinat doğrulaması.....	43
Resim 3-3 Çalışmaya Ait Oral (Gavaj ile) Taurin Uygulamalarına Ait Görsel	44
Resim 3-4 Çalışmaya Ait Morris Su Tankı Testi Görselleri.....	46
Resim 3-5 Western Blot Aşamaları	49
Resim 3-6 Western Blot Aşamaları	50
Resim 3-7 Elisa Yöntemine Ait Mikroplate Görseli.....	56
Resim 3-8 TAS ve TOS Çalışmasına Ait Görsel.....	57
Resim 4-1 PBS Büyüklükçe Ayırıcı Kromatografi Görüntüsü.....	62
Resim 4-2 Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi Sonucu	62
Resim 4-3 Beta Aktin Proteinine Ait Bant Görüntüleri (Western Blot).....	68
Resim 4-4 Bax Proteinine Ait Bant Görüntüleri (Western Blot).....	69
Resim 4-5 Bcl-2 Proteinine Ait Bant Görüntüleri (Western Blot)	70
Resim 4-6 Aktif Kaspaz-3 Proteinine Ait Bant Görüntüleri (Western Blot).....	72
Resim 4-7 Amiloid depozisyonunu gösteren temsili beyin mikrografları.....	94
Resim 4-8 Amiloid plaklarını gösteren temsili beyin mikrografları.....	95

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamalarıyla birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
Dk	Dakika
gr	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
mA	Miliamper
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mM	Milimetre
Ng	Nanogram
nm	Nanometre
sn	Saniye
V	Volt
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
ε	Epsilon
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre

Kısaltmalar	Açıklamalar
Apaf-1	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1
APOE4	Apolipoprotein E
APP	Amiloid Prekürsör Protein
APS	Amonyum Persülfat

Kısaltmalar	Açıklamalar
A β	Amiloid Beta
BACE-1	β -site APP-cleaving enzyme 1, Beta sekretaz 1
BSA	Bovine Serum Albumin
ECL	Enhanced Chemilluminescence
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GSH	Glutasyon
GÜDAM	Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HRP	Horse Radish Peroxidase
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
ihp	intrahipokampal
isv	intraserebroventriküler
LPS	Lipopolisakkarit
MDA	Malondialdehit
MERLAB	Merkez Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi
miRNA	MikroRNA
MST	Morris Su Tankı
mtDNA	Mitokondriyal DNA
NO	Nitrik Oksit
oA β 1-42	Oligomerik Amiloid Beta 1-42
$\cdot$ OH	Hidroksil radikali
OSI	Oksidatif Stres İndeksi
PBS	Phosphate Buffered Saline
PS	Presenilin
PSEN1	Presenilin 1
PSEN2	Presenilin 2
qPCR	Quantitative real-time PCR
rno-miR-34a	Sıçan miR-34a
rpm	Dakikada dönüş sayısı
sAPP α	Çözünür Amiloid Prekürsör Protein Alfa
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat

Kısaltmalar	Açıklamalar
SEC	Büyükölükçe Ayırma Kromatografisi
STZ	Streptozotosin
TAS	Total Antioksidan Seviye
TCA	Trikarboksilik Asit
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
TGF	Transforme Edici Büyüme Faktörü
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TOS	Total Oksidan Seviye
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu



ÖZET

Amaç: Çalışmamızda intraserebroventriküler (isv) Amiloid Beta 1-42 (A β 1-42) uygulaması ile sıçanlarda oluşturulmuş Alzheimer benzeri hastalık modelinde taurinin; öğrenme-bellek, apoptoz, miR-34a, oksidatif stres ve inflamasyon üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç-Yöntem: Wistar Albino cinsi 30 adet erkek sıçan; kontrol, taurin, A β 1-42 ve A β 1-42+taurin olmak üzere dört gruba ayrıldı. A β 1-42 ilgili gruplara isv (bilateral, toplam:10 μ g/10 μ l) olacak şekilde uygulandı. İsv A β 1-42 uygulamaları sonrasında taurin de ilgili gruplara 250 mg/kg/gün olacak şekilde oral (gavaj ile), 32 gün boyunca verildi. 14.-18.günler ve 28.-32.günler arasında iki kere Morris Su Tankı (MST) testi yapıldı. 33. günde kurban edilen hayvanların beyin dokularında proapoptotik bax, aktif kaspaz-3 (cleaved caspase-3) ve antiapoptotik bcl-2 proteinleri Western blot yöntemiyle, bcl-2 gibi antiapoptotik proteinlerle ilişkisi bulunan ve genellikle apoptotik etkili olduğu düşünülen miR-34a, qPCR ile değerlendirildi. Bunlara ek olarak total oksidan seviye (TOS), total antioksidan seviye (TAS), malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) gibi oksidatif süreçle ilişkili parametreler ve TNF- α , IL-1 β ve IL-10 gibi inflamatuvar süreçle ilişkili parametreler ELISA ve kolorimetrik yöntemler gibi spektrofotometrik analizlerle çalışıldı.

Bulgular: 14.-18. günler arasında yapılan MST testi 5.günde A β 1-42 grubunun hedef kadranda geçirdiği (probe test) sürenin, kontrol grubuna göre anlamlı olarak kısa olduğu ($p<0,05$), 28.-32. günler arasında yapılan MST testin 3. ve 4. gününde A β 1-42 grubunun kaçış latansı sürelerinin, kontrol grubuna göre anlamlı olarak uzun olduğu görüldü ($p<0,05$); ancak taurin tedavisi uygulanmış olan A β 1-42 grubunda, kontrol grubuna göre fark saptanmadı ($p>0,05$). Ayrıca ikinci MST testinin 5.gün probe test süresinin hem A β 1-42 hem de taurin uygulanmış olan A β 1-42 grubunda kontrol grubuna göre kısa olduğu görüldü ($p<0,05$). Bax ve aktif kaspaz-3 proteinleri A β 1-42 grubunda kontrol grubuna göre yüksek iken, bcl-2 seviyeleri düşüktü ($p<0,05$). Taurin tedavisi uygulanmış A β 1-42 grubu, A β 1-42 ile kıyaslandığında bax ve aktif kaspaz-3 seviyelerinin taurin ile azaldığı, bcl-2'nin de arttığı görüldü ($p<0,05$). Plazma miR-34a seviyelerinin A β 1-42 uygulaması ile azaldığı, beyin miR-34a seviyelerinin ise değişmediği saptandı. A β 1-42 uygulaması serum TOS ve beyin MDA düzeylerini arttırdı ($p<0,05$). Taurin uygulanan A β 1-42 grubunda beyin IL-10 seviyeleri, A β 1-42 grubuna göre yüksek bulundu ($p<0,05$).

Sonuç: Taurin; daha ileri çalışmalarla desteklendiği takdirde, antiapoptotik, antioksidan ve anti-inflamatuvar etkileriyle, Alzheimer ve benzeri ilerleyici demans durumlarında, öğrenme ve bellek fonksiyonlarındaki bozulmayı hafifletici bir ajan olarak profilaktik ya da destek tedavi protokollerinde kendine yer bulabilir.

Anahtar Kelimeler: alzheimer hastalığı, taurin, amiloid beta 1-42, miR-34a, morris su tankı testi, apoptoz, oksidatif stres, nöroinflamasyon

ABSTRACT

Objective: In our study, we aim to evaluate the effects of taurine on learning and memory, apoptosis, miR-34a, oxidative stress and inflammation in Alzheimer's-like disease model induced by intracerebroventricular (icv) administration of Amyloid Beta 1-42 (A β 1-42) in rats.

Methods: 30 male Wistar Albino rats were divided into four groups as control, taurine, A β 1-42 and A β 1-42+taurine. Icv A β 1-42 (bilateral, total: 10 μ g/10 μ l) was administered to related groups. After icv A β 1-42 administrations, taurine was administered to related groups via oral gavage at dose 250 mg/kg/day for 32 days. Morris Water Maze (MWM) test was performed twice between days 14-18 and 28-32. On day 33, rats were sacrificed. After that proapoptotic bax, cleaved caspase-3 and antiapoptotic bcl-2 proteins were analyzed by Western Blot technique in the brain tissues. miR-34a, which is associated with antiapoptotic proteins such as bcl-2 and is generally considered to have apoptotic effects, was analyzed by qPCR. Oxidative process parameters such as total oxidant level (TOS), total antioxidant level (TAS), malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) and inflammatory process parameters such as TNF- α , IL-1 β and IL-10 were evaluated by spectrophotometric assays such as ELISA and colorimetric methods.

Results: On 5th day of the MWM test performed between days 14-18, the time spent in the target quadrant (probe test) of the A β 1-42 group was significantly shorter than the control group ($p < 0,05$), and on 3rd and 4th days of the MWM test performed between days 28-32, the escape latency times of the A β 1-42 group were significantly longer than the control group ($p < 0,05$); however, these findings were not significant in the taurine administered A β 1-42 group compared to the control group ($p > 0,05$). In addition, the probe test duration on 5th day of the second MWM test was shorter in both A β 1-42 and taurine administered A β 1-42 groups compared to the control group ($p < 0,05$). Bax and cleaved caspase-3 proteins were higher in the A β 1-42 group compared to the control group, while bcl-2 protein levels were lower ($p < 0,05$). Compared to A β 1-42, in the taurine administered A β 1-42 group, bax and active caspase-3 levels decreased and bcl-2 increased due to taurine ($p < 0,05$). Plasma miR-34a levels decreased with A β 1-42 administration, whereas brain miR-34a levels were unchanged. A β 1-42 administration increased serum TOS and brain MDA levels ($p < 0,05$). Brain IL-10 levels were higher in the taurine administered A β 1-42 group compared to the A β 1-42 group ($p < 0,05$).

Conclusion: Taurine, if supported by further studies, may be included in prophylactic or supportive treatment protocols with its antiapoptotic, antioxidant and anti-inflammatory effects as an agent to alleviate the deterioration in learning and memory functions in Alzheimer's and similar progressive dementia conditions.

Keywords: alzheimer's disease, taurine, amyloid beta 1-42, miR-34a, morris water maze test, apoptosis, oxidative stress, neuroinflammation

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nörodejenerasyonla ilişkili demans nedeni olan Alzheimer hastalığı önemli bir mortalite ve morbidite sebebidir ve artan ortalama yaşam süresi ile görülme sıklığında artış gözlenmektedir. Milyonlarca kişiyi ve bu kişilere bakmakla yükümlü olan milyonlarca aileyi ilgilendiren önemli sosyoekonomik etkileri bulunmaktadır. Yaş, Alzheimer hastalığı için en önemli risk faktörüdür ve 65 yaşından sonraki her 5 yılda bir Alzheimer hastalığına yakalanma riski iki katına çıkmaktadır (Oboudiyat, Glazer, Seifan, Greer, & Isaacson, 2013).

Başlangıç semptomları genellikle hafıza kaybı ve bilişsel bozukluk olan Alzheimer hastalığında patolojik değişiklikler, hastalığın ilk semptomları çıkmadan yıllar önce başlamaktadır. Temel patolojisinde hücre dışı toksik amiloid oligomer ve protein birikimi, hiperfosforile tau tarafından oluşturulmuş hücre içi nörofibriler yumak yapıları, nöronal ve sinaptik kayıplar yer almaktadır (Newcombe et al., 2018). Hastalığın patolojisinde apoptotik yollar (V. K. Sharma, Singh, Singh, Garg, & Dhiman, 2021), oksidatif (W. Y. Wang, Tan, Yu, & Tan, 2015) ve inflamatuvar süreçler (Newcombe et al., 2018) önemli rol oynamaktadır. Patolojik değişikliklerin, ilk semptom başlangıcından yıllar önce başladığı Alzheimer hastalığı ile ilgili olan bu mekanizmaların açıklığa kavuşturulması hastalığın erken tanısı ve tedavisi konusunda önem arz etmektedir.

mikroRNA (miRNA)'lar kodlanmayan RNA molekülleridir. Hücre farklılaşması, proliferasyon, hayatta kalma mekanizmaları ve daha birçok yolla ilişki halindedir. Hedef mesajcı RNA (mRNA)'ya bağlanarak, mRNA üzerinde transkripsiyonel inhibisyon ve degradasyona yol açarak etkilerini göstermektedir (Rupaimoole & Slack, 2017).

Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere farklı birçok hastalıkta miRNA'larda değişiklikler gözlenmektedir (Quinlan, Kenny, Medina, Engel, & Jimenez-Mateos, 2017). Alzheimer hastalık patogenezinde de yer alan birçok mekanizma ile ilişkili olan miRNA'ların değişikliklerinin saptanması hem hastalık patogenezinin aydınlatılmasında hem de hastalıkla ilgili biyobelirteç araştırma çalışmalarında son yıllarda önemli yer tutmaktadır. Alzheimer hastalığında değişiklik gösteren miRNA'ların hedef genleri arasında hücre siklusu, hücre yaşlanması, strese hücre yanıtı, bağışıklık sistemi ve sinir büyüme faktörü genleri olup, bu genlerle ilişkili sinyal yolları dahil olmak üzere

birçok hastalık patogeneğinde yer alabilen yollarla ilişkisi olduğu gösterilmiştir (Swarbrick, Wragg, Ghosh, & Stolzing, 2019).

MikroRNA-34a (miR-34a)'nın Alzheimer hastalık modelinde ve SH-SY5Y hücre kültüründe bcl-2'yi inhibe ettiği ve böylece Alzheimer hastalık patogeneğinde önemli yer tutan apoptotik süreçlerle de ilişkisi olduğu bilinmektedir (X. Wang et al., 2009).

Çalışmamızda terapötik etkisini değerlendirmeyi amaçladığımız taurin aminoasidi (2-aminoetansülfonik asit) osmoregülatör, nöromodülatör, antiapoptotik, antioksidan ve anti-inflamatuar özellikleri ile bilinen yarı esansiyel bir aminoasittir (Baliou et al., 2021).

Taurin yanlış katlanmış olan proteinlerin stabilite ve işlevselliklerini yeniden kazanması için yeniden ve uygun şekilde katlanmasına yardımcı olur. Ayrıca hücre zarının yapısal bütünlüğünün korunmasını sağlayarak Alzheimer hastalık patogeneğinde yer alan hücre içi kalsiyum artışının neden olduğu apoptozu da azaltır (Bhat et al., 2020).

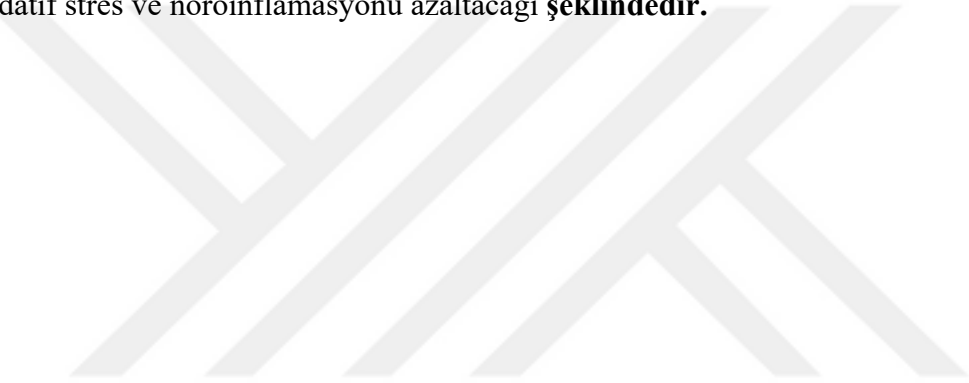
Taurinin, miR-34a üzerine olan etkisinin değerlendirildiği bir hücre kültürü çalışmasında, H₂O₂ uygulaması sonucunda miR-34a gen ekspresyonu artmış, ancak öncesinde taurin verilen daha sonra H₂O₂ uygulanan gruplarda miR-34a gen ekspresyonunda düşüş gözlenmiştir. Taurin verilen grupta H₂O₂ aracılığıyla uyarılmış olan apoptozun da, taurin tedavisi ile azaldığı gözlenmiştir (Cheleschi et al., 2017).

Çalışmamızda sıçanlarda intraserebroventriküler (isv) Amiloid Beta 1-42 (A β 1-42) uygulamasıyla oluşturulmuş deneysel Alzheimer benzeri hastalık modelinde;

- Taurinin, öğrenme ve bellek gibi bilişsel fonksiyon değişiklikleri üzerine olan etkilerinin gözlemlenmesi;
- Apoptotik süreçlerde meydana gelen değişikliklerin incelenip, apoptotik sürecin miR-34a ile olan ilişkisinin ve taurinin bu süreçler üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesi;
- miR-34a'nın kan ve beyin dokusundaki değişiminin gözlenip, hastalığın tanısında olası bir biyobelirteç olarak kullanımıyla ilgili olarak literatüre katkıda bulunulması;
- Oksidatif ile inflammatuar süreçlerin ve taurinin bu süreçler üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Hipotezlerimiz;

Sıçanlarda isv A β 1-42 uygulaması ile oluşturulan Alzheimer benzeri hastalık modelinde;

- öğrenme ve bellek gibi bilişsel fonksiyonların bozulacağı,
 - apoptotik, oksidatif ve nöroinflamatuvar süreçlerin gelişeceği,
 - apoptotik süreçlerle ilişkili olan miR-34a'nın plazma ve beyin seviyelerinde değişiklik olacağı, bu nedenle de Alzheimer hastalığında bir biyobelirteç olma potansiyeli olduğu,
- Taurinin ise, A β 1-42'nin neden olduğu;
- öğrenme ve bellek gibi bilişsel fonksiyonlarda meydana gelen olası bozukluğu düzelteceği,
 - apoptozu engelleyeceği ve miR-34a seviyelerinde oluşan olası değişiklikleri düzelteceği,
 - oksidatif stres ve nöroinflamasyonu azaltacağı **şeklindedir.**
- 



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Nörodejenerasyonla ilişkili demans nedeni olan Alzheimer hastalığı, Amiloid Beta (A β) içeren hücre dışı plaklar ve tau içeren hücre içi nörofibriler yumaklarla karakterize, bilişsel ve davranışsal bozuklukların izlendiği, sinsi başlangıçlı ve ilerleyici nitelikte bir nörodejeneratif bozukluktur (Knopman et al., 2021).

2.1.1 Alzheimer Hastalığının Tarihçesi, Epidemiyolojisi ve Etyolojisi

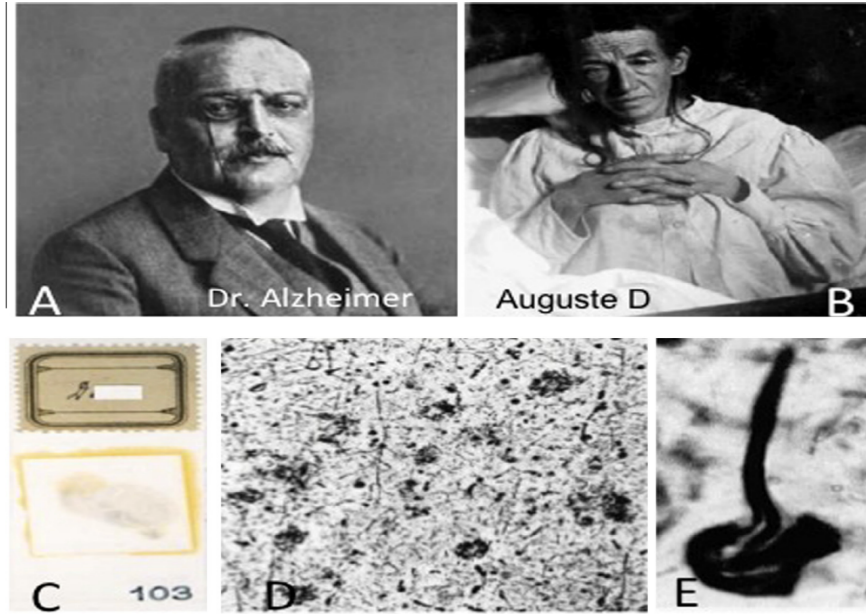
Tarihçesi

Alzheimer hastalığının tanımlanmasından önce 1889 yılında Beljahow, senil demansta sinir hücresi dejenerasyonunu tanımlamakla birlikte, ifadelerinden bazıları plak ve yumakları tanımlıyormuş gibi çeşitli şekillerde yorumlanmıştır. 1892 yılında, Paris Salpetriere Hastanesinde çalışan Paul Blocq ve Georges Marinescu, epilepsi hastalığına sahip olan yaşlı bir hastaya ait beyin dokusunda yuvarlak yığınlar tespit etmişlerdir. Bu yığınların önemine dair net bir açıklama yapmamış olmakla birlikte bunların glial skleroz nodüllerine karşılık geldiğini düşünmüşlerdir. 1898 yılında Viyana Üniversitesi İkinci Psikiyatri Kliniği'nde çalışan Emil Redlich senil demans vakalarında milier sklerozu tanımlamıştır. Bu yapıları da “plak” olarak adlandırmıştır. 78 yaşındaki ileri seviyede demansı olan bir hastanın beyninde histopatolojik değerlendirmede temporal ve frontal lobda belirgin olmak üzere beyin boyutunda küçülme ve farklı boyutlarda, merkezinde çekirdek olan, fibröz materyal içeren plakları saptadı. Bu yapılar çoğunlukla fibröz materyal içerdiğinden bunun bir tür glial hücreye karşılık geldiğini ve bunun sinir hücresi dejenerasyonuna ikincil gelişmiş olabileceğini düşünmekteydi (Blocq & Marinescu, 1892; Goedert, 2009; Redlich, 1898).

Alzheimer hastalığının tanımlanmasında önemli bir yeri olan psikiyatri uzmanı Dr. Alois Alzheimer ise çalışmalarını nöropatoloji alanında sürdürmüştür. 1901 yılında öz bakımında azalma şikayeti bulunan, yönelim ve bellek bozukluğu bulguları olan Auguste Deter isimli 51 yaşındaki hasta ile karşılaşmıştır. Belirtileri ve bilişsel bozuklukları zamanla ilerleyen Auguste Deter 1906 yılında vefat etmiştir. Alois Alzheimer, vefatından sonra Auguste Deter'in beynini otopsi ile incelemiştir (Selekler, 2010) (Resim 2.1.).

Alois Alzheimer, Bielschowksy'nin gümüş boyama tekniğini kullanarak nöronal dejenerasyonu saptamış, serebral kortekste hücre sayısında azalma olduğunu, nöronların arasında fibril yumakları olduğunu (nörofibriler yumaklar) ve korteks üzerinde yaygın gümüş boyama odakları olduğunu (senil plaklar) göstermiştir (Zilka & Novak, 2006). Bu gelişme bu iki patolojinin bir arada gösterilmesi açısından önem arz etmektedir.

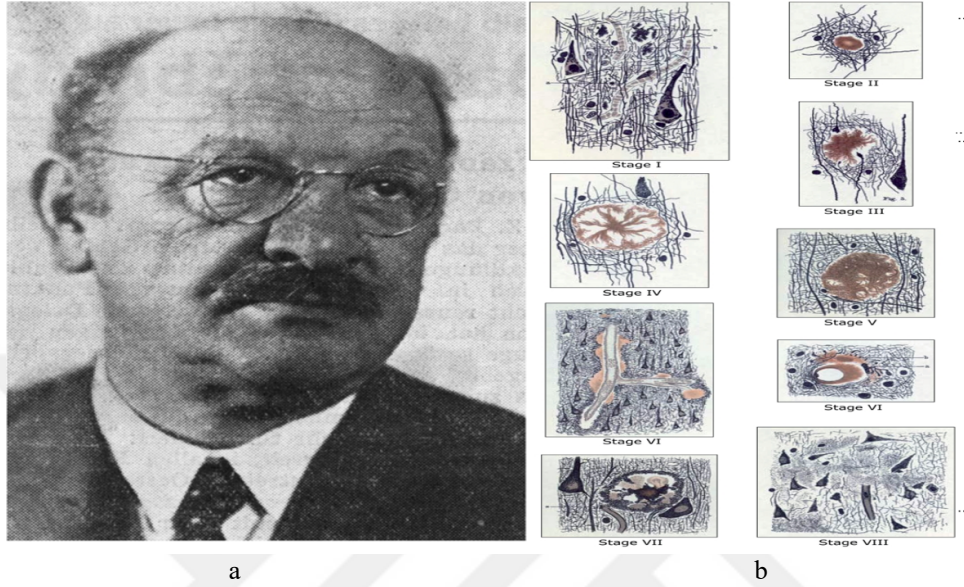
Alois Alzheimer Auguste Deter vakasını 1906 yılında Tübingen'de yapılan 37. Güney-Batı Alman Psikiyatristler Kongresi'nde "Über einen eigenartigen, schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde" yani "Serebral Korteksin Kendine Özgü Şiddetli Hastalık Süreci" ismiyle sunmuştur. 1907 yılında ilgili vakasını kısa bir özet şeklinde "Über eigenartige Erkrankung der Hirnrinde" yani "Serebral Korteksin Özgün Bir Hastalığı" adıyla yayınlamıştır (Alzheimer, 1907; Hippus & Neundörfer, 2003). Alzheimer'ın klinik şefliğini de yapmış olan Emil Kraepelin 1910 yılında yayınlamış olduğu Klinik Psikiyatri kitabında "Alzheimer Hastalığı" terimini kullanmıştır (Selekler, 2010).



Resim 2-1 A: Dr. Alois Alzheimer; B: Auguste Deter; C: Orijinal Postmortem Gümüş Boyamalı Histolojik Kesitler; D: Plak (Auguste Deter'in beyin kesiti); E: Nörofibriler Yumak (Auguste Deter'in beyin kesiti) (Mufson et al., 2015)

Diğer yandan Oskar Fischer isimli araştırmacı, Alois Alzheimer ile eş zamanlı olarak 1907 yılında, 12 vakada senil plakların varlığını tanımladığı bir seriyi yayınladı. Fischer; Blocq, Marinescu ve Redlich'in aksine plakların glial kökenli olduğunu düşünmüyordu ve nöritik

plak kavramını öne sürdü. Fischer 1910 yılında yayınladığı makalesinde nörofibriller yumakları tanımlamakla birlikte plak yapılarının evrelendirmesiyle ilgili tanımlamalarını da paylaştı (Fischer, 1907, 1910; Goedert, 2009)(Resim 2.2.).



Resim 2-2 a: Oskar Fischer, 1936 yılı (Goedert, 2009) ve b: Nöritik Plak Evrelemesi (Fischer, 1910)

Epidemiyolojisi ve Etyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre dünya çapında 55 milyondan fazla demans hastasının olduğu ve her yıl yaklaşık 10 milyondan fazla yeni vakanın saptandığı bildirilmektedir. Bu demans hastalarının yaklaşık %60-70'ini Alzheimer hastalığına bağlı demans tablosu oluşturmaktadır. Dünya çapında en sık ölüme neden olan hastalıklar değerlendirildiğinde demans 7. sırada yer almaktadır (WHO, 2023).

Amerika Birleşik Devletleri (A.B.D.) Alzheimer Derneğinin Hazırladığı "2023 Alzheimer's disease facts and figures" isimli rapora göre A.B.D. nüfusu değerlendirildiğinde toplam 6,7 milyon 65 yaş ve üstü kişinin Alzheimer hastalık demansına sahip olduğu bildirilmektedir. Bu sayının, tıbbi gelişmeler yetersiz kalırsa 2060 yılında 13,8 milyona kadar çıkabileceği ön görülmektedir. Alzheimer demansının görülme sıklığı 65-74 yaş aralığında %5; 75-84 yaş aralığında %13,1; 85 ve üstü yaşlarda %33,3 olarak hesaplanmıştır. 2019 yılında A.B.D.'deki en sık 6. ölüm nedeni olan Alzheimer hastalığı 121,499 kişinin ölümüne neden olmuştur. 2020-2021 yıllarında ise COVID-19'un da ölüm nedenleri arasına eklenmesiyle en sık 7. ölüm sebebi olarak yer almaktadır. 2000-2019 yılları arasında ölüm nedenlerinin

değişiklikleri analiz edildiğinde; kalp hastalığı, inme ve HIV gibi sorunların neden olduğu ölümlerin toplam ölüm sayısına olan oranı düşerken, Alzheimer hastalığının neden olduğu ölümlerin, toplam ölüm sayısına olan oranının %145 kadar arttığı gözlenmiştir ("2023 Alzheimer's disease facts and figures," 2023). Bu durum Alzheimer hastalığının görülme sıklığının ve oluşturduğu etkinin ortalama yaşam süresinin uzamasıyla olan artışına işaret etmektedir.

TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) verileri incelendiğinde; ülkemizde 2019 yılında Alzheimer hastalığından ölen yaşlıların sayısı 13,498 ve oranı %4,3 olarak saptanmıştır (TÜİK, 2021). 2021 yılına gelindiğinde ise bu oran %3 olarak saptanmıştır (TÜİK, 2023). Ancak bu noktada 2021 yılında yaşanmakta olan COVID-19 salgını da göz önünde bulundurulmalıdır. Ülkemizde 2021 yılında yapılan ve 60 yaş üstü bireylerin değerlendirildiği bir çalışmada 60-69 yaş aralığında %8,2; 70-79 yaş aralığında %23,9; 80 yaş ve üstü bireylerde %55,8 oranında demans izlenmiştir (Şentürk İ et al., 2021).

Alzheimer hastalığının sosyoekonomik olarak da yıkıcı etkileri bulunmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü 2019 verilerine göre demansın küresel ekonomiye olan etkisi 1,3 trilyon dolar kadardır. Herhangi bir ücret almadan bakım sağlayan aile bireyleri vb. kişiler günde ortalama 5 saatlerini bu hastalara ayırmaktadır ve global ekonomiye olan etkinin %50'si buradaki çalışma saati kaybı nedeniyle oluşmaktadır (WHO, 2023).

A.B.D.'de 2022 yılında 18 milyar saatin Alzheimer hastalarının ya da diğer demans hastalarının bakımına ayrıldığı ve sadece bunun ekonomiye olan etkisinin 340 milyar dolar civarında olduğu düşünülmektedir. 2023 yılındaki verilere göre de demans hastalarına harcanan sağlık bakım masraflarının 345 milyar dolar civarında olduğu tahmin edilmektedir ("2023 Alzheimer's disease facts and figures," 2023).

Cinsiyet olarak değerlendirildiğinde A.B.D. verilerine göre her 3 Alzheimer hastasından 2 tanesi kadındır ("2023 Alzheimer's disease facts and figures," 2023). Framingham çalışmasının verilerine göre 45 yaşındaki bir kadının hayat boyu Alzheimer hastalığı geliştirme ihtimali yaklaşık %19,5 iken, erkeklerde bu oran %10,3 olarak bulunmuştur (Chêne et al., 2015). 2019 TÜİK verileri Alzheimer hastalığından ölen yaşlıların cinsiyete göre oranları değerlendirildiğinde kadınlarda bu oran %5,4 iken, erkeklerde %3,2'dir (TÜİK, 2021).

Alzheimer hastalığının gelişmesinde hem genetik hem de çevresel faktörler rol oynamaktadır. En büyük risk faktörü yaştır. Epidemiyolojik veriler değerlendirildiğinde 65 yaştan sonra risk ciddi şekilde artmaktadır ("2023 Alzheimer's disease facts and figures," 2023).

Amiloid Prekürsör Protein (APP) ve Presenilin 1 ve 2 (PSEN1/2) gibi genlerde mutasyon varlığının erken yaşta ortaya çıkan familyal Alzheimer hastalığı ile ilişkisi mevcuttur. APOE4 allelik varyasyonu ise geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı için risk faktörüdür (Armstrong, 2019). Alzheimer hastalığı olan bireyler, sağlıklı gruplarla kıyaslandığında 2-3 kat kadar fazla allel $\epsilon 4$ 'e sahip olarak bulunmuştur (Saunders et al., 1993).

Bunlara ek olarak etyolojide farklı hipotezlerin rolünden de bahsedilmektedir. Örneğin metallerin birikimi Alzheimer hastalık patogenezinde yer alan süreçleri tetikleyip hücrel homeostaz bozukluğuna yol açarak; travmatik beyin hasarı ise kan beyin bariyerinde hasara yol açıp, plazma proteinlerinin sızmasına ve immün duyarlılaşmaya neden olarak Alzheimer hastalığı için birer risk faktörü olabilmektedir. Ayrıca nöromodülatör etkisi olan insülin ve ilişkili mekanizmaların rol oynadığı metabolik süreçlerde meydana gelen değişiklikler, vasküler sistemde meydana gelen bozukluklar, immün sistem değişiklikleri ve bazı enfeksiyon ajanlarının risk faktörü olabileceğini öne süren çalışmalar mevcuttur (Armstrong, 2019).

Alzheimer hastalığı için belirlenmiş bazı risk faktörleri olmakla birlikte, Alzheimer hastalığının belirlenmiş tek bir sebebi yoktur. Alzheimer hastalığı multifaktöryel bir süreçtir.

2.1.2. Alzheimer Hastalık Patogenezi ve Öne Sürülen Hipotezler

Etyolojisi multifaktöryel olan Alzheimer hastalığının patogeneze yönelik birçok farklı hipotez öne sürülmüştür.

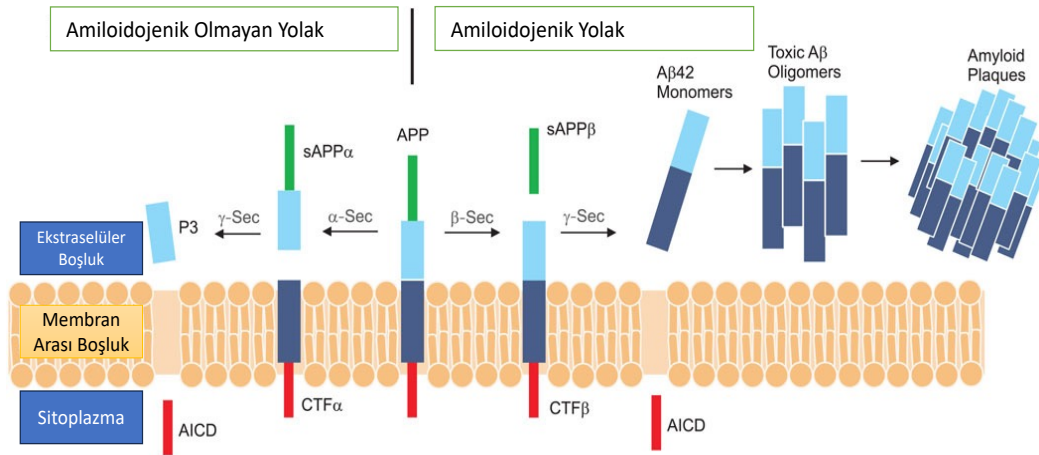
Amiloid Beta (A β) kaskad hipotezi

Amiloid Beta (A β) proteinin senil plaklarda gösterilmesi ve APP (Amiloid Prekürsör Proteini) benzeri genetik mutasyonların erken başlangıçlı ailesel Alzheimer hastalığında

gösterilmesi gibi kanıtlar Amiloid beta kaskad hipotezinin öne sürülmesine yol açmıştır (Reitz, 2012).

APP'nin yıkım ürünü olan A β proteinin; nörofibriler yumak oluşumu, hücre kaybı, vasküler hasar ve demans gibi sonuçlara yol açtığı 1992 yılında John A. Hardy ve Gerald A. Higgins tarafından öne sürülmüş olup, patolojinin temel kaynağının amiloid beta plaklar olduğu, A β proteininin kalsiyum homeostazını bozup nöronal kalsiyum seviyelerini arttırabileceği düşünülmüştür. Ayrıca kalsiyum tarafından kontrol edilen tau fosforilasyonu ile de (hiperfosforile tau oluşumu) nörofibriler yumak oluşabileceği bu çalışmada öne sürülmüştür (Hardy & Higgins, 1992).

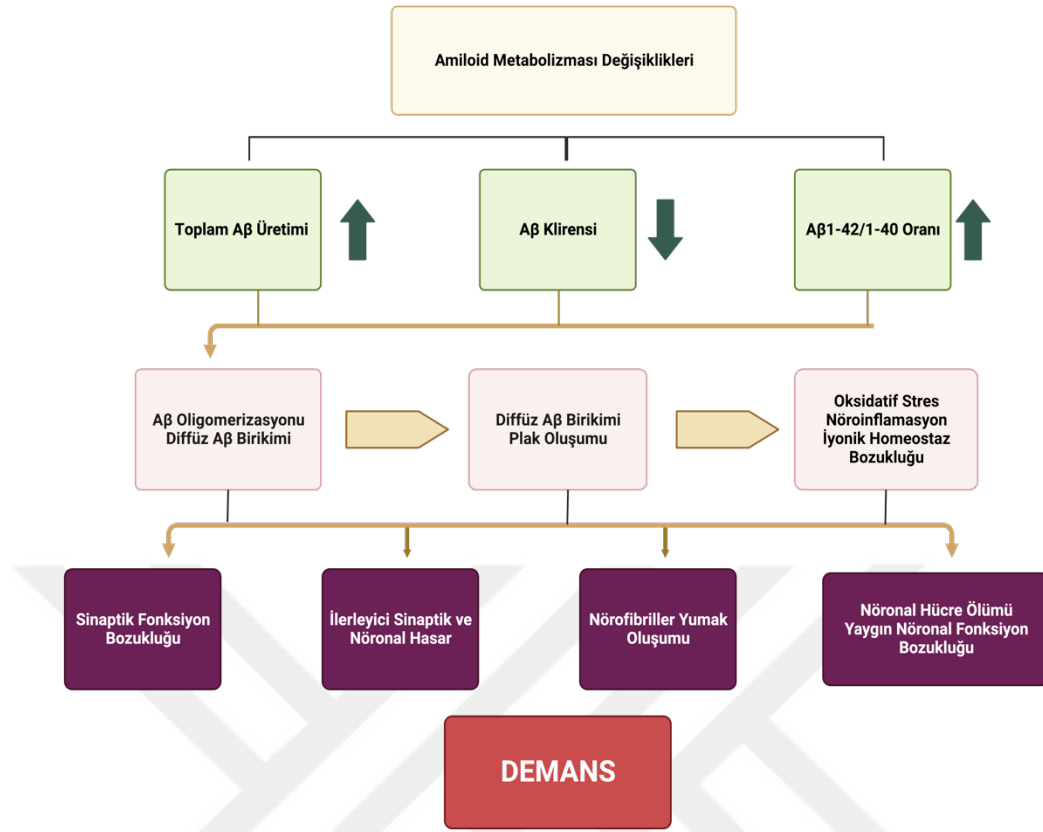
Bir transmembran protein olan APP, proteolitik sürecinin sonunda hem amiloidojenik hem de non-amiloidojenik yollara ilerleyebilmektedir (X. Sun, Chen, & Wang, 2015). Non-amiloidojenik süreçte APP, α -sekretaz tarafından parçalanarak çözünür APP α (sAPP α) üretilir. Amiloidojenik süreçte APP, β - ve γ -sekretazlar tarafından sırayla parçalanır ve toksik olan A β türleri üretilir (Hampel et al., 2021). Non-amiloidojenik süreçte α -sekretaz ile parçalanma olduğu için toksik A β üretilemez çünkü α -sekretazın parçaladığı bölge A β bölgesinde kalmaktadır. Non-amiloidojenik süreçte APP parçalanması sonucunda üretilen sAPP α 'nin olumlu koruyucu etkileri olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Amiloidojenik süreçte ilk olarak β -sekretaz olan β -site APP-cleaving enzyme 1 (BACE-1) ile parçalanma olmaktadır. Daha sonra da APP'nin transmembran parçasında γ -sekretaz tarafından parçalanma olmaktadır. Bunun sonucunda ise A β ortaya çıkmaktadır. γ -sekretazın bölünmeye neden olduğu bölge tek bir nokta ile sınırlı olmadığından farklı A β türleri oluşmaktadır. A β 1-40 ve A β 1-42 bu süreç sonucunda oluşan A β 'ların çoğunluğunu oluşturmaktadır (Şekil 2.1.) (Bachurin, Bovina, & Ustyugov, 2017; T. Zhang, Chen, & Lee, 2019).



Şekil 2-1 Toksik Amiloid Beta Oluşma Mekanizması

(Bachurin et al., 2017)

Amiloid beta kaskad hipotezinin sunulduğu dönemlerde; Amiloid beta oligomerlerinin, patolojik form olduğu düşünülen amiloid beta plakları oluşumu için bir aracı olduğu düşünülmektedir, 1998 yılında (Lambert et al., 1998) amiloid beta oligomerlerinin de Alzheimer hastalığına yol açabileceği öne sürüldü (Cline, Bicca, Viola, & Klein, 2018), bu öne sürülen hipotez amiloid beta kaskad hipotezinin varyantı olarak bilinen amiloid beta oligomer hipotezi olarak da adlandırılmaktadır (Karran & De Strooper, 2016). Amiloid beta kaskad ve bunun varyantı olan amiloid beta oligomer hipotezinde esas patoloji olarak amiloid beta proteinin; patogenezi tetiklediği ve amiloid beta birikiminin başlattığı öne sürülmekte olup bu patolojinin kalsiyum homeostazında bozulmaya yol açabileceği, oksidatif strese, astrosit ve mikrogliaların aktifleşmesine, anormal Tau fosforilasyonuna, sinaptik bozulmaya, nöron ölümüne, sinaptik plastisitede bozulmaya ve öğrenme ile bellek bozukluğuna neden olabileceğine yönelik kanıtlar mevcuttur (Hardy & Higgins, 1992; Karran & De Strooper, 2016; Viola & Klein, 2015) (Şekil 2.2.).



Şekil 2-2 Amiloid Beta Kaskad Hipotezine Göre Hastalık Patogenez Süreci

(Fonseca, Proença, Resende, Oliveira, & Pereira, 2009; Haass & Selkoe, 2007) (Created with BioRender.com)

Tau Hipotezi

Patolojik koşullar altında hiperfosforile olan tau proteinin eşleşmiş helikal filamalar şeklinde fibrile olması ile oluşan nörofibriller yumakların hücre içinde birikmesi Alzheimer hastalığının önemli bir özelliğidir (Arnsten, Datta, Del Tredici, & Braak, 2021; Du, Wang, & Geng, 2018). Tau proteini mikrotübül stabilizasyonu ile ilişkilidir ve dendrit ile aksonda bulunmaktadır (Agarwal, Alam, Haider, Malik, & Kim, 2020). Tau birikimlerinin önce beynin küçük bir bölgesinde başlayıp daha sonra yayıldığı gerekçesine de dayanmaktadır (Braak & Braak, 1991; Kametani & Hasegawa, 2018). 2009 yılında Frost, Jacks & Diamond tarafından hücre içi biriken taunun hücreler arası geçişi gösterilmiştir (Frost, Jacks, & Diamond, 2009). Ayrıca tau patolojisinin, amiloid beta patolojisine göre klinik belirtilerle daha korele olduğu da öne sürülmektedir (Kametani & Hasegawa, 2018).

Tau hipotezinde, sporadik Alzheimer hastalığının ana başlatıcı mekanizmasının tau proteini patolojisi olabileceğine yönelik düşünceler de mevcuttur. Tau protein patolojisi

oluşumunun, amiloid beta birikiminden 10 yıl önce başladığı (Braak & Del Tredici, 2015) gerekçesine dayandırılmış olan bu görüşte, ilgili akson ve dendritlerde biriken hücre içi hiperfosforile tau proteinin, kalsiyum regülasyonunda bozulmaya, nöron ölümüne yol açtığı ve bunun Alzheimer hastalığı için temel tetikleyici mekanizma olduğu öne sürülmüştür. Hücre içindeki tau proteini birikiminin, toksik amiloid beta proteini oluşumuna neden olduğu (Braak & Del Tredici, 2013), toksik amiloid beta oluşumunun da tekrar tau hiperfosforilasyonunu tetikleyerek tau protein birikimini arttırarak kısır bir döngüye yol açıyor olabileceği düşünülmüştür (Arnsten et al., 2021).

Kolinerjik hipotez

Öğrenme ve bellek süreçlerinde önemli rolü olan asetilkolin üretim ve taşınmasında azalma olduğuna dayanan hipotezdir (Agarwal et al., 2020). Alzheimer hastalığında kolinerjik nöronlarda kayıp olduğuna yönelik çalışmalara dayanmaktadır (Davies & Maloney, 1976). Serebral korteksin, Meynert'in Bazal Nükleusundan kolinerjik innervasyon aldığı ve bu bölgenin Alzheimer hastalığı tarafından önemli şekilde etkilendiği bilinmektedir. Bu bölge bazolateral kortikal şerit içerisinde kalmaktadır. Bu bölgede yer alan kolinerjik aksonların nörofibriler yumak birikimi sonucunda öldüğü ve kolinerjik presinaptik terminallerin kaybolduğu gösterilmiştir. Bazolateral kortikal şerit dışında kalan kolinerjik bölgeler olan retikülotalamik ve intrastriatal yolların ise Alzheimer hastalığında korunduğu gösterilmiştir. Buna bağlı olarak bu bölgedeki (bazolateral kortikal şerit) kolinerjik yolların hassasiyetinin, bu bölgenin kolinerjik yapısından ziyade anatomik yapısıyla ilişkili olduğu da düşünülmüştür. Meynert'in bazal nükleusundan gelen kolinerjik yollar korteksin büyük bir bölümüne ulaşmaktadır. Az sayıda Ch4 kolinerjik nöronun (Meynert'in Bazal Nükleusu kaynaklı kolinerjik nöron grubu) harabiyeti bile korteksi etkileyerek dikkat, motivasyon ve belleği etkileyebilir (Mesulam, 2012).

Nörovasküler Hipotez

Vasküler risk faktörlerinin, artmış Alzheimer hastalık riski ile ilişkili olduğuna dayanan bu hipotezde, serebral kan akımında azalma ile serebral hipoperfüzyonun, kan beyin bariyer bozukluğunun ve endotelyal metabolik disfonksiyonun Alzheimer hastalık patogenezinde önemli yer tuttuğu öne sürülmektedir (Scheffer, Hermkens, van der Weerd, de Vries, & Daemen, 2021; Zlokovic, 2011).

Hipoperfüzyona bağılı doğrudan nöronal hasar oluşabilmekle birlikte kan beyin bariyerinde meydana gelen hasar ve serebral kan akımında meydana gelen azalma sonucunda nörotoksik moleküllerin birikimi gözlenmektedir. Hem dolaşım bozukluğuna bağılı olarak amiloidojenik olmayan bir hasar, hem de amiloid beta ($A\beta$) klirensinin bozulmasına bağılı olarak amiloidojenik ($A\beta$ birikiminin neden olduğu) nörotoksisitenin etkileri birlikte gözlenebilmektedir. Buna ayrıca “vasküler çifte vuruş hipotezi” adı da verilmiştir. Hipoperfüzyon ve nörotoksinlerin birikimine bağılı olan nöronal hasar ilk vuruş iken, amiloid beta regülasyonunda meydana gelen düzensizlikler ve klirens bozukluğuna bağılı olan $A\beta$ birikiminin neden olduğu nöronal hasar ikinci vuruş olarak adlandırılmaktadır (Nelson, Sweeney, Sagare, & Zlokovic, 2016).

Mitokondriyal Kaskad Hipotezi

Mitokondriyal Kaskad Hipotezi 2004 yılında tanımlanmış olup (Swerdlow & Khan, 2004), hipotez; genetik kalıtımın bireysel mitokondri fonksiyonunu etkilemesi, kalıtsal ve çevresel faktörlerin yaşa bağılı olarak mitokondri fonksiyonunda meydana gelen değışiklikleri etkilemesi ve mitokondri fonksiyonu değışiklik oranının Alzheimer hastalık kronolojisini etkilemesine dayanmaktadır. Mitokondriyal fonksiyonun; APP proteinini ve $A\beta$ birikimini etkilediğı ve amiloid kaskadını tetiklediğini öne sürmektedir (Swerdlow, Burns, & Khan, 2014).

Bu hipotezin sunduğı modelde, bireye özgü belirlenmiş olan mitokondriyal elektron transport zinciri ve mitokondri fonksiyonu, bazal reaktif oksijen türü düzeyini belirlemektedir. Somatik mtDNA mutasyonları varlığı elektron transport zincirini etkileyerek reaktif oksijen türlerinin artışına neden olabilmektedir. Bazal reaktif oksijen türü miktarının yüksek olması, mitokondriyal hasarın daha yoğun olmasına yatkınlık yaratmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin artışı nöronda $A\beta$ artışına ve apoptozise yol açmaktadır, altta yatan mitokondriyal disfonksiyon nedeniyle nöronlar hücre döngüsünü tamamlayamayıp canlılıklarını kaybetmektedir (Swerdlow & Khan, 2004).

Ayrıca mitokondriyal TCA siklusunda yer alan, pirüvat, fumarat, malat, alfa ketoglutarat gibi metabolitler, nöronların düzenlenmesi ve dayanıklılığında da önemli rol almaktadır (P. Liu, Xie, Meng, & Kang, 2019).

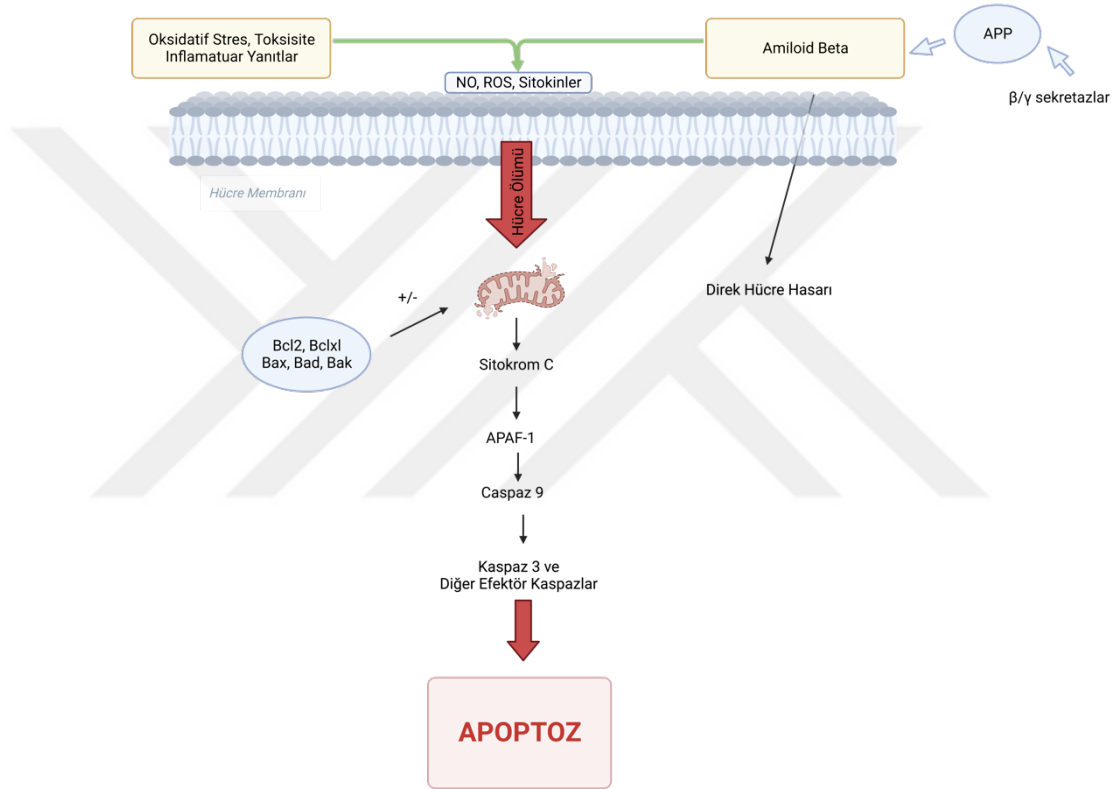
Hipotezler birlikte değerlendirildiğinde literatürde en sık dillendiren **A β kaskad hipotezinde** APP proteinin, β - ve γ -sekretazlar tarafından parçalanması ile A β 'nin toksik formları olan A β oligomerlerinin oluşması (Cline et al., 2018) ve A β plak yapısının meydana gelmesi önemli rol oynamaktadır (Hampel et al., 2021; Reitz, 2012). A β , hücre içine giren Ca⁺⁺ iyonunun hücre içine girişini arttırmakta ve eksitoksisiteye neden olmaktadır (Mattson et al., 1992), yanı sıra Tau hiperfosforilasyonunu arttırdığı da öne sürülmektedir (Viola & Klein, 2015). Aynı şekilde **Tau patolojisinin de** A β toksik formlarının oluşumunu tetiklediği ve bu patolojilerin birbirini tetikleyerek kısır döngüye yol açtığı öne sürülmektedir (Arnsten et al., 2021; Braak & Del Tredici, 2013). Özellikle bazolateral kortikal şerit bölgesinde yer alan ve kortikal bölgeye önemli sinapslar gönderen **kolinergic nöronlarında harabiyeti** Alzheimer hastalık patogenezinde önemli yer tutmakta olup bu patolojinin altında büyük ölçüde nörofibriler yumakların neden olduğu sinaptik dejenerasyon yer almaktadır (Agarwal et al., 2020; P. P. Liu et al., 2019; Mesulam, 2012). **Nörovasküler yapıda meydana gelen bozulmalar** da hipoperfüzyon ve kan beyin bariyeri harabiyetine bağlı olarak doğrudan; amiloid beta regülasyonunda düzensizliğe yol açarak ve klirens bozukluğuna bağlı olarak A β birikimi şeklinde Alzheimer hastalık patogenezinde katkıda bulunmaktadır (Zlokovic, 2011). Bunun yanı sıra **mitokondriyal fonksiyon bozukluğu** sonucunda oluşan oksidatif stres ve hücre ölümü de patogeneze katkıda bulunmaktadır (Swerdlow & Khan, 2004).

Etyolojisinde farklı etkenlerin rol oynamakta olduğu Alzheimer hastalığı patogenezinde çeşitli ve birbiriyle ilişkili olan mekanizmalar katkıda bulunmaktadır. Alzheimer hastalığı; apoptoz, oksidatif stres ve inflamasyon gibi patogeneze yer tutan hücresel süreçlerle ilişkilidir.

2.1.3. Alzheimer Hastalığı ve Apoptozis

Apoptozis, ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere 2 farklı yolak ile gerçekleşmektedir. Ekstrinsik yolak, dış uyarılara karşı yanıt verir ve işleyişine ölüm reseptörleri ve kaspaz-8 aracılık etmektedir. İntrensek yolak ise, hücre içi homeostazında meydana gelen değişikliklere cevap olarak, bcl-2 aile üyelerinin yolağa aracılık etmesiyle sitokrom C salınımı ve kaspaz-9 aktivasyonuna neden olur. Sonrasında her iki yolak da kaspaz-3,-6 ve -7'yi aktive ederek hücre ölümüne neden olur. Alzheimer hastalığında apoptozis süreciyle ilgili olan birçok çalışma yapılmıştır ve süreçle ilgili parametreler değerlendirilmiştir.

Özellikle bcl-2 aile üyelerine (bax, bak, bad, bid, bim, bcl-x, bcl-2) ait değişikliklere rastlanılmıştır. Kalsiyum sinyal yolları nöronlarda ve Alzheimer hastalık patogeneğinde önemli yer tutmaktadır. Bcl-2 aile üyeleri de hem mitokondri hem de endoplazmik retikulumda kalsiyum sinyalini düzenlemektedir. Bu yollar Alzheimer hastalığını etkileyebilir (Şekil 2.3.) (Callens et al., 2021; K. Jana, Banerjee, & Parida, 2013; Rajesh & Kanneganti, 2022).



Şekil 2-3 Alzheimer Hastalığında Apoptotik Süreç

(K. Jana et al., 2013) (Created with BioRender.com)

Pro-apoptotik (bax, bad, bak) ve antiapoptotik (bcl-2 ve bclxL) proteinler mitokondri membranının geçirgenliğini ve sitokrom C salınımını düzenleyerek apoptotik sürece etkide bulunurlar (K. Jana et al., 2013). Alzheimer hastalığında bax, bim gibi proapoptotik proteinler artarken, bcl-2, bcl-xl, bcl-w gibi antiapoptotik proteinler azalmaktadır. Bax eksik olan nöronlarda A β apoptozu uyaramamaktadır, bcl-2'nin fazla ekspresyonu ise A β ile indüklenen apoptozu azaltmaktadır (Castro et al., 2010; Rajesh & Kanneganti, 2022).

Bax ve bcl-2, mitokondriden sitokrom C salınımını düzenleyerek apoptoz yolağını etkilemektedir, bu markerlar apoptoz yolağını değerlendirmek için sıkca kullanılmaktadır. Eksojen A β 1–42 uygulanan ve mitokondriyal A β 1-42 transfeksiyonu yapılan HT22 hücrelerinde bax ve bcl-2 seviyeleri değerlendirilmiştir. Mitokondriyal fraksiyonda A β 1–42 uygulamaları sonucunda apoptotik bax proteinini artarken, anti-apoptotik bcl-2 proteininde azalma olduğu görülmüştür. Yine bu çalışmada bax/bcl-2 oranı artışı sonrası artması beklenen sitokrom C'nin seviyeleri ölçüldüğünde artış olduğu gözlenmiştir (Cha et al., 2012). Alzheimer hastalık modelinde A β 1-42 eksojen uygulamasının ve A β 1-42 mitokondriyal birikiminin mitokondriden sitokrom C salınımına aracılık ettiği ve ilgili A β 1-42 birikiminin mitokondriyal işlev bozukluğunun yanı sıra hücre ölümünü de tetiklemek için yeterli bir olay olduğunu gösterilmiştir (Cha et al., 2012; Ghavami et al., 2014). *In vivo* olarak ve ayrıca hipokampal dilim kültür hücrelerinde yapılan bir çalışmada oligomerik A β uygulamasının apoptotik bax proteinini arttırdığı, antiapoptotik bcl-2 proteinini azalttığı bunun da bax aktivasyonu ile nöronal hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiş olup, aynı çalışmada bax inhibisyonunun oligomerik A β 'nin hücre ölümüne yol açmasına karşı koruma sağladığı da gösterilmiştir (Kudo et al., 2012). İnsan nöron primer kültürlerinde yapılan bir çalışmada da A β 1-42 uygulaması sonucunda bax proteininde artış saptanırken, bcl-2 proteininde azalma gözlenmiştir (Paradis, Douillard, Koutroumanis, Goodyer, & LeBlanc, 1996). Farklı bir etken maddenin değerlendirildiği bir rat çalışmasında da Alzheimer hastalık model grubu hipokampus dokusunda, proapoptotik protein olan bax artışı izlenmiş olup, antiapoptotik bcl-2 proteininde azalma görülmüştür (R. Huang, Gong, Ni, Jia, & Zhao, 2019). 3xTg-AD/Bcl-2 transgenik farelerde yapılan çalışmada, nöronlarda bcl-2 artmış ekspresyonunun, kaspaz aktivasyonunu azalttığı ve tau parçalanmasını bloklayarak nöronlardaki birikimini engellediği gösterilmiştir (Rohn et al., 2008).

Kaspaz-3 ve farklı kaspazların APP parçalanması ve sonucunda da A β içeren peptid oluşumuna neden olduğu ve amiloidden zengin senil plakların, kaspaz ile parçalanmış APP içerdiği gösterilmiştir (Castro et al., 2010; Gervais et al., 1999). Beyinde A β birikimi homeostazı bozmakta, mitokondriyal strese neden olup, sitokrom C salınmasına ve kaspaz-3 aktivasyonuna yol açmaktadır. Kaspaz-3, kalsinörini aktive edip AMPAR defosforilizasyonuna ve internalizasyonuna neden olmaktadır. Bu durum sinaptik kayba neden olur (K. Jana et al., 2013). Yanı sıra kaspaz-3, tau parçalanması ile kesilmiş tau oluşumuna neden olur. Kaspaz-3 tarafından parçalanmış olan bu tau konformasyonel olarak farklıdır, filament formasyonunun artmasına ve mikrotübüllerde tau birikimine neden olur. Bu

durumun kompanze edilmesi için tau fosforillenir. Hiperfosforile tau helikal filament formasyonuna döner ve mikrotübül destabilizasyonu meydana gelir. Mikrotübül destabilizasyonu nöroprotektif amaçla meydana gelse de hücre içi iletişimde meydana gelen bu değişiklik apoptoza neden olur (Means et al., 2016). Kaspaz-3 aktivasyonu ile parçalanmış olan taunun nörofibriler yumak oluşumuna neden olabileceği düşünülmektedir (Rohn & Head, 2009). Farklı bir çalışmada Alzheimer hastalığının ilk dönemlerinde immatür nörofibriler yumaklarda artmış kaspaz-3 seviyeleri görülmüştür, kaspaz-3 artışının erken evre değişikliklerinden olduğu düşünülmüştür (Gastard, Troncoso, & Koliatsos, 2003). Ayrıca kaspaz aktivasyonu ile taunun kaspaz ile yıkılmasının, A β ve nörofibriler yumak patolojileri arasındaki bağlantıyı kuran etkenlerden biri olabileceği ifade edilmiştir (Cotman, Poon, Rissman, & Blurton-Jones, 2005; Rohn & Head, 2009; Rohn, Rissman, Head, & Cotman, 2002).

Kaspaz-6 da tau parçalanmasına neden olup, nörofibriler yumak oluşumuna katkıda bulunabilmektedir (Guo et al., 2004). Kaspaz-9'un direk olarak APP parçalanmasına katılarak Alzheimer hastalığında apoptoza neden olabileceği öne sürülmüştür (Castro et al., 2010; Lu et al., 2000; Rohn, Rissman, Davis, et al., 2002). Farklı kaspazların Alzheimer hastalık patogenezinde ekspresyon seviyelerinin artmış olduğu saptanmıştır (Pompl et al., 2003), kaspazlar farklı yollarla apoptoz sürecine katılmakta ve Alzheimer hastalığı patogenezinde yer almaktadır.

Yürütücü kaspazlardan olan kaspaz-3'ün Alzheimer hastaları ve yaşlı kontrol beyinlerdeki seviyelerinin kıyaslandığı bir çalışmada, Alzheimer hastalarının nöron ve astrositelerinde artmış kaspaz-3 saptanmıştır (Su, Zhao, Anderson, Srinivasan, & Cotman, 2001). Amiloid beta uygulamasıyla oluşturulmuş hayvan modelinde kaspaz-3 mRNA seviyeleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (Kamelia et al., 2017). Alzheimer hastalarının frontal korteks mikroglialarında kaspaz -8,-3 ve -7 artışı gözlenmiş olup bu kaspazların mikrogliya aktivasyonu ve nörotoksisiteyi etkilediği öne sürülmüştür (Burguillos et al., 2011; Goel et al., 2022).

Hücre ölümüne yönelik yapılan çalışmalarda, Alzheimer hastalığı bulunan kişilerle, aynı yaştaki kişilerin post-mortem beyin kıyaslamalarında; Alzheimer'lı beyin hücrelerinde ortalama 30 kat kadar fazla DNA fragmentasyonu gözlenmiştir (Lassmann et al., 1995). DNA kırıklarını saptayan ve proapoptotik çevre oluşumu ile apoptoz için bir belirteç olan

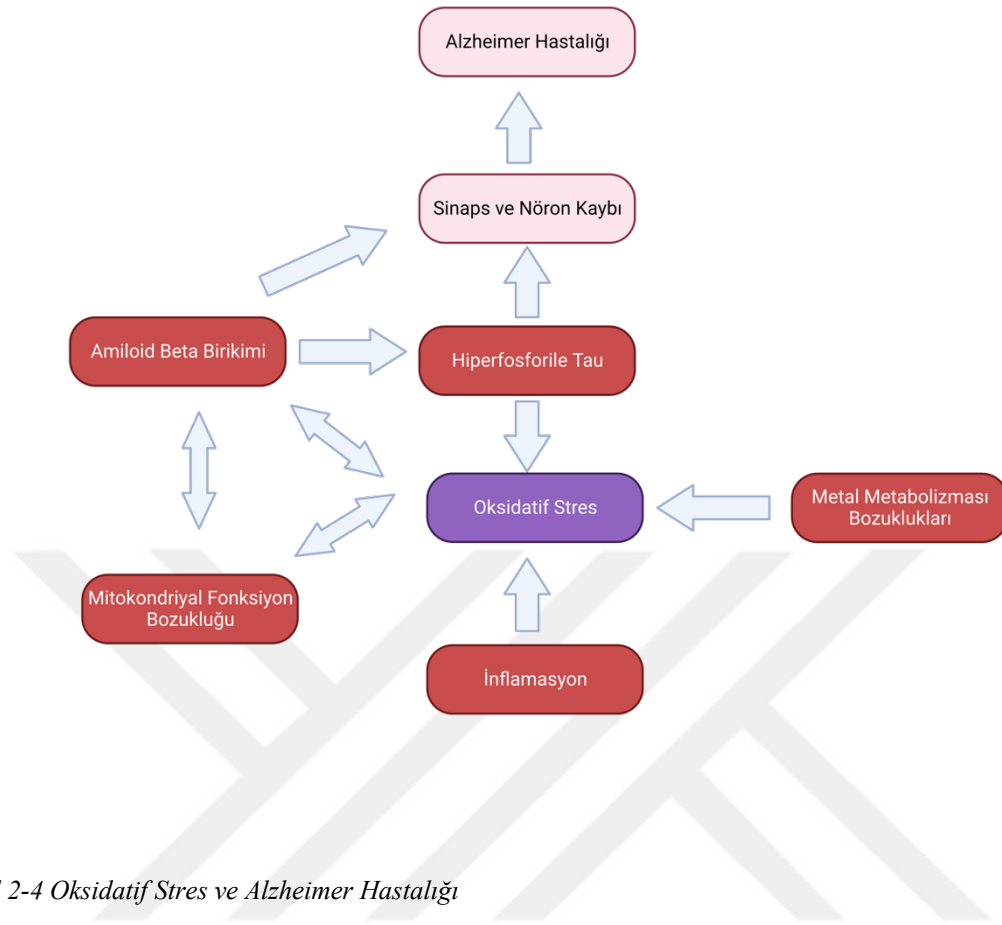
TUNEL metoduyla yapılan çalışmalarda da Alzheimer hastalığı bulunan kişilerin ve Alzheimer hastalık modellerinin beyinlerinde daha fazla apoptoz lehine bulgu saptanmıştır (Su, Anderson, Cummings, & Cotman, 1994). Bununla birlikte yine TUNEL metoduyla yapılan farklı bir çalışmada, Alzheimer hastalarının beyninde TUNEL boyası pozitif hücre sayısında artış olmakla birlikte apoptotik hücre değişikliklerinin daha az görüldüğü de bildirilmiştir (Lorke, Wai, Liang, & Yew, 2010).

Bu verilerle birlikte apoptoz dışında farklı hücre ölüm mekanizmalarıyla ilgili de çalışmalar yapılmaktadır. Apoptozis, nekroptosis, partanozis, ferroptosis, piroptosis gibi mekanizmaların da Alzheimer hastalığı ile ilişkisi araştırılmaktadır (Goel et al., 2022).

Alzheimer hastalığında nöronal hücre ölümünde apoptozun yeri konusunda çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bazı çelişkili yayınlar (Chi, Chang, & Sang, 2018) olmakla birlikte genel kanı apoptozun Alzheimer hastalık patogenezinde oldukça önemli bir yer tuttuğuna yöneliktir.

2.1.4. Alzheimer Hastalığı ve Oksidatif Stres

Beyin diğer organlara göre oksidatif strese karşı daha hassas durumdadır. Oksidatif stres; A β birikimini, tau hiperfosforilasyonunu, sinaps ve nöron kaybını arttırarak Alzheimer patogenezinde önemli bir yer tutmaktadır. Alzheimer hastalığında görülen oksidatif stresin; amiloid beta birikimi, hiperfosforile tau, mitokondriyal disfonksiyon, inflamasyon ve metal iyon homeostaz bozukluğu gibi nedenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Alzheimer hastalığında, patogeneizde yer alan diğer mekanizmalarla oksidatif stres arasında karşılıklı bir ilişki mevcuttur. Oksidatif stres, Alzheimer hastalık patogenezindeki diğer mekanizmaları tetiklerken, diğer patogeneze mekanizmaları da oksidatif stresi tetiklemektedir (Şekil 2.4.) (Chen & Zhong, 2014).



Şekil 2-4 Oksidatif Stres ve Alzheimer Hastalığı

(Chen & Zhong, 2014) (Created with BioRender.com)

Amiloid beta oligomerlerinin nöronal protein ve lipidlerde modifikasyona yol açarak oksidatif stresi tetiklediği ve nörodejenerasyona yol açtığı gösterilmiştir (Butterfield, 2002, 2018). Aynı zamanda oksidatif stresin, amiloid beta üretim ve depozisyonunu arttırdığı da gösterilmiştir. Oksidatif stres, β -sekretaz and γ -sekretaz enzimlerinin katalitik aktivitelerini arttırarak APP'den amiloid beta oluşumunu arttırmakta ve kan beyin bariyeri geçirgenliğini arttırarak beyinde amiloid beta birikiminin artışına neden olmaktadır (Cai, Zhao, & Ratka, 2011; Cervellati et al., 2016).

Alzheimer hastalık patogenezinde, A β birikiminin mitokondriyal disfonksiyona yol açan önemli etkenlerden biri olduğu, mitokondriyal disfonksiyonun reaktif oksijen türlerinde artışa neden olabileceği gösterilmiştir (Caspersen et al., 2005; Chen & Zhong, 2014). Alzheimer hastalarında hipokampal nöronlarda mitokondriyal disfonksiyon ve metabolik anormallikler saptanmıştır (Zhu et al., 2006). A β , elektron transport zincirini; anahtar enzimlerin aktivitesini bozarak etkileyebilmektedir (Caspersen et al., 2005). Amiloid betanın elektron transport zincirinde yer alan kompleks III ve IV'ün aktivitesini azalttığı

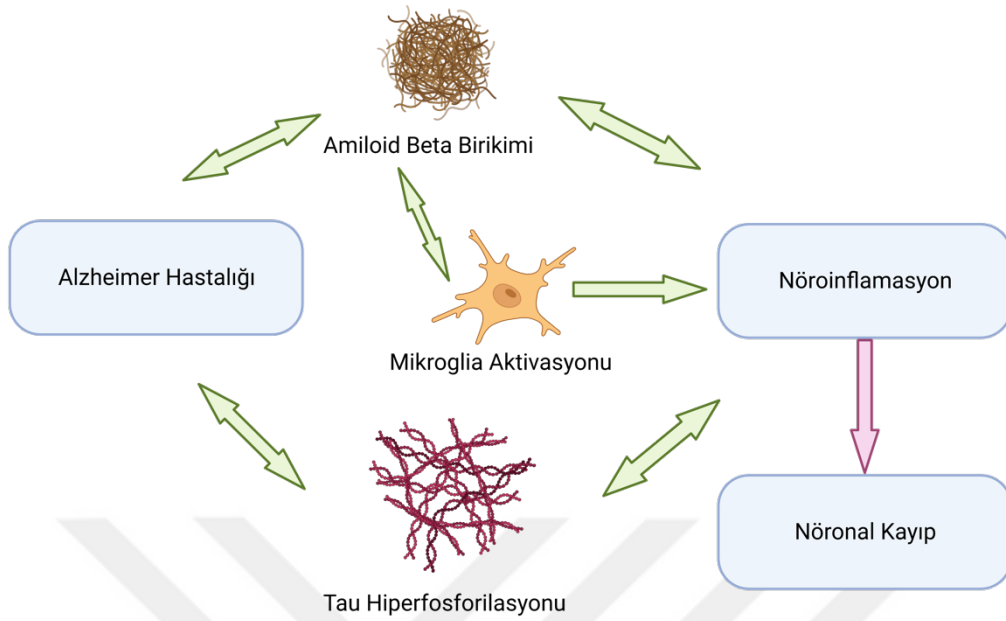
gösterilmiştir (Caspersen et al., 2005; Mutisya, Bowling, & Beal, 1994). Elektron transport zincirinde meydana gelen bozukluklar sonucunda enerji depolarında azalma ve reaktif oksijen türlerinde artış görülebilmektedir (Zhao & Zhao, 2013).

Tau patolojisinin oksidatif stres ile ilişkisi daha az çalışılmış olmakla birlikte tau patolojisi ile oksidatif stresin ilişkili olduğu da gösterilmiştir (Zhao & Zhao, 2013). Tau polimerizasyonunu uyarabilen yağ asidi oksidasyonu ürünlerinin, Alzheimer hastalarının beyinlerinde artmış olduğu bulunmuş olup, oksidatif stresin tau hiperfosforilasyonunda rol oynuyor olabileceği öne sürülmüştür (Gamblin, King, Kuret, Berry, & Binder, 2000; Zhao & Zhao, 2013).

Alzheimer hastalığı patogeneğinde, A β ; mikroglia ve astrositleri aktive ederek reaktif oksijen türleri, sitokin ve kemokin salgılanmasına yol açarak nöronal hasara neden olabilmektedir. Ayrıca bazı beyin bölgelerinde demir, çinko ve bakır (Tekin, Aslan Karakelle, & Dinçer, 2023) gibi metallerde anormal düzeyler tespit edilmiştir. Metaller de A β ile iletişime girerek oksidatif stresi uyarabilirler (Chen & Zhong, 2014).

2.1.5. Alzheimer Hastalığı ve İnflamasyon

Alzheimer hastalığında A β peptid birikimi, mikroglial aktivasyonun eşlik etmiş olduğu nöroinflamasyon tablosunun başlamasına neden olmaktadır. İnflamasyon, A β peptid birikimi ve hiperfosforile tau oluşumunu artırırken, bunlar da inflamasyonu arttırmaktadır (Şekil 2.5.) (Newcombe et al., 2018; W. Y. Wang et al., 2015).



Şekil 2-5 Nöroinflamasyon ve Alzheimer Hastalığı

(W. Y. Wang et al., 2015) (Created with BioRender.com)

Beynin yerleşik bağışıklık hücreleri olan mikroglialar nöroinflamasyondan asıl sorumlu olan hücrelerdir. Mikrogliaların klasik olarak bilinen 2 polarize aktif formu vardır. M1 mikrogliya yani klasik aktive olan mikrogliya; lipopolisakkarit, IFN- γ ya da TNF- α ile aktiflenmekte olup IL-1 β , TNF- α , STAT3, IL-6, IL-12, IL-23 ve serbest oksijen radikalleri üretmektedir. Anti-inflamatuar fenotipte olan M2 mikrogliya ise doku yeniden şekillenmesi ve anjiyogenezi uyarmaktadır ve etkilerini IL-10, IL-4, IL-13, and TGF- β salarak göstermektedir (W. Y. Wang et al., 2015).

A β ile mikroglialar aktive olmaktadır, mikrogliya aktivasyonunun Alzheimer hastalığı üstüne ikili etkisi bulunmaktadır. Hastalığın erken evrelerinde aktive olan mikroglialar plağa migrasyon gösterip A β 'nın fagosite edilmesi ve birikiminin engellenmesi yönünde etki göstermekteyken, hastalık ilerledikçe mikroglianın bağlanma ve fagosite etme yeteneği azalmaktadır ve mikrogliya nöropatolojiye katkıda bulunmaktadır (Kinney et al., 2018). Hastalığın ilerlemesi ile mikroglialarda M2 formundan klasik aktive olan mikrogliya yani M1 formuna doğru değişiklik gözlenmektedir (W. Y. Wang et al., 2015). Alzheimer hastalığında mikroglialar hep belirli bir polarizasyon durumunda kalmamaktadır, hastalığın şiddeti ve

evresinden etkilenmektedir. “M1½” olarak adlandırılan ara polarizasyon durumunda olan mikrogliyalara da damar ve tau patolojilerinin yakınlarında rastlanmaktadır (Wei & Li, 2022).

2.1.6. Alzheimer Hastalığında Deneysel Modeller

Alzheimer hastalığı patogenezinde yer alan mekanizmaların benzerlerinin oluşturulmaya çalışıldığı çok sayıda farklı Alzheimer benzeri hastalık modeli mevcuttur. Transgenik yöntemler ve transgenik olmayan yöntemler olarak iki grupta incelenebilmektedir (Puzzo, Gulisano, Palmeri, & Arancio, 2015).

Transgenik modeller

Transgenik modeller ilk olarak Amiloid kaskad hipotezi temelinde ortaya çıkmış olup genetik olarak hastalık oluşturabilen APP ve PS genlerinden yararlanılmıştır (Elder, Gama Sosa, & De Gasperi, 2010). Transgenik modeller APP, PS (Presenilin) ya da Tau’da oluşturulan genetik değişikliklere dayanmaktadır. Genetik değişikliğin türüne bağlı olarak amiloid beta birikimi, sinaptik kayıp, nöronal ölüm gibi farklı patolojiler oluşturulabilmektedir (Puzzo et al., 2015; Sanchez-Varo et al., 2022).

Transgenik olmayan modeller

Transgenik olmayan modeller, beyne Aβ, Streptozotosin (STZ) gibi toksik olabilecek ajanların enjeksiyonuna ve yaşlanma modellerine dayanmaktadır. İlgili transgenik olmayan modeller;

- Kimyasal aracılı modeller; Aβ aracılı, STZ aracılı, Kolşisin aracılı
- Metal aracılı modeller; Alimünyum aracılı, Çinko aracılı, Alimünyum + D-galaktoz aracılı,
- Lipid aracılı modeller; Kolesterol aracılı, Lipopolisakkarit aracılı,
- Yaşlanma ile modeller; D-galaktoz aracılı

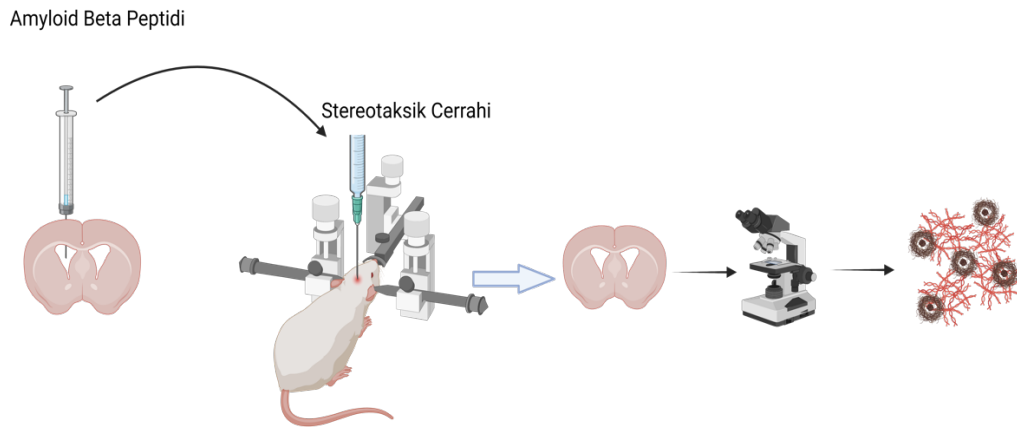
modeller şeklindedir (Shree, Bhardwaj, Kashish, & Deshmukh, 2017).

Transgenik olmayan modeller Alzheimer hastalık patogenezinde yer almakta olan APP’nin amiloidojenik şekilde yıkımının artması, oksidatif stres, inflamasyon, apoptoz, kolinerjik

nöronlarda azalma, nörodejenerasyon, glukoz hipometabolizması gibi süreçlerin biri ya da birkaçını oluşturmaktadır. Bu modeller hastalık patogenezinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılmasında, çevresel etkilerin bu mekanizmalar üzerindeki etkinliğinin değerlendirilmesinde ve olası tedavi edici ajanların nöropatoloji ile kognitif fonksiyon üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesi konularında kullanılabilmektedir (Shree et al., 2017).

A β aracılı Alzheimer Benzeri Hastalık Modeli

Bu modelde A β genellikle intraserebroventriküler (isv) ya da intrahipokampal (ihp) yolla verilmektedir (Aslan Karakelle, Dinçer, & Yar Sağlam, 2021; Facchinetti, Bronzuoli, & Scuderi, 2018). Bu modelin oluşturulmasında kullanılan A β türlerinden biri olan A β 1-42 uygulamasının oksidatif stresi uyardığı, kalsiyum homeostazını bozduğu, mitokondriyal disfonksiyona yol açtığı, inflamasyonu, apoptozu uyardığı, nöronal hücre ölümüne yol açtığı ve öğrenme ile bellek bozukluğuna neden olduğu gösterilmiştir. Alzheimer hastalığında en çok dile getirilen mekanizma olan amiloid kaskad hipotezini taklit etmeye yönelik bir metod olması ve A β birikiminin nöron ölümü ve bellek bozukluğu gibi patolojilere yol açması nedeniyle amiloid betanın (isv/ihp) uygulanması oldukça değerli bir Alzheimer hastalık modelidir (Şekil 2.6.) (H. Y. Kim, Lee, Chung, Kim, & Kim, 2016; Shree et al., 2017).



Şekil 2-6 A β aracılı Alzheimer Benzeri Hastalık Modeli Oluşturulması

(Created with BioRender.com)

2.2. miRNA

2.2.1. Genel Bilgiler

MikroRNA'lar kodlanmayan RNA molekülleridir. Hücre farklılaşması, proliferasyon ve hayatta kalma mekanizmalarında önemli rol oynamakta ve hedef mesajcı RNA'sına bağlanarak mesajcı RNA üzerinde transkripsiyonel inhibisyon ve degradasyona yol açarak etkilerini göstermektedir. Kanseri, enfeksiyon, kardiyovasküler hastalıklar ve çeşitli nörodejeneratif hastalıklar da dahil nörolojik hastalıklarda mikroRNA'lar disregüle olmuş şekilde ya da normal düzeylerinden farklı seviyelerde gözlenmiştir (Rupaimoole & Slack, 2017).

MikroRNA'lar plazma, serum, beyin-omurilik sıvısı ve periferik kan mononükleer hücreleri gibi vücut sıvıları da dahil olmak üzere çeşitli dokularda bulunduklarından, ayrıca minimal invaziv ve ekonomik olarak ulaşılabilir olmaları nedeniyle hastalıkların tanısında ve/veya izleminde önemli bir biyobelirteç olma potansiyeli taşımaktadırlar (Mushtaq et al., 2016).

Yüksek oranda stabil moleküller olduklarından dolaşımda bulunan diğer tür RNA'lara göre daha güvenilir moleküllerdir (Slota & Booth, 2019).

Bunun yanı sıra bazı mikroRNAmimik ya da antimikroRNA tabanlı ajanların başta bazı kanserler olmak üzere bazı hastalıklarda tedavi ajanı olarak kullanımları klinik deneme aşamalarına kadar gelmiştir (Rupaimoole & Slack, 2017).

2.2.2. Alzheimer Hastalığı ve miRNA'lar

Alzheimer hastalığı semptomları, hastalık patolojik olarak başladıktan on yıllar sonra başlamaktadır ve bu durum hastalığın tanısının, hastalığın ileri aşamalarında konulmasına neden olmaktadır. Mevcut durum hastalığın erken döneminde tanı konulmasını sağlayacak invaziv olmayan, ekonomik ve toplumsal taramalara uygun biyobelirteç ihtiyacını önlemektedir. Literatürde yer alan son çalışmalarda Alzheimer hastalığına yönelik olarak, kan, beyin-omurilik sıvısı ve beyin dokusu gibi yerlerde mikroRNA'ların aday biyobelirteç olarak gösterildiği birçok çalışma mevcuttur (Swarbrick et al., 2019).

Alzheimer hastalığında bazı mikroRNA'larda değişiklikler saptanmıştır. Bu değişikliklerin birçoğu inflamasyon, oksidatif stres, apoptoz, amiloid ve tau ile ilişkili yollarla ilişkilendirilmiştir. Bu gibi nedenlerden dolayı mikroRNA'lar hastalıkla ilgili patolojik yollarda ve biyobelirteç adayları olarak ön plana çıkmıştır (Kumar & Reddy, 2016; Reddy et al., 2017; Swarbrick et al., 2019).

2.2.3. miR-34a'nın Alzheimer Hastalığındaki Yeri

miR-34a'nın fazla ekspresyonunun Alzheimer benzeri hastalık patolojisine ve kognitif bozukluklara yol açtığı gösterilmiştir (Sarkar et al., 2019). miR-34a knockout farede APP'nin amiloidojenik yola girişi azalmış olup, γ -sekretaz aktivitesinde azalma olduğu bulunmuştur, bunlara bağlı olarak kognitif değişikliklerin gerilediği gösterilmiştir (Jian et al., 2017). Alzheimer hastalığına sahip insan beyninin temporal korteksinde (Sarkar et al., 2016) ve Alzheimer hastalıklı transgenik fare modelinin beyin dokusunda miR-34a'nın arttığı görülmüştür (X. Wang et al., 2009).

Oligomerik amiloid β 1-42 (oA β 1-42) immün yanıt aracılığıyla kronik nöroinflamasyonu uyarmaktadır. Bu etkinin TNF- α aracılığıyla olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca Alzheimer hastalarının ve Alzheimer hastalıklı transgenik fare modellerinin etkilenmiş beyin bölgelerinde miR-34a'nın artmış olduğu görülmüştür. Hipokampal nöronal hücre hattında, TNF- α uygulaması miR-34a'da doz bağımlı olarak artışa neden olmaktadır. Yine hipokampal nöronal hücre hattında oligomeric amiloid β 42'nin miR-34a'yı uyardığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde A β 42'nin TNF- α artışına neden olacağı, bunun da miR-34a da yukarı regülasyona neden olabileceği düşünülmüştür. Bu bilgiler TNF- α , oA β 42 ve miR-34a'nın kısır bir döngü içerisinde birbirlerini tetiklediğine işaret etmektedir (Russell, Doll, Sarkar, & Simpkins, 2016).

Literatürde çelişkili yayınlar olsa da genel kanı Alzheimer hastalığı ve nörodejeneratif süreçlerde beyin dokusunda yapılan ölçümlerde apoptotik ve inflamatuvar etkilere aracılık ettiği düşünülen miR-34a'nın yukarı doğru regüle olduğu yönündedir.

miR-34a ve Apoptoz İlişkisi

miR-34a'nın apoptotik süreçlerle olan ilişkisini araştıran çalışmalar son yıllarda artış göstermektedir. miR-34a'nın apoptotik süreçlerle olan ilişkisi farklı çalışmalarda ortaya konmuştur. Bir transgenik Alzheimer hastalığı modelinde miR-34a'nın yüksek oranda eksprese edildiği gözlenmiştir. Artan miR-34a'nın aksine bcl-2 proteini düşük bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada SH-SY5Y hücre kültüründe antisense LNA oligonükleotid aracılığıyla miR-34a devre dışı bırakılmıştır ve sonuçta bcl-2'de artış gözlenmiştir; bu sonuca göre miR-34a, bcl-2 transkripsiyonunu direk olarak inhibe etmiştir. Western blot analizi de hem transgenik Alzheimer hastalığı modelinde hem de hücre kültüründe miR-34a'nın, kontrol gruplarına göre kaspaz-3'ü arttırdığını göstermiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde miR-34a, bcl-2 gibi antiapoptotik bir geni direk olarak baskılamakta ve kaspaz-3'ü artırarak apoptotik etkinlik göstermektedir. (X. Wang et al., 2009). Nöronlarda apoptozun tetiklenmiş olduğu farklı bir çalışmada miR-34a inhibitörü kullanımının bcl-2 proteinini artırıp, kaspaz-3'ü azalttığı ve apoptozu azalttığı gösterilmiştir (L. H. Li et al., 2017).

Lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılmış U-87 MG hücrelerinden alınmış olan veziküllerin verilerek apoptotik yollarının incelenmesinin amaçlanmış olduğu SH-SY5Y hücre kültürü çalışmasında, verilen veziküllerin miR-34a artışına neden olduğu ve bcl-2 azalmasına yol açtığı gösterilmiştir. anti-miR-34a uygulanan gruba aynı uyaran verildiğinde ise miR-34a artışının engellendiği ve bcl-2 azalmasının ortadan kalktığı gözlenmiştir. Ayrıca LPS uyarısı olmayıp sadece miR-34a ile uyarılan hücrelerde de bcl-2 de azalma gözlenmiştir. Bu çalışmada LPS ile uyarılan veziküller aracılığıyla miR-34a'da artış gözlenmiş olup bu artışın Bcl-2 yi direkt olarak inhibe ettiği ve miR-34a'nın apoptotik süreçlerle ilişki içerisinde olduğu bulunmuştur (Mao, Sun, Xiao, Zhang, & Li, 2015).

Literatür ışığında miR-34a incelendiğinde, hedef aldığı proteinlerden bir tanesinin Bcl-2 olduğu gözükmemektedir. miR-34a artışı ile Bcl-2 antiapoptotik proteininde azalma meydana gelmekte olup, apoptoz lehine değişiklikler gözlenebilmektedir (Q. L. Li et al., 2016; Mao et al., 2015; X. Wang et al., 2009).

MikroRNA hedef gen ilişkisi, gen arama motorları tarandığında miR-34a (çalışmada sıçan kullanılacağı için rno-miR-34a) ile Bcl-2 arasında güçlü ilişki görülebilmektedir. miR-34a,

Bcl-2 yi hedefleyerek, antiapoptotik bir belirteç olan Bcl-2 de azalmaya yol açmaktadır (H. Y. Huang et al., 2022).

Bununla birlikte miR-34a; p53 üzerinden de apoptotik süreçleri etkileyebilir, p53 baskılayıcı genleri inhibe ederek p53 ü uyarabilirken, direk olarak p53 mRNA'sını hedefleyip p53'ü azaltadabilir. Bu noktada p53 ve miR-34a arasında; hücre döngüsünde yer alan yolların pozitif ve negatif geri bildirimleriyle düzenlenen kompleks bir fonksiyonel ilişki mevcuttur (Bazrgar, Khodabakhsh, Prudencio, Mohagheghi, & Ahmadiani, 2021; Yamakuchi, Ferlito, & Lowenstein, 2008).

2.3. Taurin

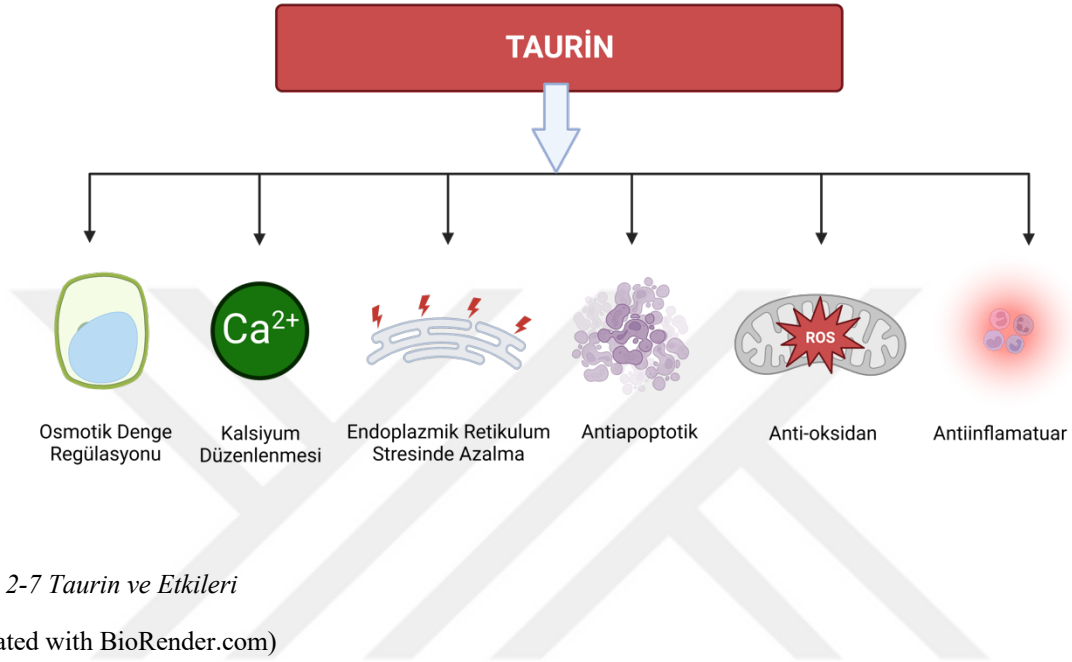
2.3.1. Genel Bilgiler

Taurin (2-aminoetan sülfonik asit) sülfür içeren beta amino asit olup, protein sentezinde kullanılmamaktadır ve dokularda serbest şekilde bulunmaktadır. Diğer aminoasitlerde bulunan karboksil grubundan yoksundur ancak, sulfonat grubu içermektedir. Diyetle alınabileceği gibi, vücutta sisteininden de üretilmektedir (Rais, Ved, Shadab, Ahmad, & Shahid, 2022; Ripps & Shen, 2012).

Taurin beyin, retina, kas dokusu ve vücuttaki diğer organlarda bol miktarda bulunur. Taurin; non-esansiyel ya da kondisyona bağlı esansiyel amino asit olarak bilinmektedir. Ancak vücutta yer aldığı görevler açısından oldukça esansiyel olarak görülmektedir (Ripps & Shen, 2012).

Ekstrasellüler ve intrasellüler farklı mekanizmalarla sitoprotektif etkiler gösterebilen taurin, hücre osmoregülasyonunda, hücre içi kalsiyum modülasyonunun sağlanmasına katkıda bulunmaktadır; nötrofil oksidanı olan hipokloröz asidi nötralize ederek anti-inflamatuar etki göstererek, superoksit üretimini azaltarak ve bazı antioksidan enzimlerin, oksidatif strese zarar görmesini engelleyip fonksiyonlarını koruyarak anti oksidan özellikler göstermektedir (Jong, Azuma, & Schaffer, 2012; C. Kim & Cha, 2014; Schaffer & Kim, 2018); proteinlerin düzgün katlanmasını sağlayarak endoplazmik retikulum stresini azaltmaktadır (Ito, Miyazaki, Schaffer, & Azuma, 2015); antiapoptotik (Baliou et al., 2021); ve nöromodülatör etkiler göstermektedir (Şekil 2.7.) (Rais et al., 2022; Schaffer & Kim, 2018).

Taurinin, Alzheimer hastalık patogenezinde de yer tutan apoptoz, oksidatif stres ve inflamasyon konusunda protektif etkileri gösterilmiştir (Baliou et al., 2021; Niu, Zheng, Liu, & Li, 2018).



2.3.2. Taurin ve Apoptozis

Santral sinir sisteminde meydana gelen bozukluklarda artan glutamata bağlı olarak hücre içi kalsiyum miktarında artış meydana geldiği, artan kalsiyum miktarının da mitokondriden reaktif oksidatif türlerinin salınımını artırdığı gösterilmiştir. Artan kalsiyum ve oksidatif stres; proapoptotik faktör seviyesini yükselterek mitokondri membran permeabilitesini arttıp hücreyi apoptoza götürmektedir. Hücrenin apoptoza gitme süreci proapoptotik bax ve antiapoptotik olan bcl-2 proteinler arasındaki denge ile düzenlenmektedir. Patolojik durumlarda artan glutamat; bax dimerizasyonunu uyarmaktadır ve bu konformasyonel değişiklik mitokondriden sitokrom C salınmasına neden olarak apoptoza katkıda bulunmaktadır. Ayrıca glutamat aracılı hücre içine giren kalsiyum, bcl-2'yi parçalama yeteneği olan kalpaini arttırmaktadır ve bcl-2 inaktive olmaktadır (Bhat et al., 2020; Leon et al., 2009).

Taurin; Alzheimer hastalığı patogenezinde de yer alan hücre içi kalsiyum artışının neden olduğu apoptozu, Na/Ca kanalını düzenleyerek ve L, N ve P/Q tipi Ca kanallarına müdahale

edip kalsiyumun nörona girişini azaltarak engellemektedir (Bhat et al., 2020; H. Wu et al., 2005). Glutamat aracılı kalsiyum artışının neden olduğu apoptozda meydana gelen bax/bcl-2 oranındaki ve kaspaz-9'daki artışın taurin uygulaması ile engellendiği görülmüştür (Leon et al., 2009). Bunlara ek olarak taurinin; hipoksik-iskemik beyin hasarında meydana gelen apoptozu, bcl-2 proteinini arttırıp, bax proteinini ve kaspaz-3 proteinini azaltarak engellediği (Jeong et al., 2009); hipokampüste TUNEL pozitif hücreleri azalttığı, bax/bcl-2 oranını azalttığı, sitokrom C, kaspaz -8 ve kaspaz -9 aktivasyonunu inhibe ettiği (S. Li, L. Yang, et al., 2017); Apaf-1 ve kaspaz-9 ilişkisini ve Apaf-1/kaspaz-9 apoptozumu oluşumunu engelleyerek apoptozu inhibe ettiği (Takatani et al., 2004); nitrik oksit aracılı apoptozu inhibe ettiği, apoptotik hücre sayısında azalmaya yol açtığı (S. Y. Kim, Park, & Kim, 2009) gösterilmiştir.

2.3.3. Taurin ve miR-34a

H₂O₂ uygulanan bir hücre kültürü çalışmasında, H₂O₂ uygulaması sonucunda miR-34a gen ekspresyonu artmıştır, ancak öncesinde taurin verilen daha sonra H₂O₂ uygulanan gruplarda miR-34a gen ekspresyonunda düşüş gözlenmiştir. Taurin verilen grupta H₂O₂ ile uyarılmış olan apoptozun, taurin tedavisi ile azaldığı da gözlenmiştir (Cheleschi et al., 2017).

2.3.4. Taurin ve Oksidatif Stres

Taurinin antioksidan özellikleri birçok çalışmada gösterilmiştir. Taurinin; mitokondriden superoksitlerin üretimini azalttığı (Jong et al., 2012); amiloid beta 1-42 uygulanmış sıçanlarda lipid peroksidasyon ürünü olan MDA seviyelerini azaltıp, peroksizomal oksidatif bozukluğu düzelttiği (Aslan Karakelle et al., 2021); oksidatif stres durumunda, stresten koruyucu etkileri arttırıp, MDA seviyelerini düşürürken, GSH seviyelerini koruduğu (Dinçer, Bostanoğlu, & Dursun, 1997; Oudit et al., 2004); morfin aracılı oluşturulan oksidatif streste, superoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin etkinliğini arttırdığı (Zhou et al., 2011); antioksidan enzimlerin oksidatif stresten zarar görmesini engellediği (Schaffer & Kim, 2018); H₂O₂, [•]OH ve NO'yı detoksifiye edici potansiyelinin olduğu (Baliou et al., 2021); mitokondriyal biyosentezi düzenleyip, elektron transport zincirinin stabilizasyonunu sağladığı, mitokondriyal fonksiyonları geliştirdiği, mitokondriden superoksit üretimini azalttığı (Rikimaru et al., 2012) gösterilmiştir (Baliou et al., 2021; Schaffer & Kim, 2018).

2.3.5. Taurin ve İnflamasyon

Taurinin anti-inflamatuar etkinliklerine yönelik literatürde birçok kanıt bulunmaktadır. Taurinin; mikroglia aracılı olan NOX2--NF- κ B kaskad inhibisyonu ile proinflamatuar sitokinleri azaltarak anti-inflamatuar etkiye neden olduğu (Che et al., 2018); TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi sitokinleri azalttığı (Nakajima et al., 2010; Niu et al., 2018); inflamasyon durumunda fagositlerde taurin kloramine (TauCl) dönüştüğü ve tau kloraminin superoksit anyonlarının, nitrik oksit, sitokinlerin üretimini azaltırken hem oksijenaz 1, peroksiredoksin, tiyoredoksin, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi antioksidan proteinleri arttırdığı ve inflamasyonu geriletmediği (C. Kim & Cha, 2014) gösterilmiştir.





3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Deney Hayvanları

Çalışmanın etik kurul onayı 18.01.2022 tarih ve G.Ü.ET-22.013 kod numarasıyla Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alındı. Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi (GÜDAM)'nden 32 adet (2 adeti ön çalışmada kullanılmak üzere) Wistar Albino erkek sıçan temin edildi ve deney hayvanlarıyla ilgili olan çalışmalar GÜDAM'da sürdürüldü.

Çalışma öncesinde sıçanlara 10 gün boyunca aklimatizasyon sağlandı. 250-300 gr ağırlığındaki erkek Wistar sıçanlar 23 ± 1 °C'de, %60-70 nemli ortamda, aydınlık-karanlık döngüsü 12:12 saat olacak şekilde, ad libitum beslenme ile standart sıçan kafesinde üçerli gruplar halinde tutuldu. Ad libitum beslenmede pelet yem ve musluk suyu kullanıldı. Hayvanların rutin şekilde ağırlık takipleri yapıldı. Hayvanlara yapılan stereotaksik girişimler, oral gavaj işlemleri ve davranış deneyleri GÜDAM'da yapıldı.

3.1.2. Kullanılan Laboratuvar Aletleri ve Cihazları

Çalışmada genel olarak Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD, Histoloji Embriyoloji AD ve Tıbbi Biyoloji AD araştırma laboratuvarlarına ait olan cihazlar kullanıldı. Bunun yanı sıra Jel Görüntüleme cihazı için Lokman Hekim Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin; polarize ışık mikroskobu için Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin (MERLAB) ve bazı özel kurumların cihazları da kullanıldı. İlgili cihazların marka ve modelleri Çizelge 3.1. de belirtilmiştir.

Çizelge 3-1 Kullanılan Laboratuvar Aletleri ve Cihazları

Cihaz veya Alet Adı	Marka/Model
Stereotaksi Cihazı	Stoelting
Stereotaksi Enjektörü	Hamilton, 700 series syringes 5µl
16G Paslanmaz Çelik Oral Gavaj	-
Morris Su Tankı	GÜDAM
Mikroplaka Okuyucu	Spectrostar Nano Mikroplaka Okuyucu, BMG LABTECH GmbH

Çizelge 3-1. (devam) Kullanılan Laboratuvar Aletleri ve Cihazları

Cihaz veya Alet Adı	Marka/Model
Mikroplaka Okuyucu	Bio-Tek El X 800 (Baran Medikal)
Mikroplaka Yıkayıcı	Bio-Tek El X 50 (Baran Medikal)
Biyokimya Analizörü	Mindray Bs-400 (Baran Medikal)
Western Blot Jel Tankı ve Güç Kaynağı	Biorad Mini-PROTEAN Tetra Cell, Mini Trans-Blot Module, and PowerPac Basic Power
Western Blot Jel Görüntüleme Sistemi	Azure 3000 Image Reader (Lokman Hekim Üniversitesi, Araştırma Laboratuvarı)
Işık Mikroskobu	Zeiss Primostar (Histoloji ve Embriyoloji AD)
Mikrotom Cihazı	Leica RM2245 (Histoloji ve Embriyoloji AD)
Etüv	Isolab Laborgeräte GmbH (Histoloji ve Embriyoloji AD)
Polarize Işık Mikroskobu	Motic (Yıldırım Beyazıt Üniversitesi-MERLAB)
qPCR cihazı	Biorad CFX96 Touch Real-Time PCR (Teknogen)
Termal Cyclus	Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cyclus (Applied Biosystems) (Teknogen)
Mikro hacim spektrofotometre	Colibri Titertek Berthold spektrofotometre (Teknogen)
Büyükölçek Ayırma Kromatografi (SEC) Sistemi	Agilent technologies 1200 series (Bilkent Üniversitesi UNAM)
Sonikatör	Sonics, Vibracell
Soğutmalı Santrifüj	MPW Med. Instruments-350R
Kuru Blok Isıtıcı	Eppendorf, Thermomixer Compact
Vorteks	Miulab-Mini mixer, MIX-30S
Çalkalayıcı	Velp. Scientifica Vortex Mixer
Manyetik Karıştırıcı	Assisten TMA 2071
Hassas Terazî	Sartorius Basic
pH metre	Mettler Toledo
Saf Su/Distile Su Cihazı	MP MINIpure
+4 C° Buzdolabı	Electrolux
-20 C° Derin Dondurucu	Ariston
-80 C° Derin Dondurucu	Wise Cryo
Cerrahi Malzemeler	-
Kamera Sistemi	Dahua Technology
Steril enjektör (2,5,10 ml)	Ayset Tıbbî Ürünler
Otomatik mikropipetler (10,100,1000,20-200 µl)	GILSON, France ve Nichipet EX, Japan
Otomatik pipet uçları (10,100,1000 µl)	Isolab Laborgeräte GmbH
Falcon tüp (15, 50 ml)	Jet Biofil
Eppendorf tüpleri (0,2-1,5 ve 2 ml)	Microcult

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar, Antikorlar ve Kitler

Çalışmada kullanılan kimyasallar Çizelge 3.2, Western Blot metodunda kullanılan antikorlar ve ELISA metodunda kullanılan kitler Çizelge 3.3. de katalog numarası ve markası ile liste halinde sunulmuştur.

Çizelge 3-2 Kullanılan Kimyasallar

Amyloid β -Peptide (1-42)	A9810	Sigma-Aldrich, Inc., USA
Taurine	T0625	Sigma-Aldrich, Inc., USA
Nitroselüloz membran (0.2 mikrometre)	GE10600094	Amersham™ Protran®, Cytiva, USA
BCA Protein Assay Kit	PI23227	Thermo Scientific™ Pierce™, USA
Rıpa Lysis Buffer System	sc-24948	Santa Cruz Biotechnology, USA
Bovine Serum Albümin (BSA)	BSA-1U	Capricorn Scientific GmbH, Germany
Tbs-T Buffer Tampon Çözeltisi (20x)	28360	Thermo Scientific, USA
Trisi-Glycine/SDS electrophoresis buffer (10x)	42529.01	SERVA Electrophoresis GmbH, Germany
Tris-Glycine Transfer Buffer (10x)	880-560-LL	Wisent Inc., Canada
Phosphate Buffered Saline	PBS408	Bioshop Canada Inc., Canada
Congo Red For Amyloid	BS-316	BESLAB, Histomed Medikal, Türkiye
APS (ammonium persulfate)	13376.02	SERVA Electrophoresis GmbH, Germany
Sodium Dodecyl Sulfate	M3290.0100	Genaxxon Bioscience GmbH, Germany
Tris HCl	TRS002.1	Bioshop Canada Inc., Canada
Blue Loading Buffer Pack (Sample Buffer)	7722S	Cell Signaling Technology, USA
Acrylamide/Bis Solution	10680.01	SERVA Electrophoresis GmbH, Germany
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED)	T7024	Sigma-Aldrich, Inc., USA
BLUeye prestained protein standard	773302	BioLegend CNS Inc., USA
Metanol	M106007	Merck, Germany
Ponceu Red	PON001	Bioshop Canada Inc., Canada
ECL Western Blotting Substrate Kit	K820	Biovision Inc., USA
TRIzol Reagent	-	DiaRex HIZol Reagent, Diagen, Türkiye
Kloroform	102445	Merck, Germany
İsopropanol	109634	Merck, Germany
Poly(A) Polymerase, Yeast	E017	ABM, Canada
OneScript Plus cDNA Synthesis Kit (G236, Abm, Canada)	G236	ABM, Canada
SensiFAST™ Probe No-ROX Kiti (BIO-86005, Bioline,US),	BIO-86005	Bioline, USA
Primer	-	Biomers, Germany
Siyah Gıda Boyası	-	Dr. Gusto, Türkiye

Çizelge 3-3 Kullanılan Antikorlar ve Kitler

Bax Poliklonal Antikoru	bs-0127R	Bioss Inc., USA
Bcl-2 Antikoru	bs-0032R	Bioss Inc., USA
Cleaved Caspase-3 Antikoru	AF7022	Affinity Biosciences, USA
Goat anti-rabbit IgG-HRP	R-05072-500	Advansta Inc, USA
IL-1 β ELISA Kiti	E-EL-R0012	Elabscience Biotechnology Inc, USA
IL-10 ELISA Kiti	E-EL-R0016	Elabscience Biotechnology Inc, USA
TNF- α ELISA Kiti	E-EL-R2856	Elabscience Biotechnology Inc, USA
Total Antioksidan Seviye Kolorimetrik Kiti	RL0017	Rel Assay Diagnostics, Türkiye
Total Oksidan Seviye Kolorimetrik Kiti	RL0024	Rel Assay Diagnostics, Türkiye
Malondialdehit (MDA)	Otto1001	Otto Scientific, Türkiye
Glutathione (GSH)	EA0113Ra	BT-lab, Shanghai Korain Biotech Co., Ltd., China

3.1.4. Kullanılan Çözeltiler

Western Blot Yöntemi için kullanılan çözeltiler

Jel Dökümü için kullanılan çözeltilerin hazırlık aşamaları;

SDS %10

- 1,5 g SDS tartılıp, 15 ml'ye distile su ile tamamlandı.

APS %10 (Günlük Hazırlanmıştır)

- 0,1 g APS tartılıp, 1 ml'ye distile su ile tamamlandı.

0,5 M Tris HCl (pH:6,8)

- MA: 157,6 g/mol olan kimyasaldan 7,88 g tris tartılıp, 60 ml distile su ile çözüldü.
- HCl ile pH ayarı yapıp, son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

1,5 M Tris HCl (pH:8,8)

- MA: 157,6 g/mol olan kimyasaldan 47,28 g tris tartılıp, 150 ml distile su ile çözüldü.
- HCl ile pH ayarı yapıp, son hacim 200 ml'ye tamamlandı.

Jel döküm aşaması;

Resolving Gel Dökümü; 10 ml hacim için (5 ml/1 jel)

- 4000 µl Saf Su
- 3300 µl Akrilamid
- 2500 µL Tris HCL
- 100 µl SDS
- 100 µl APS
- 4,5 µl TEMED

kariştirildi.

Stacking Gel Dökümü; 5 ml hacim için (2,5 ml/1 jel)

- 3075 µl Saf Su
- 670 µl Akrilamid
- 1250 µl (Tris HCL 0,5 M)
- 50 µl SDS
- 25 µl APS
- 6 µl TEMED

kariştirildi.

Western Blot Tekniğinde Örnek Yüklmesi Running, Transfer ve Bloklama sırasında kullanılan çözeltilerin hazırlık aşaması;

Sample Buffer

Sample Buffer hazırlıkları amacıyla hazır kit kullanıldı. Kitin içinde yer alan 3X Loading

Buffer'dan 10 hacim, 30X Reducing Agent'dan ise 1 hacim karıştırılarak Sample Buffer hazırlandı. Sample Buffer uygun konsantrasyonda numuneler ile dilüe edilerek kullanıldı.

Running Buffer

Hazır temin edilen Running Buffer 10x konsantrasyonda olduğundan, 1 litre running buffer hazırlamak için;

- 100 ml Running Buffer; 900 ml saf su ile karıştırılarak 1 litreye tamamlandı.

Transfer Buffer

Hazır temin edilen Transfer Buffer 10x konsantrasyonda olduğundan, 1 litre running buffer hazırlamak için;

- 100 ml Transfer Buffer; 200 ml Metanol ve 700 ml saf su ile karıştırılarak 1 litreye tamamlandı.

TBS-T Buffer

Bloklama ve yıkamada kullanılmakta olan, hazır temin edilmiş olan TBS-T Buffer 20x konsantrasyonda olduğundan, 1 litre TBS-T buffer hazırlamak için;

- 50 ml TBS-T Buffer, 950 ml saf su ile karıştırılarak 1 litreye tamamlandı.

%3 BSA

- 0,3 g BSA tartılıp, 10 ml TBS-T ile çözüldü.

Ponceau staining solüsyon %0,1

- 1g Ponceau red tartıldı, distile suda çözünmesi sağlandı.
- Üzerine 50 ml asetik asit eklendi.
- Son hacim 1L'ye distile su ile tamamlandı.
- Steril filtreden geçirildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney Grupları ve Deney Planı

Çalışmada 32 adet Wistar Albino erkek sıçan kullanıldı. 32 adet sıçanın 2 adeti ön çalışmada; intraserebroventriküler girişim yapılacak koordinatların ve girişimin doğruluğunu test etmek amacıyla kullanıldı. 30 adet sıçan ise;

Grup A: Kontrol Grubu (7 adet)

Grup B: Taurin Uygulama Grubu (7 adet)

Grup C: İntraserebroventriküler Amiloid Beta 1-42 Enjeksiyon Grubu (8 adet)

Grup D: İntraserebroventriküler Beta 1-42 Enjeksiyonu Yapılan ve Taurin Uygulanan Grup (8 adet)

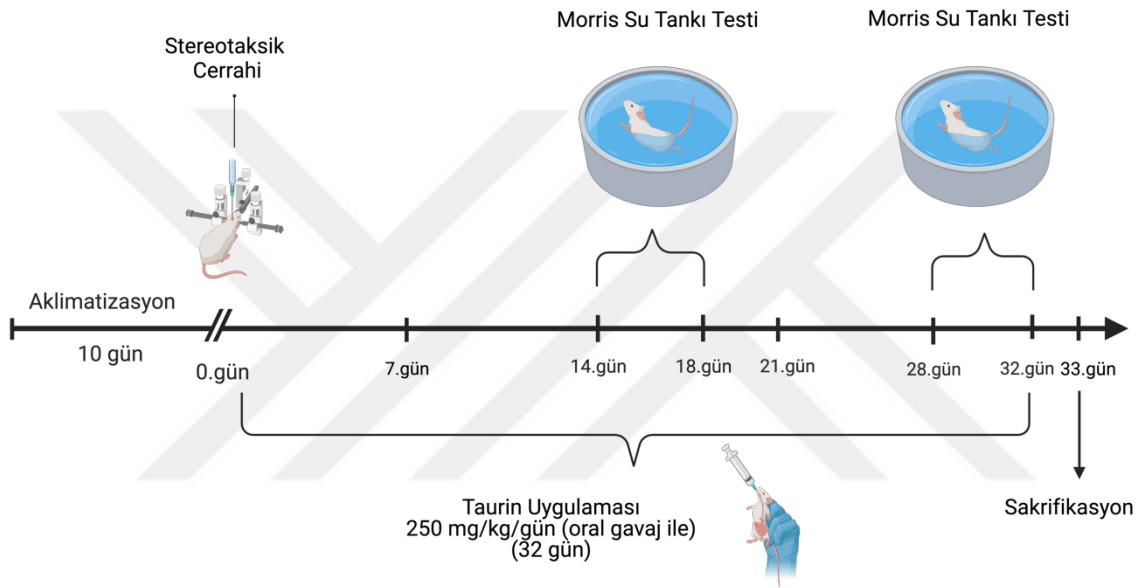
olmak üzere 4 grubu ayrılmıştır.

10 günlük aklimatizasyon sürecini takiben, amiloid Beta 1-42 ve taurin uygulanan amiloid beta 1-42 gruplarına; intraserebroventriküler amiloid beta 1-42 uygulaması (çözücü olarak Phosphate Buffered Saline kullanılmıştır.) yapıldı (0.gün). Cerrahi stresin her grupta oluşturulabilmesi ve bu nedenle gruplar arası farklılık oluşmaması amacıyla kontrol ve taurin gruplarına ise intraserebroventriküler PBS (Phosphate Buffered Saline) uygulaması yapıldı (0.gün). Stereotaksik cerrahi girişimleri takiben taurin ve amiloid beta 1-42+taurin gruplarına 32 gün süreyle oral (gavaj ile) taurin (çözücü olarak içme suyu kullanılmıştır.) verildi. Kontrol ve amiloid beta 1-42 gruplarına da aynı gavaj stresinin oluşturulabilmesi ve bu nedenle gruplar arası farklılık oluşmaması amacıyla oral gavaj ile içme suyu verildi. 14.-18. günler arası ve 28.-32. günler arasında olmak üzere iki kere Morris Su Tankı (MST) Testi uygulandı (Şekil 3.1.). MST testleri video kamera sistemiyle takip edildi, sonuçların incelenmesi videolardan manuel olarak yapıldı. Hayvanlar ikinci MST testinden bir gün sonra feda edildi.

Sakrifikasyon sonrasında beyin dokusu çıkarıldı. Serebellum ve hipokampus ayrıldıktan sonra kalan beyin dokusu buz üzerinde bistüri yardımıyla uygun şekilde homojenize edildi ve saklanmak üzere -80 °C ye kaldırıldı. Ek olarak elde edilen kan numunesinin bir kısmı mor kapaklı EDTA'lı tüpe plazma elde edilmesi; bir kısmı da kırmızı kapaklı tüpe serum

elde edilmesi amacıyla ayrıldı. Santrifüj işlemleri sonrasında plazma ve serum elde edildi. Beyinde bax, bcl-2, aktif kaspaz-3 (cleaved caspase-3) gibi apoptotik süreçle ilişkili parametreler Western blot ile; beyin ve plazma numunlerinde miR-34a seviyeleri qPCR ile; beyin dokusu ve serumda sitokin seviyeleri ELİSA metodu ile; beyin dokusu ve serumda MDA, GSH, TAS ve TOS parametreleri kolorimetrik yöntemlerle çalışıldı.

Deney Planı



Şekil 3-1 Deney Takvimi

3.2.2. Amiloid Beta 1-42 Oligomerizasyonunun Gösterilmesi

Stereotaksik cerrahide, isv olarak enjekte edilecek olan Amiloid Beta 1-42'nin toksik olması için oligomer formunda bulunması gerekmektedir. Monomer formların toksisite göstermediği, oligomer formların ise toksisite gösterdiği görülmüştür (M. K. Jana, Cappai, Pham, & Ciccotosto, 2016; Penke, Szűcs, & Bogár, 2020). Literatürde amiloid beta 1-42 enjeksiyonuyla yapılmış olan Alzheimer benzeri hastalık modelleri incelendiğinde, amiloid beta 1-42 peptidin enjeksiyon öncesinde 3 ile 7 gün arasında 37 °C'de inkübasyonda tutulduğu görülmektedir. İnkübasyon süreci sonucunda amiloid beta 1-42 toksik olan oligomer formuna dönüşmektedir (H. Y. Kim et al., 2016).

Çalışmamızda isv amiloid beta 1-42'yi uygulamadan önce 10mM PBS'te çözdürdükten sonra 37°C de 7 gün boyunca inkübasyonda bırakıldı.

Amiloid beta 1-42 peptidinin oligomerleştiğine yönelik bulguların elde edilebileceği tekniklerden bir tanesi büyüklükçe ayırma kromatografisi tekniğidir (Das, 2012; Jan, Hartley, & Lashuel, 2010; Pryor, Moss, & Hestekin, 2012). Amiloid beta 1-42 peptidinin inkübasyon sonrasında oligomerleştiğini göstermek amacıyla büyüklükçe ayırma kromatografisi (SEC) cihazıyla (Agilent technologies 1200 series-Bilkent Üniversitesi UNAM) numuneler incelendi. Büyüklükçe ayırma kromatografisi cihazında biri inkübasyon süreci başlamamış olan PBS içerisinde çözülmüş amiloid beta 1-42 peptidi ile inkübasyon sonrasında elde etmiş olduğumuz amiloid beta 1-42 solüsyonu kıyaslandı. RID dedector 35°C, flow rate 0,6 ml/dk, run time 32, Vinj: 20 µL ayarları kullanıldı. Solvent olarak amiloid beta 1-42'nin de çözücüsü olarak kullanılmış olan PBS kullanıldı. Standart kullanılmadı. Kolon olarak PL aquagel-OH 50, 8µm kullanıldı.

3.2.3. Stereotaksik Cerrahi İşlem

Stereotaksik cerrahi işlem için sıçanlar intraperitoneal olarak 70 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg xylazine kombinasyonu ile anestezi altına alındı. Stereotaksinın yapılacağı baş bölgesinde kıl temizliği yapıldı. Hayvanlar stereotaksi cihazında orta hatta yerleştirildi ve yatay ve dikey eksenlerde hareket edemeyecek şekilde stereotaksik cihaza sabitlendi. Hayvan tespit edildikten sonra hareket edip etmediği kontrol edildi. Cerrahi sırasında sıçanın gözlerinin kurumasının engellenmesi amacıyla gözler serum fizyolojik ile ıslatılıp nemlendirilmiş olan gazlı bez ile örtüldü. Sonrasında cerrahi işleme başlandı. Kafa derisi bistüri aracılığıyla açıldıktan sonra işlem yapılacak bölgenin periostu temizlendi. Referans noktalar olarak bregma ve lambda belirlenip gözlendi.

Enjeksiyonun yapılacağı koordinatlar Paxinos atlasından ve literatürden yararlanılarak belirlendi (Aslan Karakelle et al., 2021; Paxinos & Watson, 2007). Intracerebroventriküler bölgeye enjeksiyonun gerçekleştirilmesi amacıyla koordinatlar bregmadan 0,8 mm posterior; sagittal suturdan 1,5 mm lateral (bilateral uygulama) ve derinlik 3,8 mm olarak seçildi (Şekil 3.2.). Yatay ekseninde posterior ve lateralde belirlenen noktalara geldikten sonra dikkatli bir şekilde ince uçlu drill yardımı ile kafatasında hamilton enjektörü ucunun

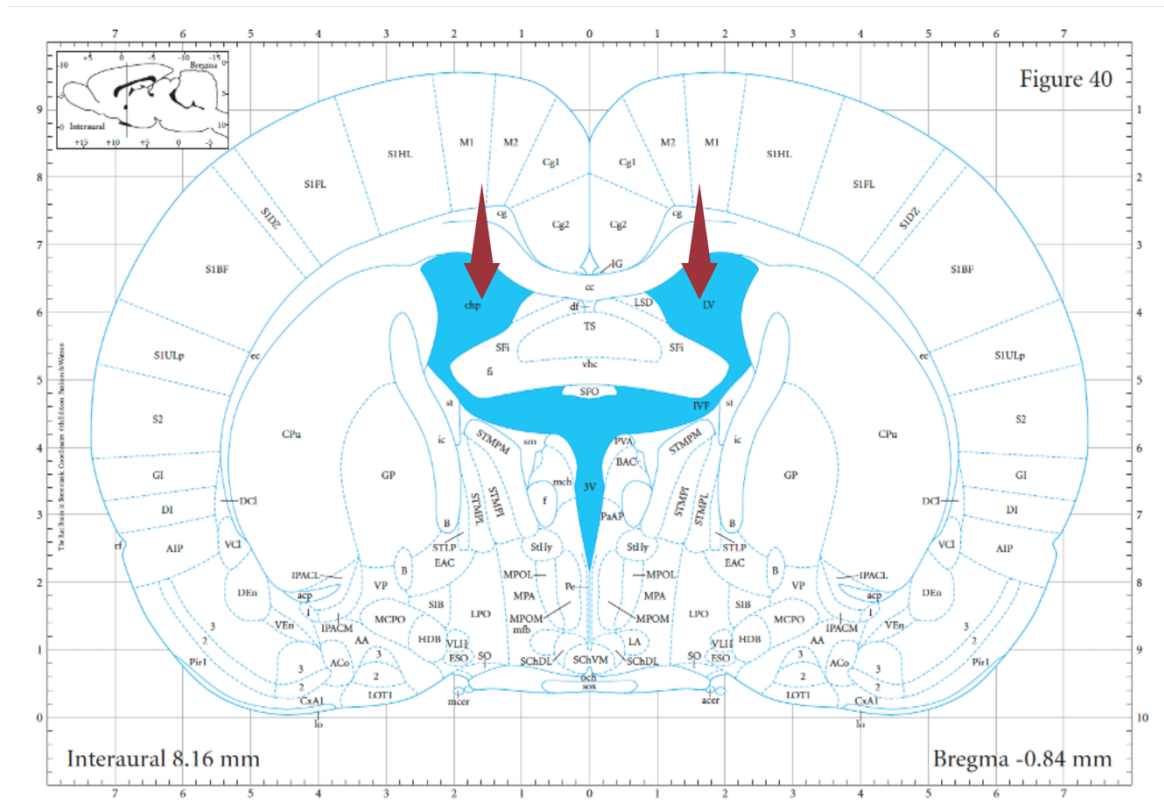
geçebileceği büyüklükte delik açıldı. Bu işlem sagittal süturun 1,5 mm sağ ve sol lateralindeki iki bölgeye de ayrı ayrı uygulandı.

İlgili işlem sonrasında drill ile açılan deliğe içerisinde amiloid beta 1-42 bulunan hamilton enjektörü yerleştirildi. Drill ile açılan delikten 3,8 mm derinliğe inildikten sonra 7 gün boyunca 37°C de inkübe edilmiş olan ve PBS solüsyonu içerisinde çözünmüş olan amiloid beta 1-42 oligomeri (5 µg/5 µl) isv olarak bölgeye enjekte edildi. Uygulanacak amiloid beta oligomer miktarının ve uygulama şeklinin belirlenmesinde de literatür kaynak alındı (Aslan Karakelle et al., 2021; Hasan et al., 2021; Jang et al., 2017; S. Sharma, Sharma, Saini, & Nehru, 2019; L. Sun et al., 2019; Tzoneva et al., 2021). Regürjitasyonu engellemek amacıyla amiloid beta 1-42 intraserebroventriküler bölgeye 1 µl/dk hızında olacak şekilde toplam 5 dakikada enjekte edildi. Sonrasında verilmiş olan amiloid beta 1-42'nin emiliminin sağlanması amacıyla 5 dakika boyunca hamilton enjektörü ilgili bölgede sabit tutuldu. Süre sonunda yine 5 dakika boyunca enjektör dikkatli bir biçimde geri çekildi. Aynı işlem sagittal süturun diğer lateral bölgesine de yapıldı. Toplamda 10 µg/10 µl amiloid beta 1-42 enjekte edilmiş oldu. İşlem sonrasında yara bölgesi cerrahi dikiş ile kapatıldıktan sonra uygun şekilde pansuman yapıldı (Resim 3.1.).

Koordinatların ve uygulanan cerrahi işlemin doğruluğunun kanıtlanması amacıyla bir ön çalışma hayvanına, çalışmaya başlamadan önce yukarıdaki cerrahi süreçle aynı şekilde amiloid beta 1-42 yerine metilen mavisi enjeksiyonu yapıldı. Metilen mavisinin intraserebroventriküler bölgeyi uygun şekilde boyadığı gösterildikten sonra çalışmaya geçildi (Resim 3.2.).



Resim 3-1 Yapılan Stereotaksik Cerrahiye Ait Görsel



Şekil 3-2 Paxinos atlası, Lateral Ventriküller

Bregmadan 0,8 mm posterior; sagital suturdan 1,5 mm lateral ve derinlik 3,8 mm koordinatlarını içeren Paxinos atlası şekli (kırmızı oklar enjeksiyonun yapıldığı bölgeleri göstermektedir.)



3.2.4. Taurin Uygulaması

250 mg/kg/gün dozundaki taurin; taurin ve taurin+amiloid beta 1-42 gruplarında yer alan hayvanlara 32 boyunca günde bir defa olacak şekilde oral (gavaj ile) uygulanmıştır. Taurin

uygulaması her gün aynı saatte 09:00-10:00 arasında yapılmıştır. Taurinin çözücüsü olarak içme suyu kullanılmıştır. Oral uygulama sırasında gavajın içinde kalan sıvı miktarı hesaba katılarak doz ayarlaması yapılmıştır.



Resim 3-3 Çalışmaya Ait Oral (Gavaj ile) Taurin Uygulamalarına Ait Görsel

3.2.5. Morris Su Tankı (MST) Testi

Morris Su Tankı (MST) Testi Richard Morris tarafından 1980’lerde geliştirilmiş olup öğrenme ve uzamsal bellek fonksiyonlarını değerlendiren bir testtir. (Maei, Zaslavsky, Teixeira, & Frankland, 2009)

MST, su ile dolu olan bir pleksiglas havuz (Genişlik: 150 cm ve derinlik: 65 cm) ve su seviyesinin altında kalan bir kaçış platformundan oluşmaktadır. Su tankı yaklaşık 50 cm’ye kadar su ile dolduruldu. Sıçanların hipotermi yaşamaması amacıyla suyun sıcaklığı $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ’ye ayarlandı. Wistar albino sıçanlar beyaz renkli olduğundan, su; sıçanların daha iyi takibinin yapılabilmesi amacıyla toksik olmayan siyah renkli gıda boyası ile siyaha boyandı. Farklı uyaranların sıçanları etkilememesi ve standart ortamın sağlanabilmesi amacıyla tankın 4 tarafı siyah perdelerle kapatıldı. Havuz hayali ve birbirini dik kesen iki çizgi ile 4 kadrana ayrıldı. Havuzun 4 kadrana da birer adet görsel ipucu simgeleri konuldu (yuvarlak, kare, üçgen ve yıldız). MST testinde 5 gün boyunca ipuçlarının ve platformun yeri hep sabit tutuldu. Deney sürecinde araştırmacı parfüm kullanmadı, perdeyle aynı renk olan siyah renkli pantolon ve t-shirt ile ilgili ortama geldi. Deneyler her gün aynı saatler arasında yapıldı (10:00-12:00). Aklimatizasyonun sağlanması amacıyla deneyden 30 dakika önce hayvanlar

testin yapılacağı odaya getirildi (aklimatizasyon sırasında havuzu ve ipuçlarını görmedi). Her test sonrasında havuzdan çıkarılan sıçanlar havlu ile nazikçe kurutuldu.

Çalışmamızda ilki 14.-18.günler ve ikincisi 28.-32.günler arasında olmak üzere iki kere MST testi yapıldı. MST testi ilk 4 gün kaçış latanslarının değerlendirildiği dönem (kaçış latansı testi) ve 5. gün hedef kadranda geçirilen sürenin değerlendirildiği dönem (probe testi) olmak üzere toplamda 5 gün sürdü. İlk MST testi ve ikinci MST testleri arasında ipuçlarının ve platformun yerleri değiştirildi.

Kaçış Latansı Testi

Kaçış Latansı testi, test yapılan sıçanın suyun altında gizli olan kaçış platformunu ipuçlarını kullanıp bulmasına dayalı olan bir testtir. Sağlıklı bir sıçanın sürekli aynı konumda yer alan ipuçlarına dayanarak kaçış platformunun yerini denemeler ile öğrenmesi beklenir. Ancak öğrenme ve bellek fonksiyon bozukluğu olan sıçanlarda bu fonksiyonlardaki bozulma nedeniyle kaçış platformunun yerini öğrenme gerçekleşmez ya da yavaşlar.

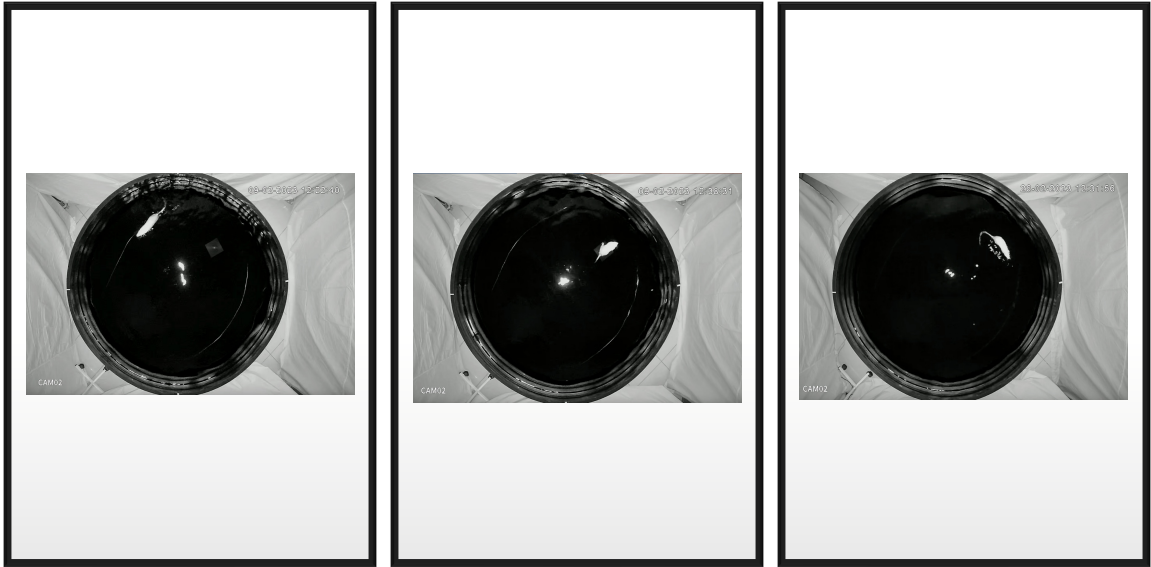
Sıçanların bir kere suya bırakılması bir deneme olarak adlandırılmaktadır. Bu çalışmada bir günde sıçanlar 4 farklı kutup noktasından (güney, kuzey, doğu, batı) suya bırakıldı (İlk başlangıç noktası rastgele seçildi.). Yani bir günde bir sıçan 4 deneme yaptı. Sıçanların aynı gün içindeki denemelerinin arasında 30'ar dakika süre olmasına dikkat edildi. Toplamda 4 gün boyunca (günde 4'er deneme) kaçış latansı testleri sürdürüldü. Sağlıklı bir sıçanda deneme sayıları ilerledikçe öğrenme ve belleğin sağlıklı bir şekilde oluşması ve ilgili kaçış platformunu bulma süresinin kısalması beklenmektedir.

Deney hayvanları suya, yüzleri havuzun duvarına bakacak şekilde koyuldu. Suyu bırakılmalarından platformu bulmalarına kadar geçen süre en fazla 90 saniye olarak belirlendi. Bu süre içerisinde platformu bulamayan sıçanlar araştırmacı tarafından platformun üzerine yerleştirildi. Platformun üzerine çıkan ya da platformun üzerine yerleştirilen sıçanların 30 saniye boyunca çevredeki ipuçlarını tanıyabilmelerine izin verildi. Sıçanların her denemelerindeki, platformu bulana kadar geçirdikleri süreler not edildi. Bu kaçış latansı süreleri gruplar arasında istatistiksel olarak kıyaslandı.

Probe Testi

Probe testinde, kaçış platformu havuzdan çıkarılır, kaçış platformunun önceden bulunduğu kadranda; hedef kadranda olarak adlandırılır. Deney hayvanı suya konulduktan sonra, hedef kadranda geçirdiği süre hesaplanır. Sağlıklı bir sıçanın, kaçış latansı denemelerinde ipuçlarıyla platformun yerini öğrenmesi ve kadranda sudan alındıktan sonra yapılan probe testinde de en fazla platformun daha önce bulunduğu yerde vakit geçirmesi beklenir. Burada elde edilen veriye hedef kadranda geçirilen süre adı verilir. (Çalışmada kullanmış olduğumuz probe test süresi terimi; hedef kadranda geçirilen süreyi ifade etmektedir.)

Çalışmada sıçanlar probe testinde, daha önce platformun bulunduğu kadrana en uzak kadrandan suya bırakıldı, 90 saniye havuz içerisinde tutuldu. 90 saniyenin ne kadarını hedef kadranda geçirdiği kayıt altına alındı. Deneklerin daha önceden platformun bulunduğu bölgede aramayı tercih etmeleri ve diğer kadrana göre daha fazla zaman geçirmeleri referans bellek işlevinin kazanılması olarak kabul edildi. Çalışmamızda bu hedef kadranda geçirilen süreler gruplar arasında istatistiksel olarak kıyaslandı.



Resim 3-4 Çalışmaya Ait Morris Su Tankı Testi Görselleri

3.2.6. Western Blot Yöntemi

Western Blot tekniği dokudaki spesifik protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir (Mahmood & Yang, 2012). Çalışmada bax, bcl-2 ve aktif kaspaz-3 (cleaved caspase-3) gibi apoptoz sürecinde yer alan proteinlerin değişiminin değerlendirilebilmesi amacıyla beyin dokusunda western blot ile protein tayini yapıldı. Teknik triplike olarak uygulandı. Yükleme kontrolü olarak da β -aktin protein ekspresyonu western blot ile gösterildi.

Örneklerin Hazırlanması:

- Beyin dokularından 20 mg tartıldı.
- Her numuneye kuru buz üzerinde; 3 μ l 200 mM phenylmethanesulfonyl floride (PMSF solution); 3 μ l 100 mM sodium orthovanadate solüsyonu ve 3 μ l protease inhibitor kokteyl solüsyonu içeren 300 μ l Lizis Buffer eklendi.
- Sonikatör (%50 amplitüd ile 15-20 saniye) ile homojenizasyon yapıldı.
- Homojenizatlar -20°C 'de 30 dakika inkübe edildi.
- Sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 13000 rpm ile 5 dakika santrifüj edildi.
- Supernatanlar yeni ependorflara aliquotlandıktan sonra -80°C 'de saklandı.

Western blot öncesinde her beyin numunesinde yer alan total protein miktarının tayin edilebilmesi amacıyla BCA kit ile protein tayini yapıldı.

BCA Kit ile Protein Tayini

- 50 birim Reagent A ve 1 birim Reagent B karıştırılarak Working Reagent oluşturuldu.
- Kitte belirtildiği şekilde standart hazırlıkları yapıldı ve standartlar plate kuyucuklarına yüklendi.
- Numuneler dilüe edildi. (1:10 oranında)
- Plate kuyucuklarında numunelere, working reagent eklendi. (numune/working reagent = 1:8 hacim olacak şekilde)
- Plate 37°C , 30 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında oda ısısına gelen plateler (Resim 3.5.A.) 562 nm absorbans değerinde ölçüldü.

- Doku başına protein miktarı elde edildi.

SDS-PAGE Jel Dökümü

- Jel döküm işlemi için jel dökme standları, cam ve tarakları (BIO-RAD, Mini protean, USA) kullanıldı.

Standda bulunan camların arasına;

- Proteinleri yürüyeceği SDS-PAGE jeli oluşturmak amacıyla önce 5 ml ayırma jeli (resolving gel) döküldü. Bu jelin üstünde camların arasında boş kalan alana distile su eklendi. (Resim 3.5.B.)
- Yaklaşık 30 dk jelin polimerize olması beklendi. Jel polimerize olduktan sonra, distile su boşaltıldı.
- Ayırma jelinin üstünde boş kalan alana boşluk kalmayacak şekilde yaklaşık 2,5 ml yığılma jeli (stacking gel) döküldü ve taraklar bu bölgeye geçirildi.
- Yaklaşık 30 dakika jel polimerizasyonunun gerçekleşmesi beklendi.

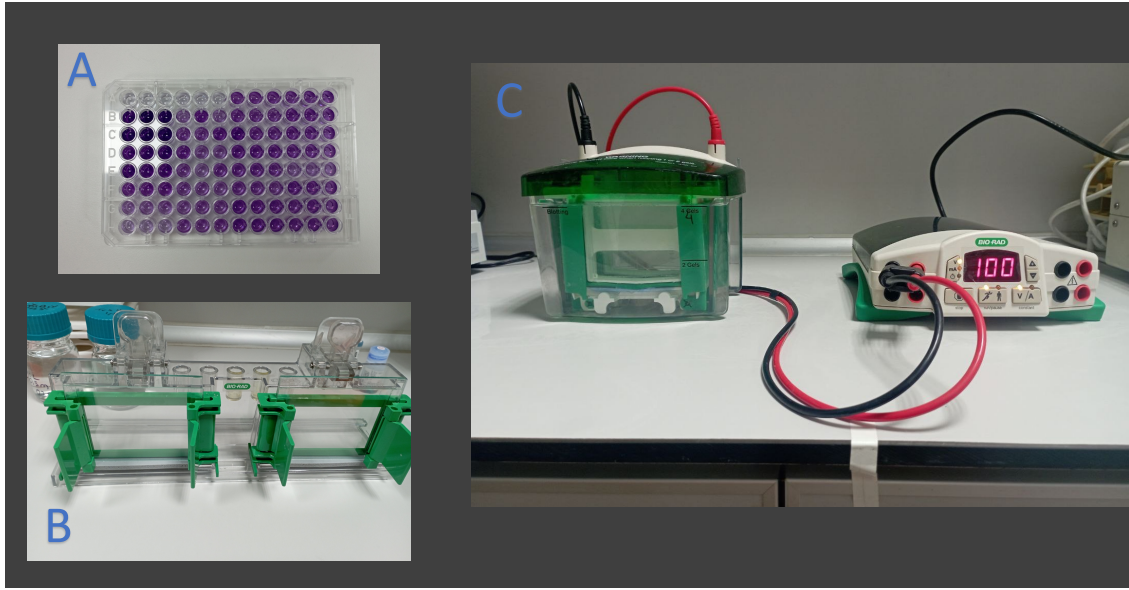
Örneklerin Jele Yüklenmesi

- Her örnek için total protein miktarı eşit olacak şekilde ayarlama yapıldı.
- Örnek tamponu, dilüsyonu 1x'e denk gelecek şekilde, uygun miktarda numune ve distile su ile karıştırıldı.
- Örnekler ependorflandıktan sonra protein denatürasyonunun sağlanabilmesi amacıyla 95°C'de 10 dakika bekletildi.
- Soğuyan numune karışımları, eşit miktarda jel kuyularına yüklendi.
- Her jelin ilk kuyusuna da molekül ağırlıklarının belirlenmesi amacıyla referans protein standartından (BLUeye prestained protein standard, BioLegend CNS Inc. 773302) 5 µl yükleme yapıldı.

Jel Elektroforezi Aşaması (Running)

- Proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrışmasının sağlanması amacıyla jel elektroforezi işlemi yapıldı.

- Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra, elektroforez tankına (BIO-RAD, Mini protean, USA) cihaz kılavuzunda belirtildiği miktarda running buffer (yürütme tamponu) konuldu.
- Güç kaynağı 100 V, 2 saat olacak şekilde ayarlandı ve yürütme işlemi başlatıldı. (Resim 3.5.C.)
- Elektroforez işleminde proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrıştığı protein standardı aracılığıyla takip edildi.



Resim 3-5 Western Blot Aşamaları

(A: BCA ile total protein miktar ölçümü, B: SDS-PAGE Jel Dökümü, C: Jel Elektroforezi (Running Aşaması))

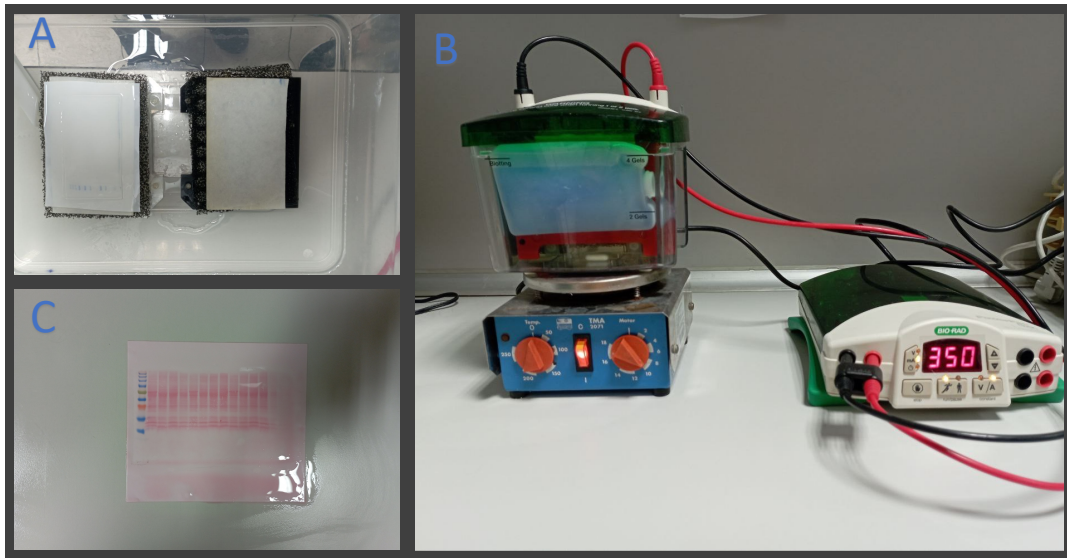
Proteinlerin Membrana Transferi (Transfer)

- Yürütme işlemiyle molekül ağırlıklarına göre ayrılan proteinlerin jelden membrana aktarılması amacıyla transfer işlemi yapıldı.
- Jellerin bulunduğu kasetler çıkarıldı, jelin yığılma jeli kısmı uzaklaştırıldı.
- Jel kasetten ayrıldı.
- Transfer kasedi, artı kutuptan eksi kutubuya doğru sırayla sünger, filtre, nitrösellülöz membran, jel, filtre, sünger olacak şekilde yerleştirildi. (Resim 3.6.A.)
- Transfer kaseti, transfer tankına alındı.
- Cihazın kitapçığında belirtildiği miktarda transfer tamponu tanka dolduruldu.

- Tank manyetik karıştırıcısının üzerine alındı. Manyetik karıştırıcı ile transfer aşamasında transfer tamponunun sirkülasyonu sağlandı.
- Tankın içine ayrıca transfer sırasında ısınmayı engellemek amacıyla buz koyuldu.
- Güç kaynağı 350 mA, 1 saat olacak şekilde ayarlandı ve transfer işlemi başlatıldı. (Resim 3.6.B.)

Membranın Ponceu Red ile Boyanması

- Membranın boyanması proteinlerin, jelden membrana geçişinin gerçekleştiğinin kanıtlanması amacıyla kullanılmaktadır.
- Ponceu Red boyası anyonik yapılı bir boyadır ve membrana geçmiş olan tüm proteinleri geri dönüşümlü olarak boyar.
- Proteinlerin mebrana transferi tamamlandıktan sonra, transfer kaseti, transfer tankından çıkarıldı.
- Membran, %0,1'lik Ponceu Red boyası içerisinde 5 dakika boyunca çalkalandı.
- Membranın yüzeyinde protein bantları gözlemlendi (Resim 3.6.C.).
- Boyanın uzaklaştırılması amacıyla membran, 5'er dakika olacak şekilde 3 kere yıkama tamponu (TBS-T buffer) ile yıkandı.



Resim 3-6 Western Blot Aşamaları

(A: Jel ve Membranın, Transfer Kasetine Yerleştirilmesi, B: Transfer Aşaması, C: Membranın Ponceu Red ile Boyanması)

Bloklama

- Bloklama işlemi ile membrandaki non-spesifik bağlanma bölgeleri engellenmiş olmaktadır.
- Membranlar, %3'lük BSA ile hazırlanan bloklama tamponu içine alındı, oda sıcaklığında çalkalayıcıda 2 saat boyunca bloklama tamponu içinde tutuldu.
- Bloklama işleminden sonra membran, 5'er dakika olacak şekilde 3 kere yıkama tamponu ile yıkandı.

Antikor Uygulama

- Primer antikorlar, ürünün kılavuzunda yazan oranlarla dilüe edildi ve %3 BSA ile karıştırılarak primer antikor tamponu oluşturuldu.
- Membranlar primer antikor tamponunun içine alındı, +4°C'de çalkalayıcıda gece boyu bu antikor tamponunun içinde tutuldu.
- Primer antikorla inkübasyon tamamlandıktan sonra membran, 5'er dakika olacak şekilde 3 kere yıkama tamponu ile yıkandı.
- Sekonder antikor, ürünün kılavuzunda yazan oranlarla dilüe edildi ve %3 BSA ile karıştırılarak sekonder antikor tamponu oluşturuldu.
- Membranlar sekonder antikor tamponunun içine alındı, oda sıcaklığında çalkalayıcıda 2 saat boyunca bu antikor tamponunun içinde tutuldu.
- Sekonder antikorla inkübasyon tamamlandıktan sonra membran, 5'er dakika olacak şekilde 3 kere yıkama tamponu ile yıkandı.

Görüntüleme ve Analiz Aşaması

- Hedef proteinlerin görüntülenebilir hale getirilebilmesi amacıyla kemiluminisans kit (ECL Western Blotting Substrate Kit, Biovision Inc., USA) kullanıldı. Kit içerisinde bulunan solüsyonlar 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra kullanılacak olan solüsyon elde edildi.
- Membran, görüntülemenin yapılacağı membran görüntüleme sistemi (Azure 3000 Image Reader) içerisine konuldu.
- Membranın üstüne hazırlanmış olan kemiluminans solüsyonu damlatıldı.
- Cihaz ile okuma işlemi gerçekleştirildi.

- Alınan kayıtlarda bant yoğunlukları AzureSpot Pro uygulaması ile değerlendirildi.
- Hedef proteinlerin bant yoğunlukları, yükleme kontrolü olarak seçilmiş olan β -aktin bant yoğunluğuna oranlanarak hesaplama yapıldı.

3.2.7. qPCR Testi

MikroRNA analizi için qPCR tekniği kullanılmıştır. Bu tekniğin kullanılmasında “TEKNOGEN BİYOMÜHENDİSLİK VE TEKNİK SİSTEMLER A.Ş.” den hizmet alımı aracılığıyla yardım alınmıştır.

miRNA qPCR aşamaları;

- Total RNA Ekstraksiyonu:

- Total RNA ekstraksiyonunu sağlamak amacıyla bir dizi nükleik asit çöktürme yöntemine dayanan TRIzol Reagent kullanıldı. 200 μ l numune üzerine, 1 ml TRIzol reagent solüsyonu eklendi. Karışım 5 dakika oda ısısında bekletildi.
- Karışıma 200 μ l kloroform eklenip karıştırıldıktan sonra 2 dakika oda ısısında inkübasyon sağlandı.
- 12000 G hızda 10 dk +4 °C sıcaklıkta santrifuj işlemi yapıldı.
- Supernatan alındı ve üzerine 0,5 ml kadar isopropanol eklendi. 10 dakika oda ısısında inkübasyon sağlandı.
- Oluşan nükleik aside ait pellet 1 ml %70 etanol ile 7500 G hızda 5 dk +4°C sıcaklıkta santrifüj yapılarak yıkandı.
- Üst faz uzaklaştırıldıktan sonra, oda sıcaklığında, 30 dk kadar RNA pelletinin kuruması beklendi.
- 30 μ l nükleaz-free elusyon tamponu eklendi, numunelere ait total RNA ekstrakte edilmiş oldu.

- Nükleik Asitlerin Spektrofotometrik Ölçümleri ve Konsantrasyonunun Tayin Edilmesi İşlemi:

Colibri Titertek Berthold cihazı kullanılarak plazma ve beyin dokularında numunelerin ölçüm ve konsantrasyon tayinleri yapıldı. Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen

numunelerin nükleik asit yoğunluk değerleri, sonraki basamaklarda kullanılması amacıyla 1000 ng değerine sabitlendi.

- miRNA Poly(A) Kuyruk Oluşturma İşlemi

Büyüklikleri 20-21 baz olan miRNA dizilerinin daha uzun ve kararlı bir yapı haline çevrilmesi amacıyla poly(A) kuyruk eklenerek daha kararlı bir yapı elde edildi.

- Bu ekleme için miRNA, ATP (10mM), Poly(A) Polymerase, Yeast (1 U/μl), Poly(A) Polymerase, Yeast Reaction Buffer, 25 mM MnCl₂, Nükleaz içermeyen H₂O komponentleri karıştırıldı ve 37 °C’de 20 dk inkübe edildi.

- Elde edilen karışım sonrasında 20 dk 65 ° C’de tutularak reaksiyonun sonlanması sağlandı. Poly(A) kuyruklu miRNA ürünleri elde edilmiş oldu.

Bu işlem sürecinde Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Thermo) cihazı ve Poly(A) Polymerase, Yeast (ABM) kiti kullanıldı.

- miRNA Reverse Transkriptaz İşlemi

miRNA spesifik olan primerler ile revers transkriptaz işlemi yapıldı. Bu primerler bir hairpin yapısı oluşturulmasına neden olmaktadır. Hairpin yapısının 5’ kısmına mRNA zincirinin 3’ ucu bağlanmaktadır. Sonrasında reverse transkriptaz aracılığıyla miRNA dizisinin karşı kopyası sentezlenmektedir.

- Poly(A) kuyruklu microRNA, dNTP (10mM), RT primer (10 mM), Nükleaz içermeyen H₂O bileşenleri, OneScript® Plus cDNA Synthesis Kit (ABM) kiti ile Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Thermo) cihazına hazırlandı.

- 65°C de 5 dk tutularak primer denatüre edildi.

- M-MuLV buffer, M-MuLV RT (200 U/μl), RNase Inhibitor (40 U/μl), Nükleaz içermeyen H₂O bileşenleri eklendi.

- mikroRNA komponenti 42 °C’de 60 dk boyunca inkübe edildi.

- Reaksiyonun sona ermesi amacıyla enzim, 65 °C’de 20 dk da tutularak inaktif hale getirildi. mikroRNA Reverse Transkriptaz ürünleri elde edildi.

- miRNA gen ekspresyon analizleri (qPCR ile)

miRNA ile oluşturulmuş olan cDNA dizileri ekspresyon analizlerinde kullanıldı. Her bir numuneye yönelik miR-34a ve referans genine yönelik dizilerin real time PCR ile çoğaltılması sağlandı.

- microRNA MixA, microRNA MixB (Primer/Probe), cDNA, Taq Polimeraz, Nükleaz içermeyen H₂O bileşenleri, SensiFAST™ Probe No-ROX Kiti (Bioline) ile CFX96 Touch Real-Time PCR cihazında hazırlandı.

- Thermal Cycler da;

İlk Denatürasyon Aşaması; 95°C de 5 dk boyunca; 1 tekrar olacak şekilde yapıldı.

PCR amplifikasyon Aşaması; 95°C de 5 saniye denatürasyon, 55°C de 30 saniye bağlanma ve 72 °C de 10 saniye polimerizasyon olmak üzere 40 tekrar şeklinde yapıldı.

Final Aşaması; 40°C de 30 saniye soğutma; 1 tekrar olacak şekilde yapıldı.

- qPCR sonucunda elde edilen pikler incelendi ve elde edilen veriler $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ metodu (Livak metodu) ile değerlendirildi.

3.2.8. ELISA, TAS-TOS, MDA ve GSH Testleri

ELISA metodu kantitatif bir şekilde spesifik protein tayini yapılmasını sağlayan yöntemdir (Alhajj, Zubair, & Farhana, 2023). Çalışmamızda beyin dokusu ve serumda IL-1 β , TNF- α ve IL-10 sitokinleri seviyeleri ELISA metodu ile çalışıldı. ELISA çalışmaları ilgili kitlerin kılavuzlarına göre yapıldı. TAS, TOS, MDA ve GSH testleri de kitlere uygun olarak spektrofotometrik olarak yapıldı.

Numune elde edilmesi

- Serum çalışmaları için toplanan kan numunesi, numune toplanmasını takip eden ilk 30 dakika içerisinde 15 dakika, 1000xg ve 2-8°C arasında santrifüj edildi. Supernatan serum toplandı.

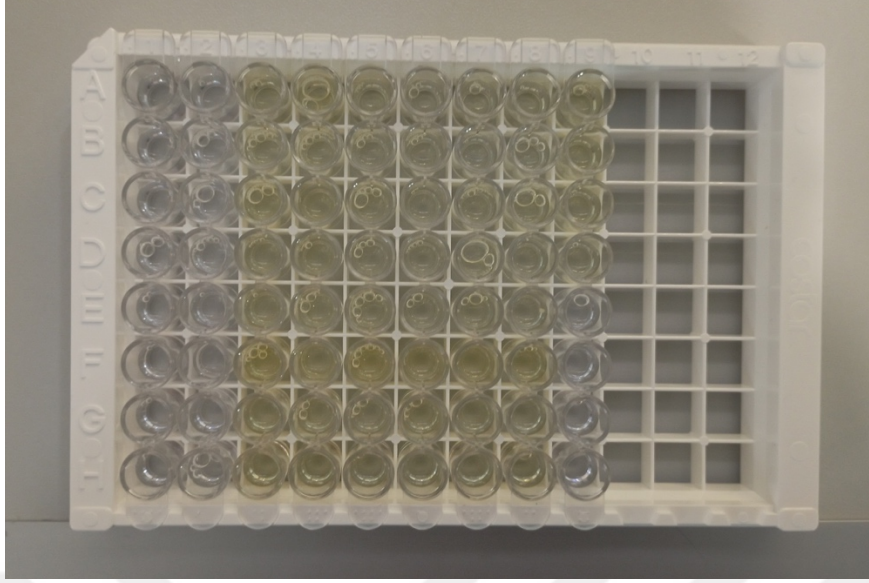
- Beyin dokusu çalışmaları için, numune PBS içerisine alındı (numune ağırlığı(g):PBS(ml)

hacim=1:9 olacak şekilde ayarlandı) ve buz üzerinde sonikatör ile (%50 amplitüde ayarlıyken 15 saniye kadar sonikasyon) homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi.

- Homojenizatlar 10 dakika, 5000xg ve 2-8°C arasında santrifüj edildi ve supernatan alındı.

Elisa prosedürü

- Kullanılacak tüm malzemeler oda sıcaklığına getirildi.
- Reaktifler hazırlandı.
- Numuneler kuyucuklara yüklenmeden önce vorteks ile karıştırıldı.
- Kit kılavuzunda belirtildiği şekilde referans standartlar ve numuneler 100 µL olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.
- 37°C de 90 dakika inkübasyon yapıldı.
- İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki sıvılar aspire edildi.
- Kuyucuklara 100 µL biotinli deteksiyon antikor çalışma solüsyonu eklendi.
- 37°C de 60 dakika inkübasyon yapıldı.
- İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki sıvılar aspire edildi ve 3 kere yıkandı (bu aşamada mikropate yıkayıcı kullanıldı).
- Kuyucuklara 100 µL HRP konjugat çalışma solüsyonu eklendi.
- 37°C de 30 dakika inkübasyon yapıldı.
- İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki sıvılar aspire edildi ve 5 kere yıkandı (bu aşamada mikropate yıkayıcı kullanıldı).
- Kuyucuklara 90 µL substrat reaktifi eklendi.
- 37°C de 15 dakika inkübasyon yapıldı.
- Kuyucuklara 50 µL durdurma solüsyonu eklendi.
- Sonrasında kit kılavuzunda belirtildiği şekilde, 450 nm absorbands değerinde microplate reader ile numunelerin absorbands değerleri ve protein değerleri tayin edildi.



Resim 3-7 Elisa Yöntemine Ait Mikroplate Görseli

Total Antioksidan Seviye Ölçümü

ABTS radikal solüsyonunun, numunedeki antioksidanlarla karşılaşınca renginin mavi-yeşil renkten, renksiz hale dönmesi metoduna dayanmaktadır. 660 nm de absorbansta meydana gelen değişim total antioksidan miktarına işaret etmektedir.

- Çalışmanın başlangıcında reaktifler hazırlandı.
- Numuneler Rel Assay kiti ile Mindray Bs-400 cihazında tam otomatik şekilde çalışıldı.
- 660 nm de absorban değişiklikleri değerlendirilerek veriler elde edildi.

Total Oksidan Seviye Ölçümü

Testin prensibine baktığımızda; numunede yer alan oksidanlar, ferröz iyon şelatör kompleksini ferrik iyonla oksitlemektedir. Ferrik iyon, asidik ortamda kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur. Bu renk farklılığının ölçümü yapılır.

- Çalışmanın başlangıcında reaktifler hazırlandı.
- Numuneler Rel Assay kiti ile Mindray Bs-400 cihazında tam otomatik şekilde çalışıldı.
- 530 nm de absorban değişiklikleri değerlendirilerek veriler elde edildi.



Resim 3-8 TAS ve TOS Çalışmasına Ait Görsel

Malondialdehit (MDA) Ölçümü

Malondialdehit tayini kolorimetrik yöntemle dayanan test (Otto Scientific, Türkiye) ile yapıldı.

- İlk olarak soğuk %10'luk Trikloroasetik asit (Reaktif 1) ile örnek karıştırıldı. Protein çöktürme işlemi yapıldı.
- 15 dakika oda ısısında beklendi.
- Sonrasında 4000 rpm de 10 dakika santrifüj yapıldı. Supernatan alındı.
- Tiyobarbitürik asit manyetik karıştırıcıda kademeli olarak ısıtılarak çözündürüldü.
- Supernatan tiyobarbitürik asit (Reaktif 2) ile içerisinde 80 °C de bir saat inkübatörde tutuldu. Sonra buzlu suya alıp soğuması beklendi.
- Elde edilen karışım soğuduktan sonra, standart ve numuneler 532 nm absorbanans değerinde okundu.

Glutasyon (GSH) Ölçümü

Glutasyon ölçümü BTLAB marka kit ile (EA0113Ra) yapıldı.

- Reaktifler ve standartlar hazırlandı.

- 50 µL standartlar, standart kuyucuklarına konuldu.
- 40 µL örnekler, örnek kuyucuklarına konuldu ve üzerine 10 µL anti-GSH ve 50 µL streptavidin-HRP eklendi.
- 37°C de 60 dakika inkübasyon yapıldı.
- İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki sıvılar aspire edildi ve 5 kere yıkandı (bu aşamada mikropate yıkayıcı kullanıldı).
- 50 µL substrat solüsyon A ve 50 µL substrat solüsyon B eklendi.
- 37°C de 10 dakika inkübasyon yapıldı.
- 50 µL durdurma solüsyonu eklendi.
- 450 nm değerde mikropate okuyucu ile okuma yapıldı ve veriler elde edildi.

3.2.9. Kongo Red Boyama

Histolojik Değerlendirme

Bir adet ön çalışma hayvanına isv Aβ 1-42 verildi, deney takvimine uygun olarak 33.günde sakrifikasyon yapıldı. Sakrifikasyonun hemen ardından toplanan beyin dokusu örnekleri %10'luk nötral formalin (pH: 7,4) içerisine alınarak 72 saat süreyle fiksasyona bırakıldı. Sonrasında aşağıdaki prosedüre uygun şekilde doku takibe alınarak parafin bloklar haline getirildi.

%10'luk Beyin dokularının parafin bloklar haline getirilmesi:

1. nötral formalin içinde 72 saat süreyle fiksasyon
2. Akar su altında 2 saat süreyle yıkama
3. %50 Etil Alkol, 1 saat
4. %70 Etil Alkol, 1 saat
5. %80 Etil Alkol, 1 saat
6. %90 Etil Alkol, 1 saat
7. %96 Etil Alkol, 1 gece
8. Absolü Alkol, 1 saat
9. Ksilen, 12 dakika
10. Ksilen+ Eriyik Parafin (60°C), 12 dakika
11. Eriyik Parafin (60°C), 1 saat

12. Eriyik Parafin (60°C), 1 saat
13. Eriyik Parafin (60°C), 1 saat
14. Parafine gömme (bloklama)

- Kongo red boyama yöntemi uygulanmak üzere Paxinos Atlas 11.-14., 26.-30. ve 37.-42. plate bölgelerini içeren koronal kesitler kullanıldı.
- Bunun için parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2245, Almanya) yardımıyla, ilgili beyin bölgelerini içeren 5 µm kalınlığında parafin kesitler alındı. Doku kesitlerinin düzleşmesi için 42 °C'ye ayarlanmış su banyosuna bırakıldı.
- Yeterince düzleşen dokular lam üzerine alınarak bir gece boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
- Ardından 1 gece boyunca da 59 °C'ye ayarlanmış etüvde (Isolab Laborgeräte GmbH, Almanya) bekletilen doku kesitleri kiti üreten firmanın aşağıdaki prosedürüne uygun şekilde Kongo Red ile boyandı.

Kongo Red Boyama Tekniği

1. Etüv (59 °C), 1 gece
2. Ksilen, 1 saat
3. Absolü Alkol, 10 dakika
4. %96 Etil Alkol, 10 dakika
5. %75 Etil Alkol, 10 dakika
6. Akarsu altında yıkama, 10 dakika
7. Harris Hematoksilen Solüsyonu, 2 dakika
8. Distile suda yıkama, 1 dakika
9. Bluing Solüsyonu, 1 dakika
10. Akarsu altında yıkama, 1 dakika
11. Distile suda yıkama, 1 dakika

Hazırlanan kesitler bilgisayar destekli polarize ışık mikroskopunda (Motic, Kanada) değerlendirildi ve görüntüler alındı.

3.2.10 İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen verilerin değerlendirilmesinde Jamovi Version 2.3.26.0 kullanıldı. Morris Su Tankı Testinde aynı gündeki verilerin birbirleriyle kıyaslanmasında Kruskal Wallis Analizi yapıldıktan sonra post-hoc olarak Dwass-Steel-Critchlow-Fligner testi yapıldı. Grupların farklı günlerdeki morris su tankı test sonuçlarının kıyaslanmasında ise Friedman Analizi kullanıldı. Friedman Analizi sonrasında post-hoc olarak Durbin-Conover testi uygulandı. Moleküler çalışmalarda gruplar arası çoklu kıyaslamalarda Kruskal Wallis testi kullanıldı. Kruskal Wallis analizi sonrasında, Mann Whitney U testi kullanılarak ikili grup kıyaslamaları yapıldı. Parametreler arası korelasyon analizinin yapılmasında Spearman Korelasyon Analizi kullanıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi. p değeri $<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Sıçanların Beden Ağırlık Değişimleri

Çalışma başlangıcında (0.gün) sıçanların beden ağırlıkları ölçüldü ve gruplar arasında anlamlı farklılık görülmedi ($p>0,05$). Çalışmanın sonunda, sakrifikasyon öncesinde yapılan ölçümde de gruplar arası ağırlık farkına rastlanmadı ($p>0,05$).

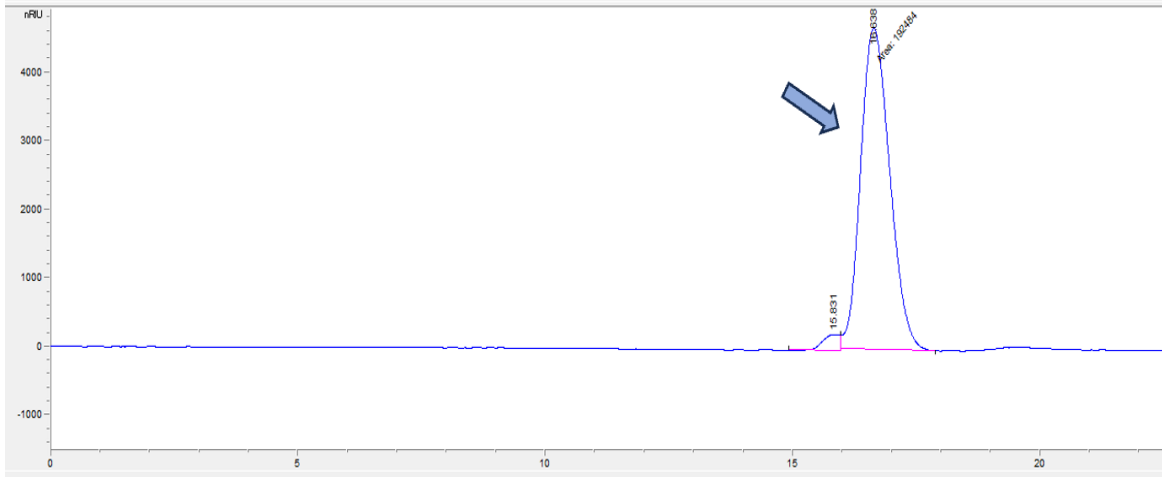
Her grubun kendi içinde 0.gün ve 33.gün ağırlıkları kıyaslandı. Kontrol, taurin ve taurin verilmiş olan amiloid beta 1-42 grubundaki sıçanların ilk ve son gün ağırlıkları arasında anlamlı artış olduğu görüldü. Ancak amiloid beta 1-42 grubunda ağırlık artışı anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4-1 Sıçan Ağırlıkları İstatistiksel Analizler

Sıçan Ağırlıkları (gr)	0.GÜN	33.GÜN	Mann Whitney U Testi p değerleri
	Ortalama $\pm$ Standart Hata	Ortalama $\pm$ Standart Hata	
Kontrol	248 $\pm$ 5.27	291 $\pm$ 7.1	0.001
Taurine	261 $\pm$ 9.81	294 $\pm$ 12.95	0.038
Amiloid Beta 1-42	260 $\pm$ 15.66	290 $\pm$ 9.91	0.052
Amiloid Beta 1-42+Taurin	260 $\pm$ 8.15	293 $\pm$ 10.42	0.031
Kruskal Wallis Analizi p değerleri	0.423	0.930	

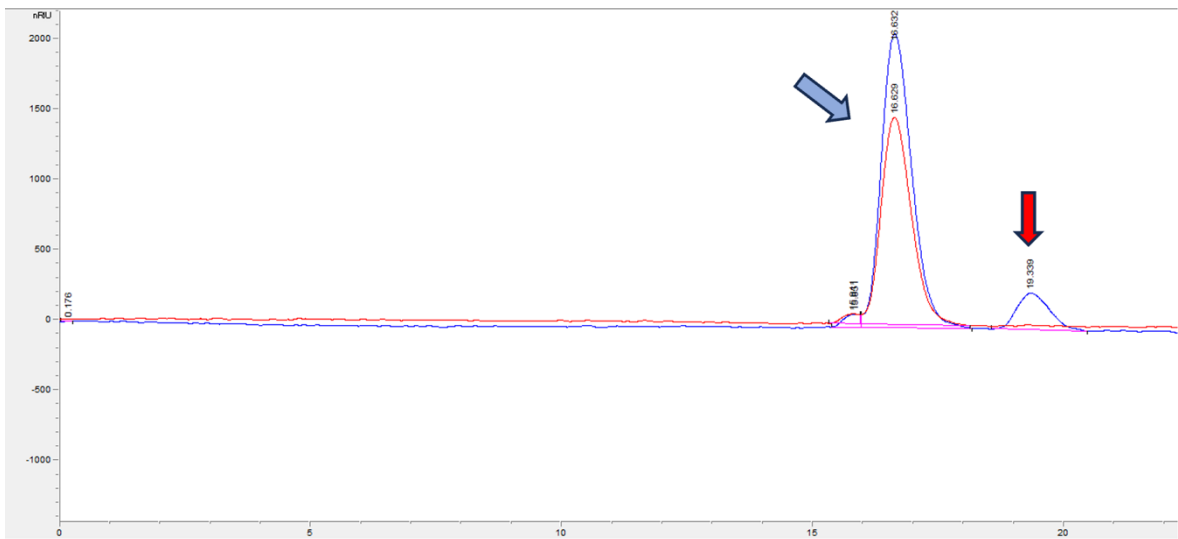
4.2. Amiloid Beta 1-42'nin Oligomerizasyonun Gösterilmesi

İlk olarak büyüklükçe ayırma kromatografisi cihazı (SEC), PBS ile şartlandırıldı. Sonrasında sadece çözücümüz olan PBS ile ölçüm yapıldı ve PBS'in oluşturduğu pik gözlemlendi (Resim 4.1).



Resim 4-1 PBS Büyüklükçe Ayırıcı Kromatografi Görüntüsü

Amiloid beta 1-42 oligomerizasyonunun gösterilmesi amacıyla yapılan büyüklükçe ayırma kromatografisi (SEC) sonucunda oligomerizasyon lehine bulgular elde edildi. Büyüklükçe ayırma kromatografi sonucunda yer alan kırmızı çizgi; inkübe olmamış amiloid beta 1-42 peptid yapısı içeren solüsyona aittir. Mavi çizgi ise; 37°C’de 7 gün inkübe olmuş olan amiloid beta 1-42 içeren solüsyona aittir. Mavi okla gösterilen ve her iki solüsyonda da pik veren bölgenin çözücümüz olan PBS’e ait olduğu düşünülmektedir. İnkübasyona uğramış olup oligomerizasyon beklenen amiloid beta 1-42’nın bulunduğu solüsyonun inceleme sonuçlarında; inkübasyona uğramamış olan amiloid beta 1-42 peptid yapısını içeren solüsyonun sonucunda görülmeyen bir pik dikkati çekmektedir. Bu pik kırmızı ok ile gösterilmiştir. Bu pikin amiloid beta 1-42 oligomer yapısına ait olduğu düşünüldü (Resim 4.2.).



Resim 4-2 Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi Sonucu

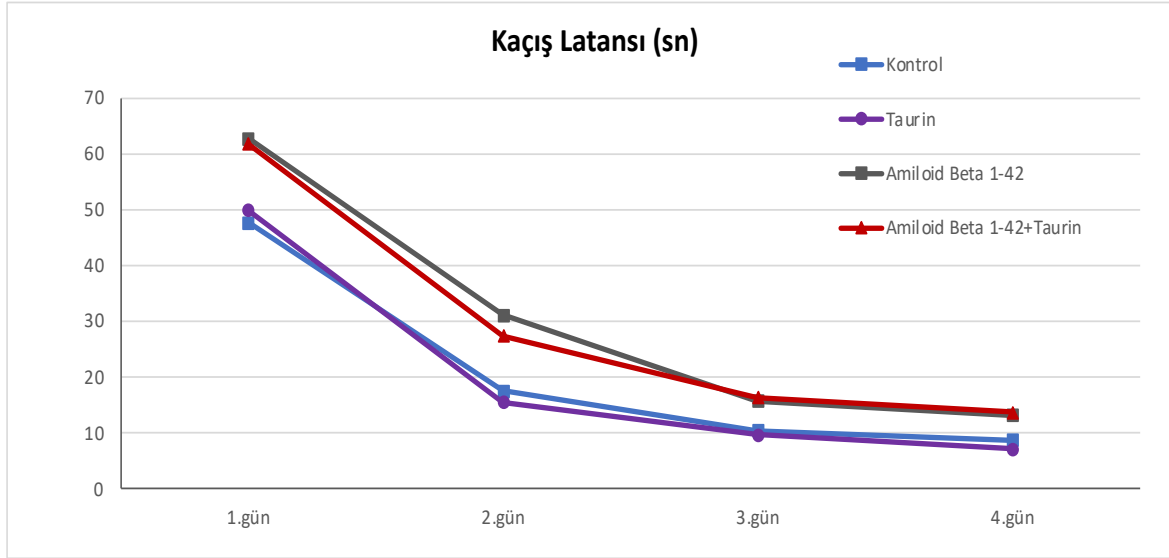
4.3. Morris Su Tankı (MST) Testi Sonuçları

Her bir MST testinde ilk 4 gün kaçış latans süreleri değerlendirildi, kaçış latans sürelerinin değerlendirilmesinde her gün için 4 ayrı kutuptan yapılan denemelerin ortalaması alınarak hesaplama yapıldı. Platformun sudan çıkarılıp, sıçanların hedef kadranda geçirdikleri sürenin hesaplandığı 5.gün probe testi sonuçları da değerlendirildi.

14.-18. Günler arasında yapılan ilk Morris Su Tankı test sonuçlarını değerlendirmek için yapılan Kruskal Wallis Analizine göre kaçış latanslarının hesaplandığı 4 günde de gruplar arası kaçış latans süreleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$). Friedman Test sonuçlarında tüm gruplarda günler arasında kaçış latans süresinde anlamlı farklılık saptandı ($p<0,05$).

Tablo 4-2 MST Testi (14.-18. günler) Kaçış Latans Süreleri

1.TUR	1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN	4.GÜN	Friedman Testi p değerleri
Platforma ulaşma süresi (sn)	Ortalama $\pm$ Standart Hata	Ortalama $\pm$ Standart Hata	Ortalama $\pm$ Standart Hata	Ortalama $\pm$ Standart Hata	
Kontrol	47.7 $\pm$ 7.89	17.6 $\pm$ 2.91	10.39 $\pm$ 1.79	8.75 $\pm$ 1.45	0.001
Taurin	49.9 $\pm$ 4.87	15.5 $\pm$ 2.89	9.71 $\pm$ 1.68	7.11 $\pm$ 1.42	<.001
Amiloid Beta 1-42	62.8 $\pm$ 4.70	31.1 $\pm$ 7.30	15.78 $\pm$ 2.16	13.19 $\pm$ 1.89	<.001
Amiloid Beta 1-42+Taurin	61.9 $\pm$ 7.02	27.40 $\pm$ 6.82	16.34 $\pm$ 2.35	13.75 $\pm$ 5.63	<.001
Kruskal Wallis Analizi p değerleri	0.159	0.222	0.081	0.112	

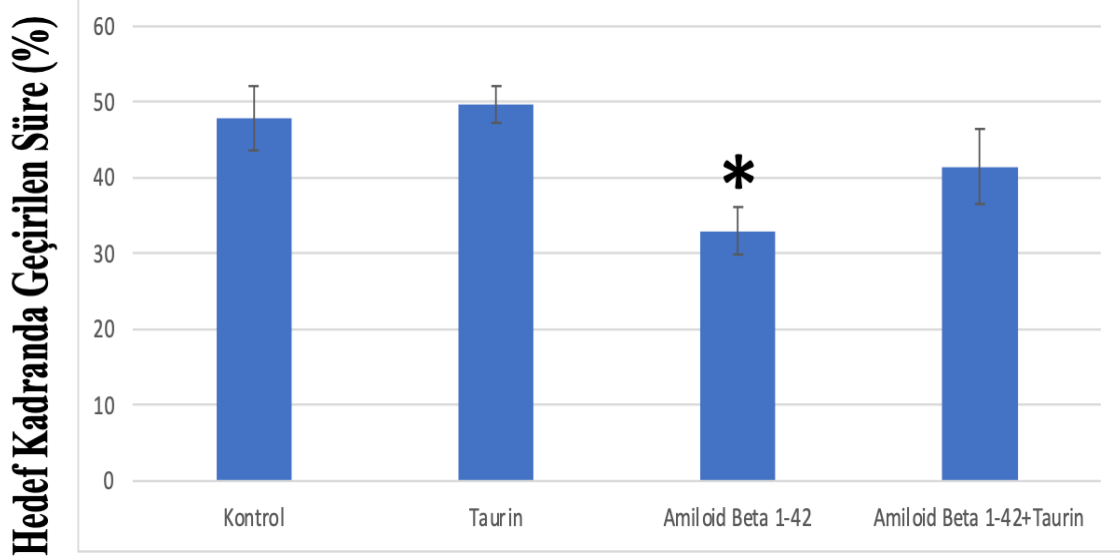


Şekil 4-1 MST Testi (14.-18. günler) Kaçış Latans Sürelerinin Günlere Göre Değişimi

14.-18. günler arasında yapılan ilk Morris Su Tankı testinin 5. gününe ait olan probe test sonuçları Kruskal Wallis analizi ile değerlendirildi. Hedef kadranda geçirilen sürelerin kıyaslandığı bu analizde gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı ($p < 0,05$). Dwass-Steel-Critchlow-Fligner testine göre farklılığın hangi ikili grup arasındaki farklılıktan kaynaklandığı değerlendirildiğinde; amiloid beta 1-42 verilmiş olan Alzheimer benzeri hastalık grubunun, hedef kadranda geçirdiği süre kontrol grubuna göre düşük bulundu ($p < 0,05$). Taurin verilmiş olan amiloid beta 1-42 grubunun hedef kadranda geçirdiği süre, amiloid beta 1-42 grubuna göre daha yüksek bulunmakla birlikte bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$). Taurin verilmiş olan amiloid beta 1-42 grubunun hedef kadranda geçirdiği süre, kontrol grubuna kıyaslandığında anlamlı fark görülmedi ($p > 0,05$).

Tablo 4-3 MST Testi (14.-18. günler) 5.Gün Hedef Kadranda Geçirilen Süreler

14.-18. günler arası MST testi (5.gün)	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
Hedef Kadranda Geçirilen Süre (%)	Kontrol	7	47.8	4.24
	Taurin	7	49.7	2.47
	Amiloid Beta 1-42	8	32.9 *	3.17
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	8	41.4	4.98
	*kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ($p < 0,05$)			



* kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0,05$)

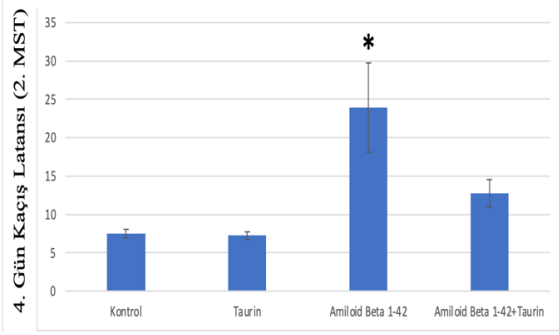
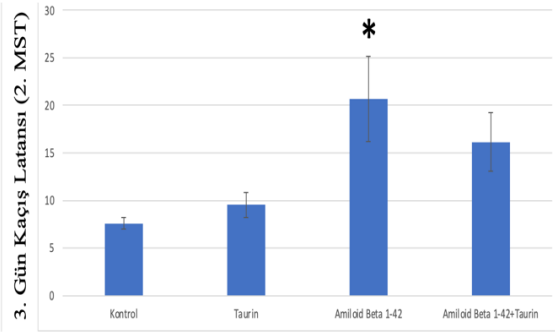
Şekil 4-2 MST Testi (14.-18. günler) 5.Gün Hedef Kadranda Geçirilen Süreler

28.-32. günler arasında yapılan ikinci Morris Su Tankı Test sonuçlarını değerlendirmek için yapılan Kruskal Wallis Analiz sonuçlarına göre kaçış latanslarının hesaplandığı 3. ve 4. günde gruplar arası kaçış latans süreleri arasında anlamlı farklılık saptandı ($p<0,05$). Dwass-Steel-Critchlow-Fligner testine göre farklılığın hangi ikili grup arasındaki farklılıktan kaynaklandığı değerlendirildiğinde; amiloid beta 1-42 verilen grubun 3. ve 4.gün kaçış latansı değerlerinin, kontrol grubu kaçış latansı değerlerinden yüksek olduğu bulundu ($p<0,05$).

Friedman Test sonuçlarında tüm gruplarda günler arasında kaçış latans süresinde anlamlı farklılık saptandı ($p<0,05$). Friedman Testinde elde edilen bu anlamlılık Durbin-Conover post-hoc testiyle değerlendirildiğinde, amiloid beta 1-42 grubunun 2. ile 4.günleri arasında kaçış latans süreleri açısından anlamlı farklılık saptanmadı; kontrol grubu, taurin grubu ve taurin verilen amiloid beta 1-42 grubunun kaçış latansı süresinin ise 4. günde, 2. güne oranla anlamlı olarak daha düşük olduğu görüldü ($p<0,05$).

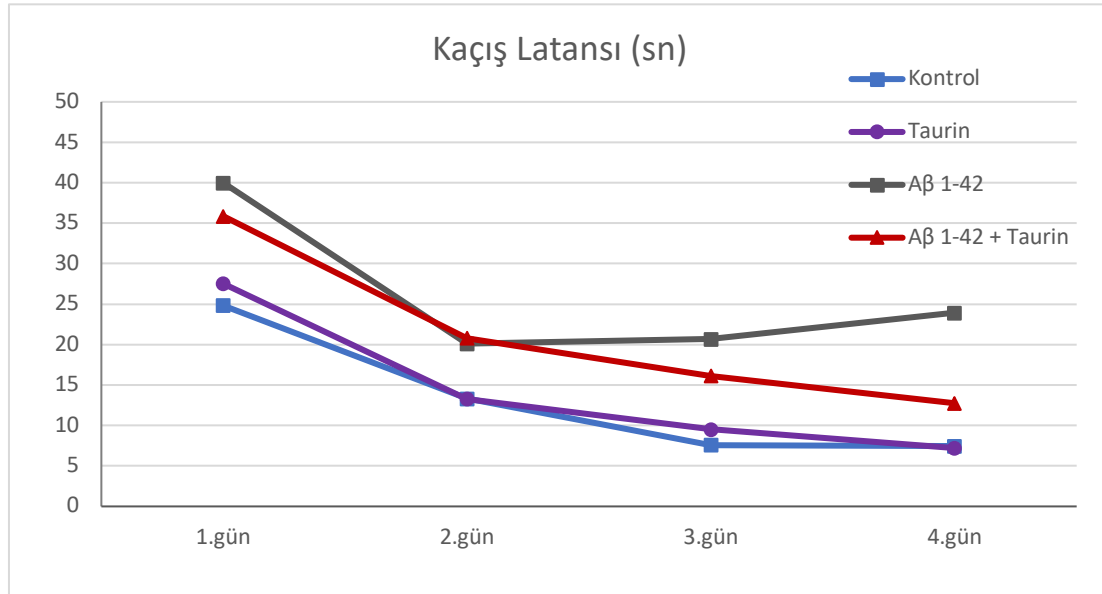
Tablo 4-4 MST Testi (28.-32. Günler) Kaçış Latans Süreleri

2.TUR	1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN	4.GÜN	Friedman Testi P değerleri
Platforma ulaşma süresi (sn)	Ortalama ± Standart Hata	Ortalama ± Standart Hata	Ortalama ± Standart Hata	Ortalama ± Standart Hata	
Kontrol	24.8 ± 2.82	13.3 ± 3.12	7.57 ± 0.599	7.46 ± 0.565	0.008
Taurin	27.5 ± 4.60	13.3 ± 2.48	9.54 ± 1.309	7.21 ± 0.504	0.008
Amiloid Beta 1-42	40.00 ± 6.09	20.1 ± 3.61	20.69 ± 4.456	23.94 ± 5.781	0.014
Amiloid Beta 1-42+Taurin	35.9 ± 7.11	20.8 ± 2.65	16.16 ± 3.091	12.75 ± 1.747	0.002
Kruskal Wallis Analizi p değerleri	0.210	0.085	0.011	0.005	



* kontrol grubuna göre anlamlı farklılık (p<0,05)

Şekil 4-3 MST Testi (28.-32. günler) Kaçış Latans Süreleri

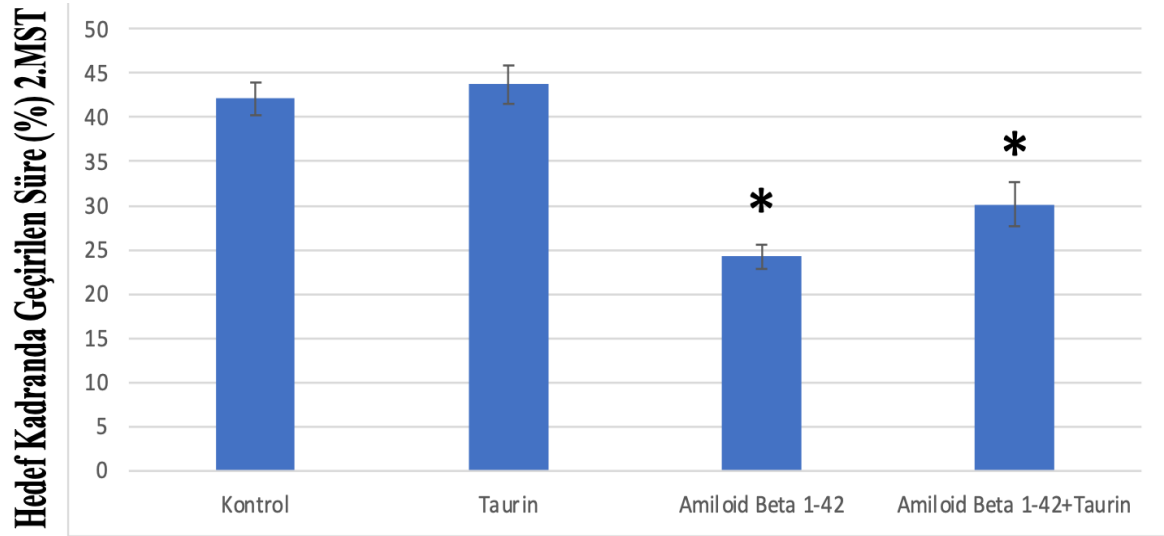


Şekil 4-4 MST Testi (28.-32. günler) Kaçış Latans Sürelerinin Günlere Göre Değişimi

28.-32. günler arasında yapılan Morris Su Tankı testinin 5. gününe ait olan probe test sonuçları Kruskal Wallis analizi ile değerlendirildi. Hedef kadranda geçirilen sürelerin kıyaslandığı bu analizde gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı ($p<0,05$). Dwass-Steel-Critchlow-Fligner testine göre farklılığın hangi ikili grup arasındaki farklılıktan kaynaklandığı değerlendirildiğinde; amiloid beta 1-42 verilmiş olan Alzheimer benzeri hastalık grubunun ve taurin tedavisi uygulanmış olan amiloid beta 1-42 grubunun, hedef kadranda geçirdiği süre kontrol grubuna göre düşük bulundu ($p<0,05$). Taurin tedavisi uygulanmış olan amiloid beta 1-42 grubunun hedef kadranda geçirmiş olduğu süre, amiloid beta 1-42 grubuna göre daha yüksek bulunmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Amiloid beta 1-42 grubunun hedef kadranda geçirdiği süre %25'in altında iken, taurin uygulanmış olan amiloid beta 1-42 grubunda ise hedef kadranda geçirilen süre %25'in üstündeydi. Hedef kadranda geçirilen sürenin %25'in üzerinde olması, diğer kadrarlarda geçirilen süreye oranla bu kadranda daha fazla süre geçirildiğine işaret etmekte olup bu durumun tesadüfen gerçekleşmiş olma ihtimalini azaltmaktadır.

Tablo 4-5 MST Testi (28.-32. günler) 5.Gün Hedef Kadranda Geçirilen Süreler

28.-32. günler arası MST testi (5.gün)	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
Hedef Kadranda Geçirilen Süre(%) (2.MST)	Kontrol	7	42.1	1.86
	Taurin	7	43.7	2.16
	Amiloid Beta 1-42	8	24.2*	1.42
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	8	30.1*	2.53
	*kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0,05$)			

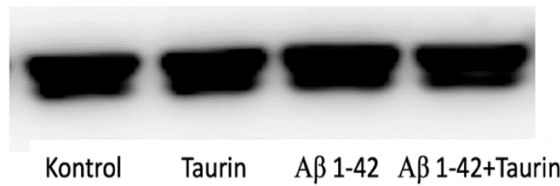


* kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0,05$)

Şekil 4-5 MST Testi (28.-32. günler) 5.Gün Hedef Kadrandaki Geçirilen Süreler

4.4. Western Blot Sonuçları

Çalışmada beyin dokusunda, apoptoz ile ilişkili parametreler olan proapoptotik bax ile aktif kaspaz-3 ve antiapoptotik olan bcl-2 proteinleri Western Blot metoduyla incelendi. Yükleme kontrolü olarak seçilmiş olan β -aktin band yoğunluğuna oranlanarak hesaplamalar yapıldı. Beta aktin görüntüsü;



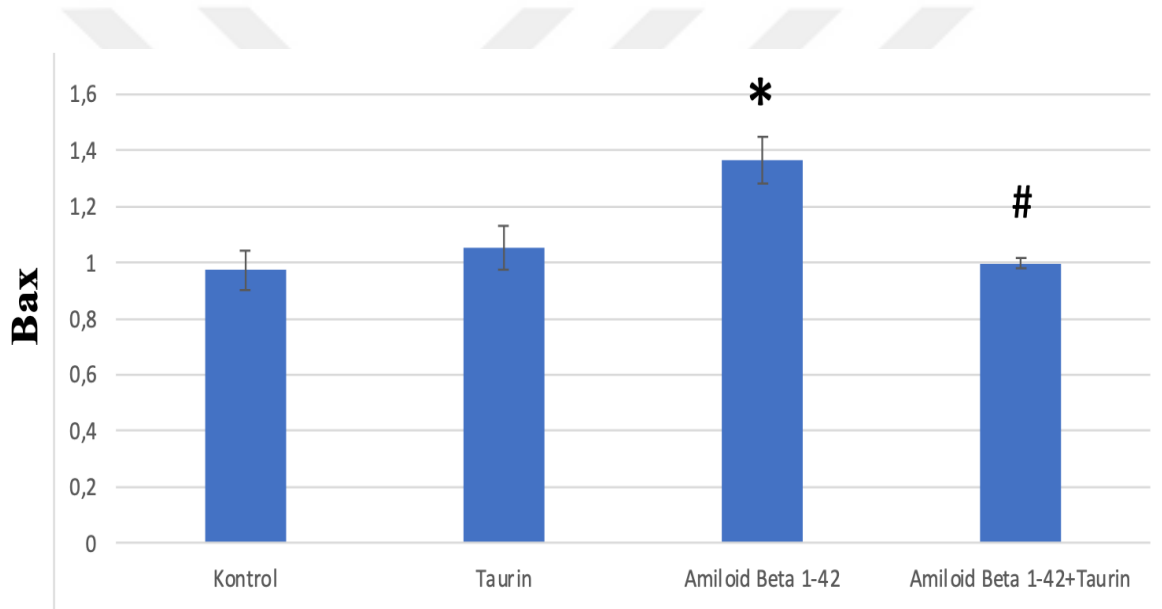
Resim 4-3 Beta Aktin Proteinine Ait Bant Görüntüleri (Western Blot)

Bax Proteini

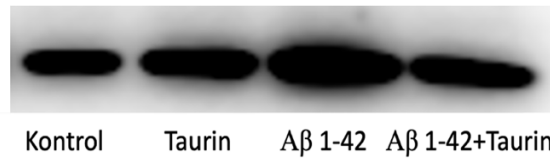
Kruskal Wallis analiz sonucunda bax proteininde gruplar arası anlamlı farklılık saptandı ($p<0,05$). İkili grup karşılaştırmalarında proapoptotik olan bax protein seviyeleri, amiloid beta 1-42 uygulanmış olan Alzheimer benzeri hastalık grubunda; kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). Taurin tedavisi uygulanmış olan amiloid beta 1-42 grubunun bax protein seviyeleri ise; amiloid beta 1-42 uygulama grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı ($p<0,05$).

Tablo 4-6 Bax Proteini (Western Blot) İstatistiksel Veriler

	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
Bax	Kontrol	6	0.973	0.0702
	Taurin	6	1.054	0.0784
	Amiloid Beta 1-42	6	1.366*	0.0829
	Amiloid Beta 1-42 + Taurin	6	0.997#	0.0183
	* kontrol grubuna göre anlamlı farklılık (p<0,05) # Aβ 1-42 grubuna göre anlamlı farklılık (p<0,05)			



Şekil 4-6 Bax Proteini (Western Blot)



Resim 4-4 Bax Proteinine Ait Bant Görüntüleri (Western Blot)

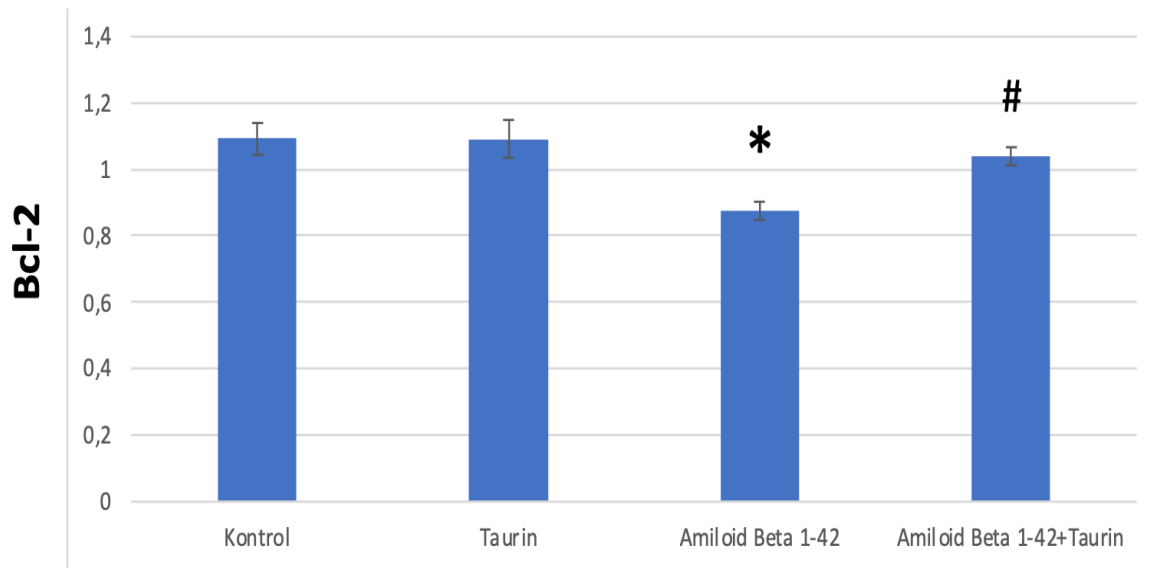
Bcl-2 Proteini

Kruskal Wallis analiz sonucunda bcl-2 proteininde gruplar arası anlamlı farklılık saptandı (p<0,05). İkili grup karşılaştırmalarında antiapoptotik olan bcl-2 protein seviyeleri, amiloid beta 1-42 uygulanmış olan Alzheimer benzeri hastalık grubunda; kontrol grubuna göre

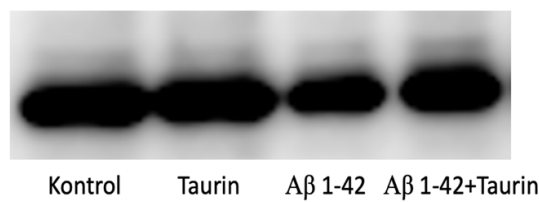
anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,05$). Taurin tedavisi uygulanmış olan amiloid beta 1-42 grubunun bcl-2 protein seviyeleri ise; amiloid beta 1-42 uygulama grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı ($p<0,05$).

Tablo 4-7 Bcl-2 Proteini (Western Blot) İstatistiksel Veriler

	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
Bcl-2	Kontrol	6	1.092	0.0463
	Taurin	6	1.091	0.0562
	Amiloid Beta 1-42	6	0.877*	0.0281
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	6	1.040#	0.0275
	* kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0,05$) # A β 1-42 grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0,05$)			



Şekil 4-7 Bcl-2 Proteini (Western Blot)



Resim 4-5 Bcl-2 Proteinine Ait Bant Görüntüleri (Western Blot)

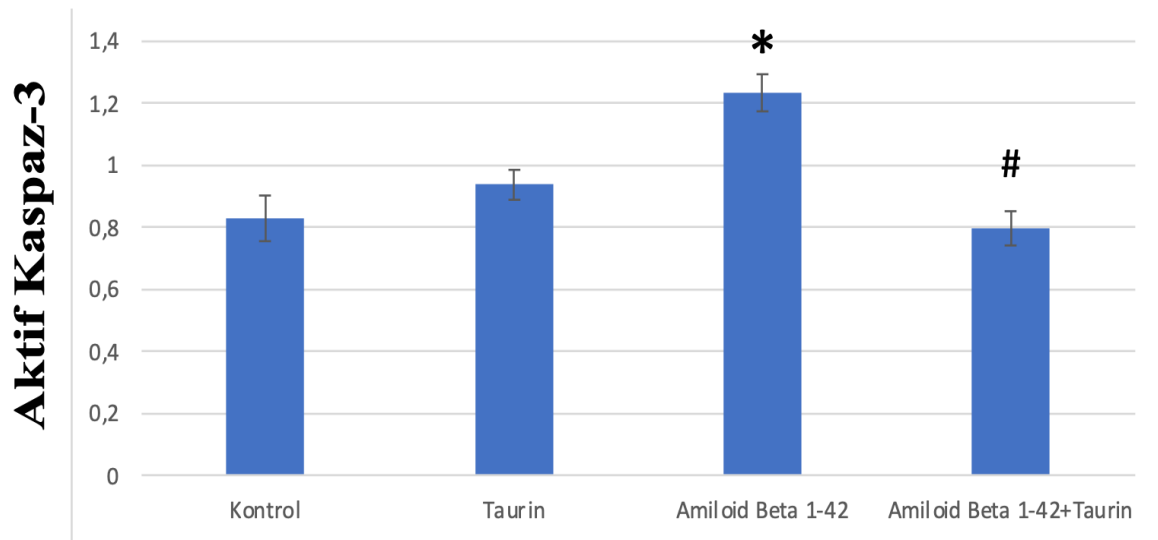
Aktif Kaspaz-3 (Cleaved Caspase-3) Proteinini

Kruskal Wallis analiz sonucunda aktif kaspaz-3 proteininde gruplar arası anlamlı farklılık saptandı ($p<0,05$). İkili grup karşılaştırmalarında apoptotik olan aktif kaspaz-3 protein seviyeleri, amiloid beta 1-42 uygulanmış olan Alzheimer benzeri hastalık grubunda; kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). Taurin tedavisi uygulanmış olan amiloid beta 1-42 grubunun aktif kaspaz-3 protein seviyeleri ise; amiloid beta 1-42 uygulama grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı ($p<0,05$).

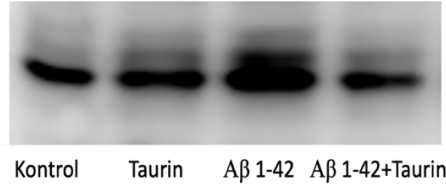
Tablo 4-8 Aktif Kaspaz-3 Proteinini (Western Blot) İstatistiksel Veriler

Aktif Kaspaz-3	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
	Kontrol	6	0.830	0.0728
	Taurin	6	0.937	0.0494
	Amiloid Beta 1-42	6	1.232*	0.0600
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	6	0.795#	0.0552

* kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0,05$)
Aβ 1-42 grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0,05$)



Şekil 4-8 Aktif Kaspaz-3 (Cleaved Caspase-3) Proteinini (Western Blot)



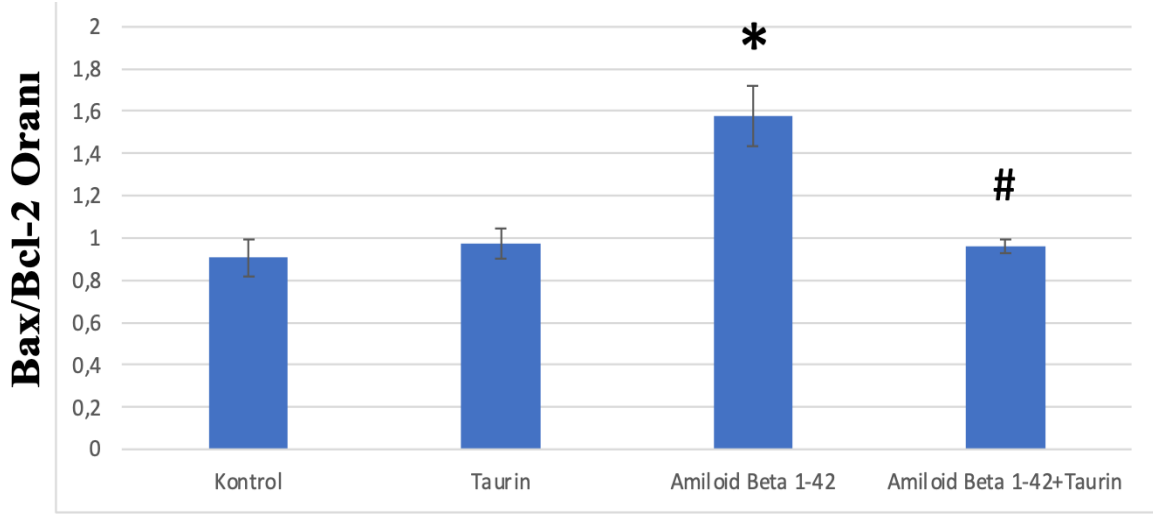
Resim 4-6 Aktif Kaspaz-3 Proteinine Ait Bant Görüntüleri (Western Blot)

Bax/Bcl-2 Oranı

Bu değerlendirmelerle birlikte apoptotik sürecin önemli bir belirteci olan bax/bcl-2 oranı da değerlendirildi. Kruskal Wallis analiz sonucunda bax/bcl-2 oranında gruplar arası anlamlı farklılık saptandı ($p<0,05$). İkili grup karşılaştırmalarında bax/bcl-2 oranı, amiloid beta 1-42 uygulanmış olan Alzheimer benzeri hastalık grubunda; kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). Taurin tedavisi uygulanmış olan amiloid beta 1-42 grubunun bax/bcl-2 oranı ise; amiloid beta 1-42 uygulama grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı.

Tablo 4-9 Bax/Bcl-2 Oranı (Western Blot) İstatistiksel Veriler

	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
bax/bcl-2	Kontrol	6	0.906	0.0884
	Taurin	6	0.974	0.0699
	Amiloid Beta 1-42	6	1.577*	0.1414
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	6	0.962#	0.0333
	* kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0,05$) # Aβ 1-42 grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0,05$)			



Şekil 4-9 Bax/Bcl-2 Oranı (Western Blot)

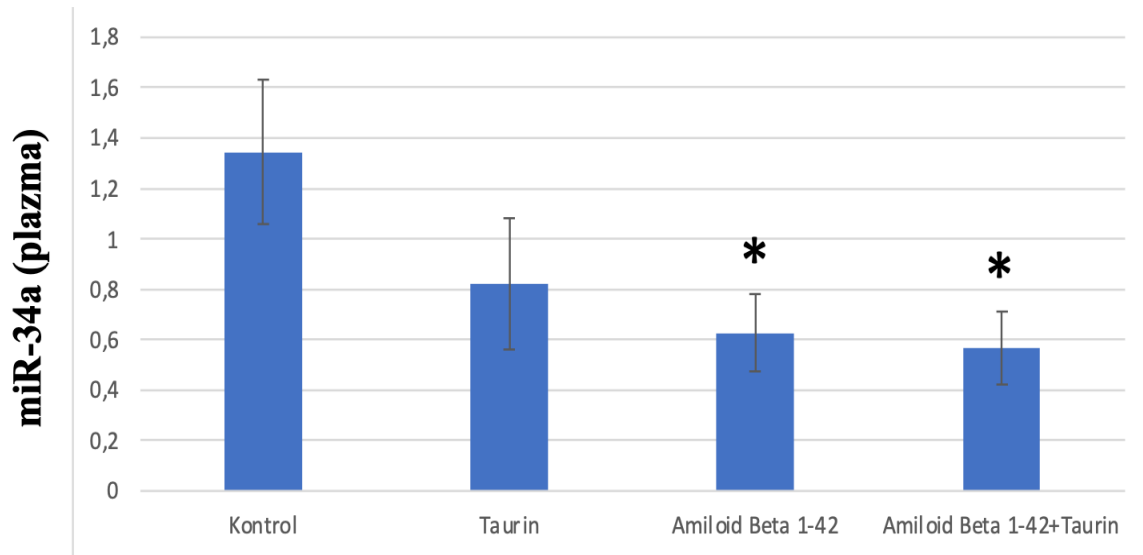
4.5. miR-34a (qPCR) Sonuçları

Beyin dokusu ve plazmadan alınan numunelerden qPCR aracılığıyla; miR-34a seviyelerinin ölçümü yapıldı.

Amiloid beta 1-42 uygulanmış olan Alzheimer benzeri hastalık modeli grubunda ve taurin tedavisi uygulanmış olan amiloid beta 1-42 grubunda plazma miR-34a seviyelerinin, kontrol grubuna göre önemli oranda düşük olduğu görülmektedir. Buna rağmen Kruskal Wallis analizinde gruplar arası karşılaştırmada anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$). Bu duruma, aslında sadece kontrol grubuyla kıyaslamak amacıyla kullanmış olduğumuz taurin grubunun standart sapma ve hatasının neden olduğunu düşündüğümüzden ve bu önemli farklılığın gözden kaçmaması için ikili karşılaştırma amacıyla Mann Whitney U testi uygulandı. İkili karşılaştırma sonucunda amiloid beta 1-42 ve amiloid beta 1-42+Taurin gruplarının plazma miR-34a seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,05$), kontrol grubu ve taurin grubu arasında ise anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$).

Tablo 4-10 miR-34a (Plazma) İstatistiksel Veriler

plazma miR-34a (fold change)	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
	Kontrol	7	1.345	0.286
	Taurin	7	0.822	0.258
	Amiloid Beta 1-42	8	0.628*	0.156
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	8	0.569*	0.144
	* kontrol grubuna göre anlamlı farklılık (p<0,05)			

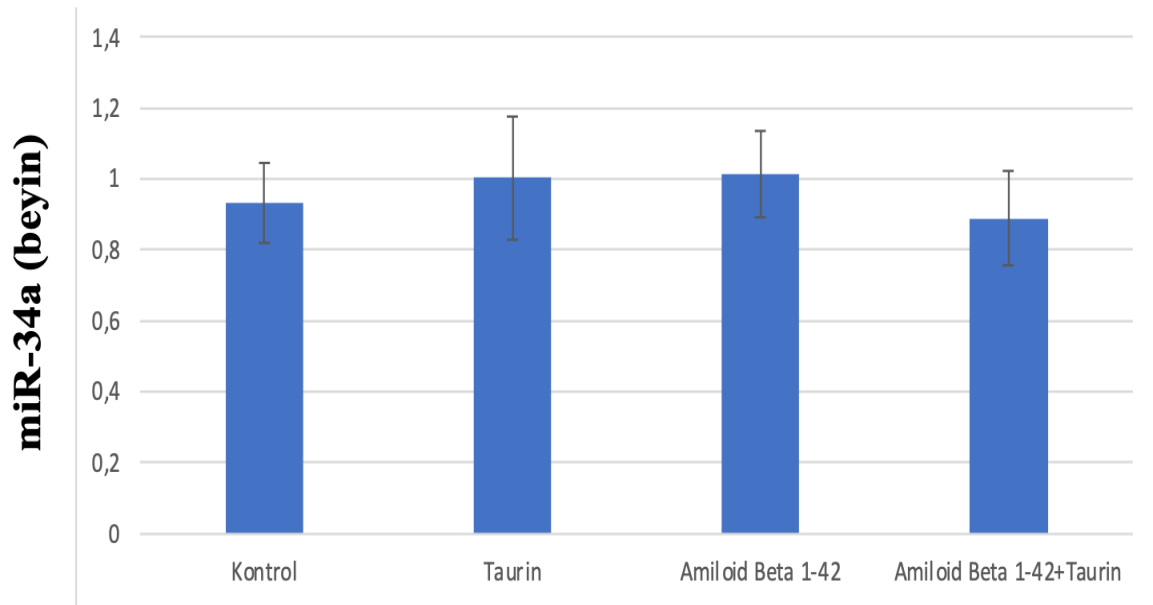


Şekil 4-10 Plazma miR-34a

Beyin dokusu miR-34a seviyelerinde ise gruplar arası anlamlı farklılık saptanmadı (p>0,05).

Tablo 4-11 miR-34a (Beyin) İstatistiksel Veriler

beyin miR-34a (fold change)	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
	Kontrol	6	0.932	0.111
	Taurin	6	1.003	0.172
	Amiloid Beta 1-42	7	1.015	0.122
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	7	0.889	0.133



Şekil 4-11 Beyin miR-34a

4.6. TAS ve TOS Sonuçları

Oksidatif Stres İndeksi (OSI)

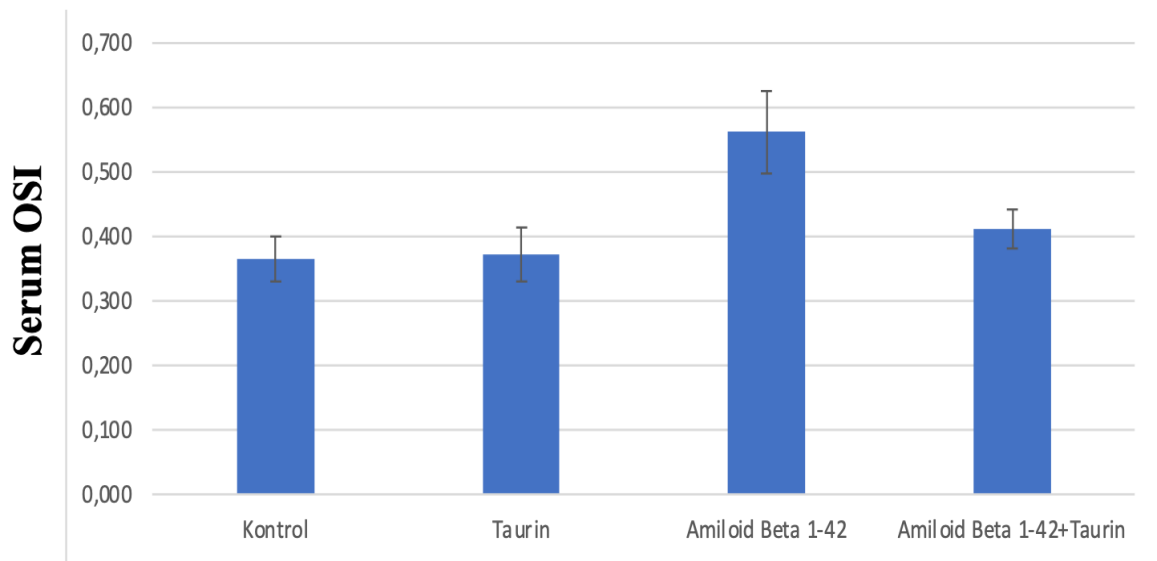
Total Antioksidan Seviye (TAS) ve Total Oksidan Seviye (TOS) ölçümleri organizmanın oksidatif durumu hakkında bilgi veren tetkiklerdir. Total Oksidan Seviyenin, Total Antioksidan Seviyeye oranının formüle edilmiş hali de Oksidatif Stres İndeksi (OSI)'ni verir. Bu değerin yüksek olması organizmada gelişen oksidatif strese işaret etmektedir.

Serum OSI

Kruskal Wallis analiz sonucunda serum OSI’de gruplar arası anlamlı farklılık saptanmadı, ancak veriler anlamlılığa yakındı ($p=0,060$). Serum OSI değeri, amiloid beta 1-42 uygulanmış olan Alzheimer benzeri hastalık grubunda; kontrol grubuna göre yüksekti, taurin tedavisi uygulanmış olan amiloid beta 1-42 grubunun serum OSI değeri ise; amiloid beta 1-42 uygulama grubuna göre düşüktü, ancak bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 4-12 Serum OSI İstatistiksel Veriler

Serum OSI	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
	Kontrol	7	0.365	0.0345
	Taurin	7	0.373	0.0418
	Amiloid Beta 1-42	8	0.562	0.0639
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	8	0.412	0.0299



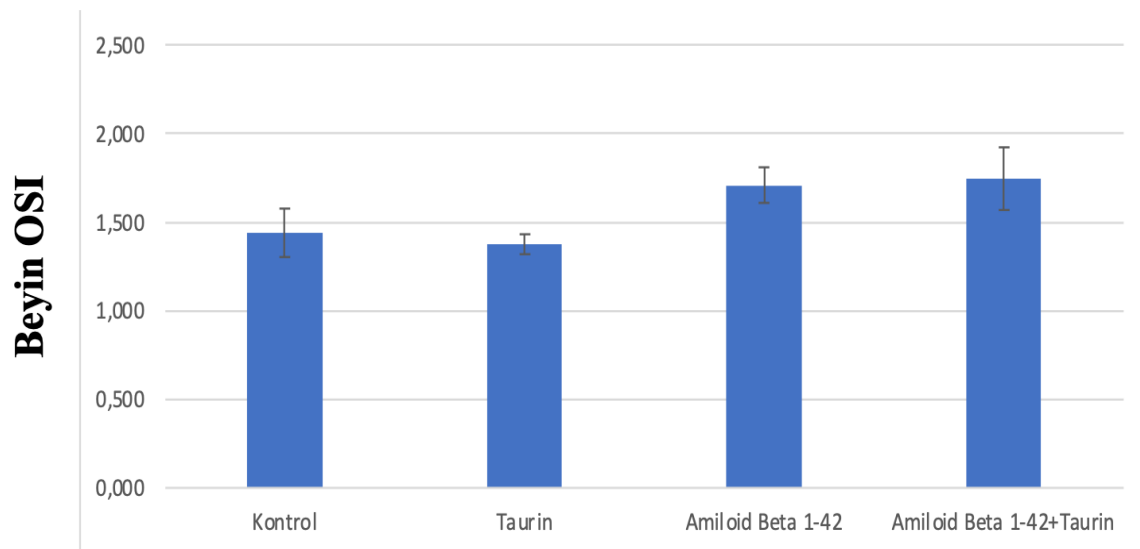
Şekil 4-12 Serum OSI

Beyin OSI

Kruskal Wallis analiz sonucunda beyin OSI seviyelerinde gruplar arası anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$). Amiloid beta 1-42 uygulanmış olan Alzheimer benzeri hastalık grubunda, kontrol grubuna göre daha yüksek olmakla birlikte, bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 4-13 Beyin OSI İstatistiksel Veriler

Beyin OSI	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
	Kontrol	6	1.44	0.1383
	Taurin	6	1.38	0.0564
	Amiloid Beta 1-42	7	1.71	0.1001
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	7	1.74	0.1757



Şekil 4-13 Beyin OSI

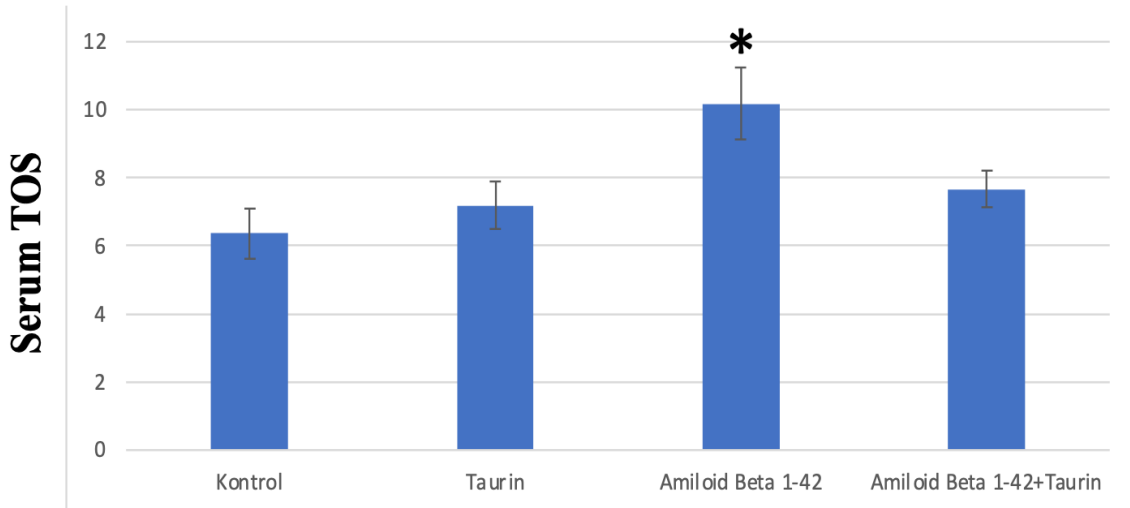
Serum TOS ve TAS

Serum TOS

Kruskal Wallis analiz sonucunda serum total oksidan seviye (TOS) değerlerinde gruplar arası anlamlı farklılık saptandı ($p<0,05$). Amiloid beta 1-42 uygulanmış olan Alzheimer benzeri hastalık modeli grubunda serum TOS değerlerinin, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü ($p<0,05$). Taurin tedavisi uygulanmış olan amiloid beta 1-42 grubu serum TOS değerleri, amiloid beta 1-42 grubundan daha düşük olmakla birlikte bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

Tablo 4-14 Serum TOS İstatistiksel Veriler

Serum TOS ($\mu\text{mol/L}$)	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
	Kontrol	7	6.36	0.751
	Taurin	7	7.19	0.684
	Amiloid Beta 1-42	8	10.18*	1.061
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	8	7.67	0.524
	* kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0,05$)			



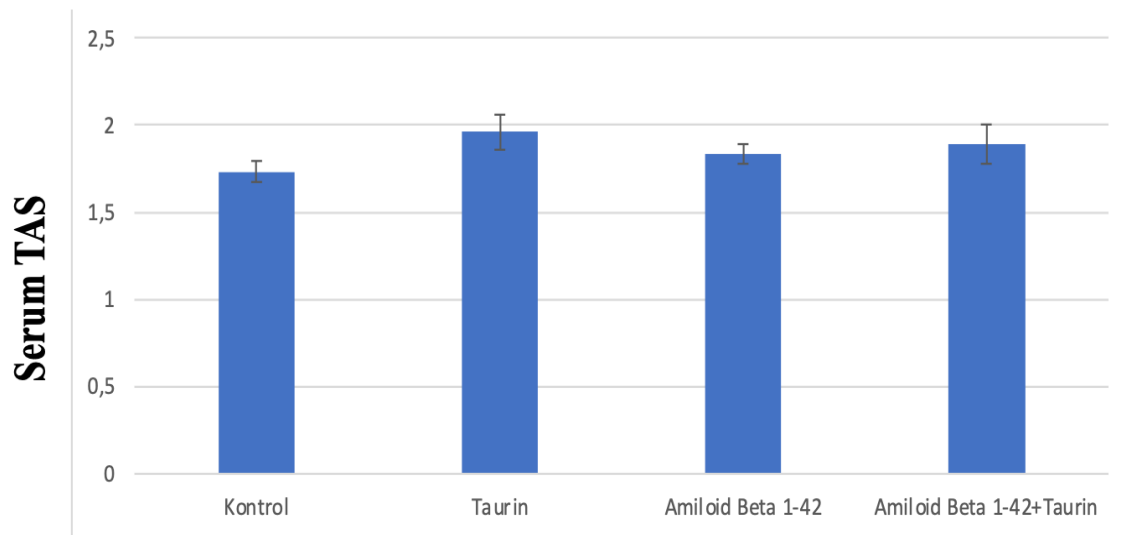
Şekil 4-14 Serum TOS

Serum TAS

Kruskal Wallis analiz sonucunda serum total antioksidan seviye (TAS) değerlerinde gruplar arası anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4-15 Serum TAS İstatistiksel Veriler

Serum TAS (mmol/L)	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
	Kontrol	7	1.73	0.0581
	Taurin	7	1.96	0.1011
	Amiloid Beta 1-42	8	1.83	0.0598
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	8	1.89	0.1119



Şekil 4-15 Serum TAS

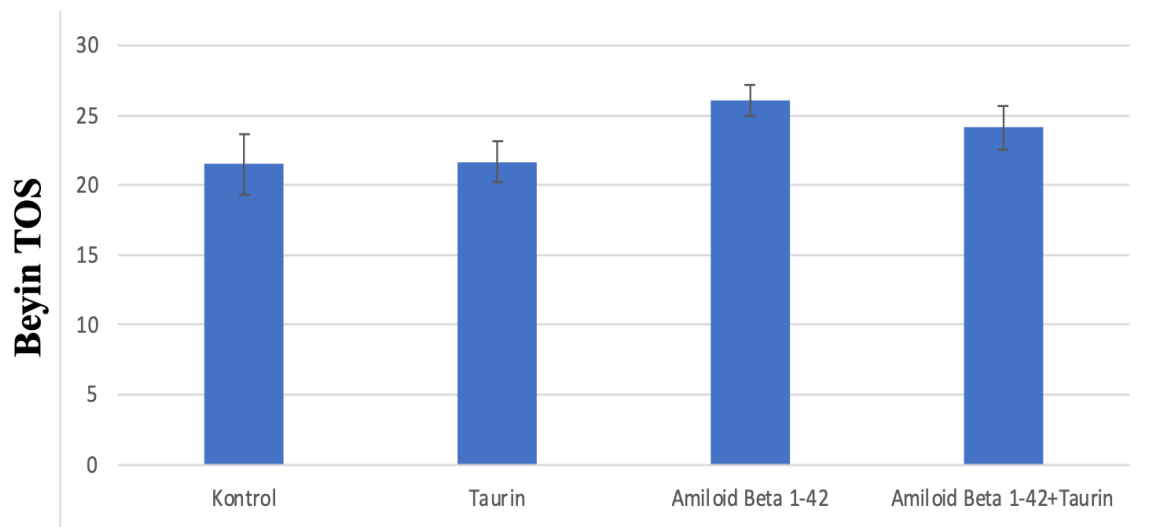
Beyin TOS ve TAS

Beyin TOS

Kruskal Wallis analiz sonucunda beyin total oksidan seviye (TOS) değerlerinde gruplar arası anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$). İkili grup karşılaştırmalarında amiloid beta 1-42 uygulanmış olan Alzheimer benzeri hastalık modeli grubunda beyin TOS değerlerinin, kontrol grubuna göre yüksek olduğu görülmekle birlikte bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 4-16 Beyin TOS İstatistiksel Veriler

Beyin TOS ($\mu\text{mol/L}$)	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
	Kontrol	6	21.5	2.15
	Taurin	6	21.6	1.45
	Amiloid Beta 1-42	7	26.1	1.14
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	7	24.1	1.54



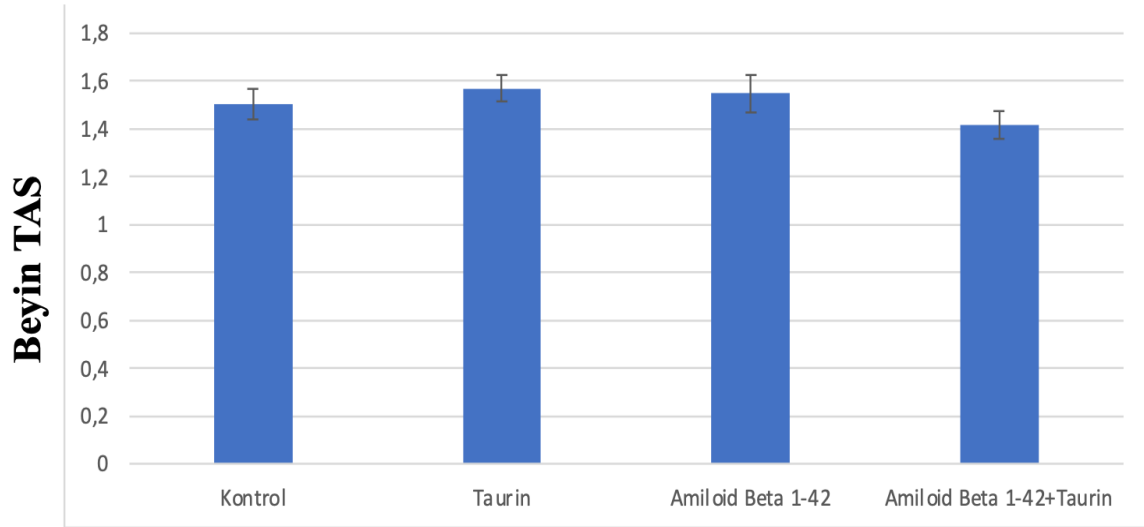
Şekil 4-16 Beyin TOS

Beyin TAS

Kruskal Wallis analiz sonucunda beyin total antioksidan seviye (TAS) değerlerinde gruplar arası anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4-17 Beyin TAS İstatistiksel Veriler

	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
Beyin TAS (mmol/L)	Kontrol	6	1.50	0.0645
	Taurin	6	1.57	0.0546
	Amiloid Beta 1-42	7	1.55	0.0794
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	7	1.42	0.0576



Şekil 4-17 Beyin TAS

4.7. MDA ve GSH Sonuçları

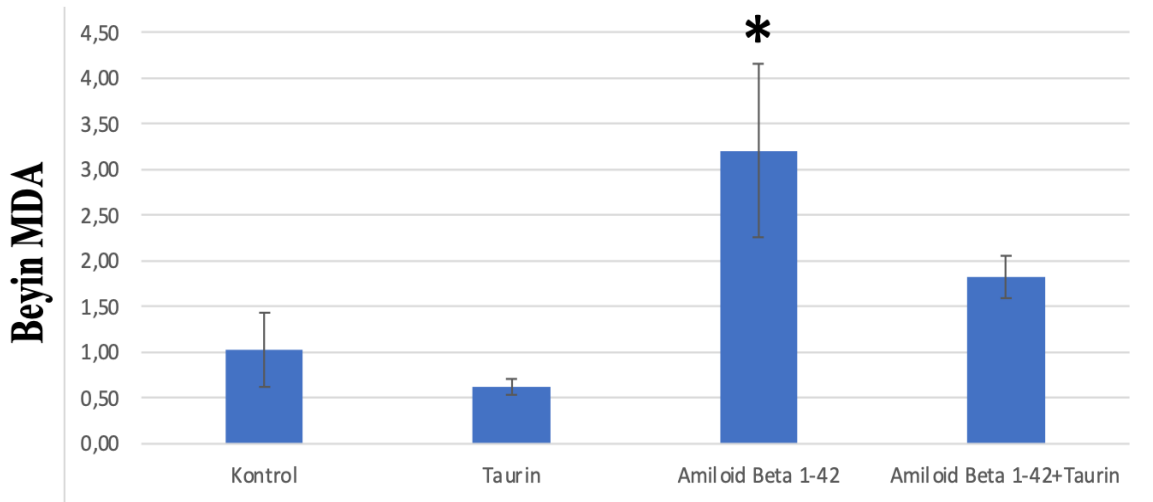
Lipid peroksidasyon ürünü olan malodialdehit (MDA) ve hücreleri radikaller ve peroksitler gibi reaktif oksijen ürünlerinden koruyan glutatyon (GSH) düzeylerinin ölçülmesi oksidatif durumun saptanmasında kullanılabilen diğer bir yöntemdir. Çalışmamızda bu parametreler de değerlendirildi.

Beyin MDA

Kruskal Wallis analiz sonucunda beyin malondialdehit (MDA) değerlerinde gruplar arası anlamlı farklılık saptandı ($p<0,05$). İkili grup karşılaştırmalarında amiloid beta 1-42 uygulanmış olan Alzheimer benzeri hastalık modeli grubunda beyin MDA değerlerinin, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü ($p<0,05$), bununla birlikte taurin uygulaması yapılan amiloid beta 1-42 grubunun beyin MDA değerleri, kontrol grubundan farksızdı ($p>0,05$). Taurin tedavisi uygulanmış olan amiloid beta 1-42 grubu beyin MDA değerleri, amiloid beta 1-42 grubundan daha düşük olmakla birlikte bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

Tablo 4-18 Beyin MDA İstatistiksel Veriler

Beyin MDA (nmol/ml)	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
	Kontrol	6	1.022	0.4087
	Taurin	6	0.618	0.0865
	Amiloid Beta 1-42	7	3.206*	0.9526
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	7	1.823	0.2318
	* kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0,05$)			



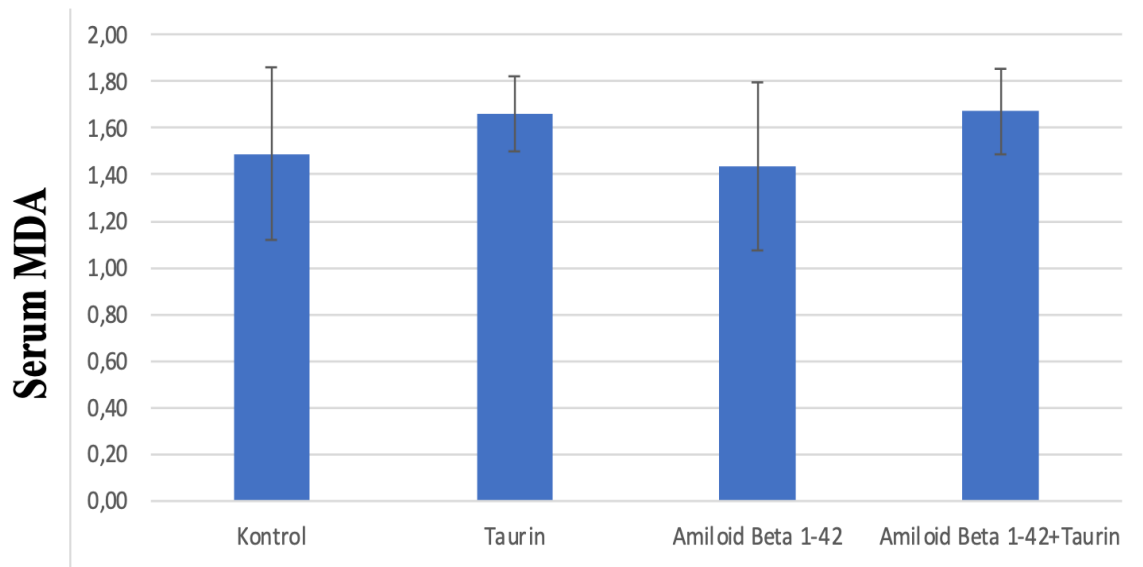
Şekil 4-18 Beyin MDA

Serum MDA

Kruskal Wallis analiz sonucunda serum malondialdehit (MDA) değerlerinde gruplar arası anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4-19 Serum MDA İstatistiksel Veriler

Serum MDA (nmol/ml)	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
	Kontrol	7	1.49	0.370
	Taurin	7	1.66	0.161
	Amiloid Beta 1-42	8	1.44	0.361
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	8	1.67	0.183



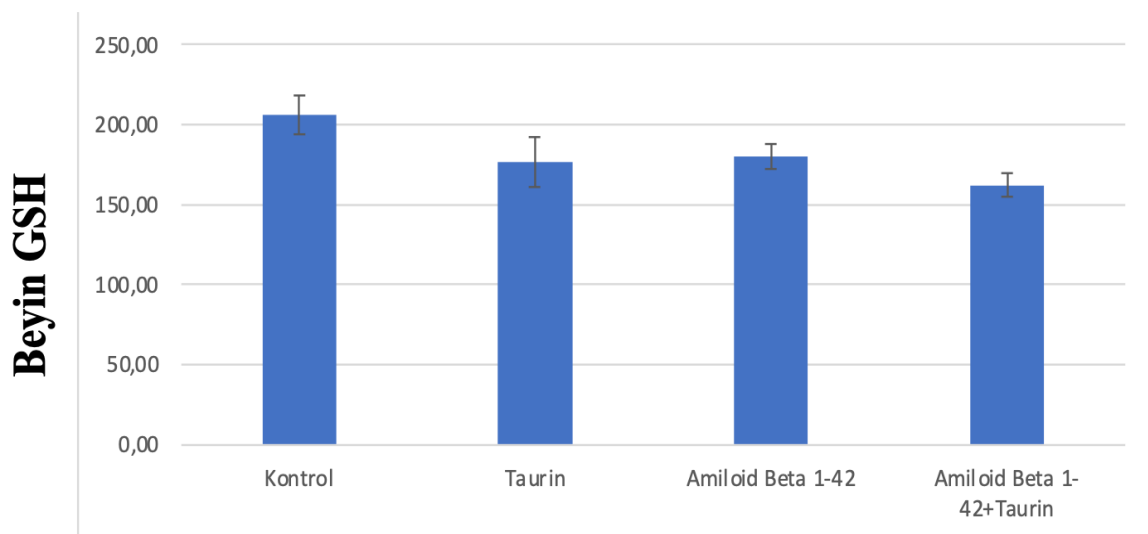
Şekil 4-19 Serum MDA

Beyin GSH

Kruskal Wallis analiz sonucunda beyin glutatyon (GSH) değerlerinde gruplar arası anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$). Amiloid beta 1-42 uygulanmış olan Alzheimer benzeri hastalık modeli grubunda ve taurin tedavisi uygulanmış olan amiloid beta 1-42 grubunda beyin GSH değerlerinin; kontrol grubuna göre düşük olduğu görülmekle birlikte bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 4-20 Beyin GSH İstatistiksel Veriler

	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
Beyin GSH (mg/L)	Kontrol	6	206	12.01
	Taurin	6	177	15.54
	Amiloid Beta 1-42	7	180	7.91
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	7	162	7.33



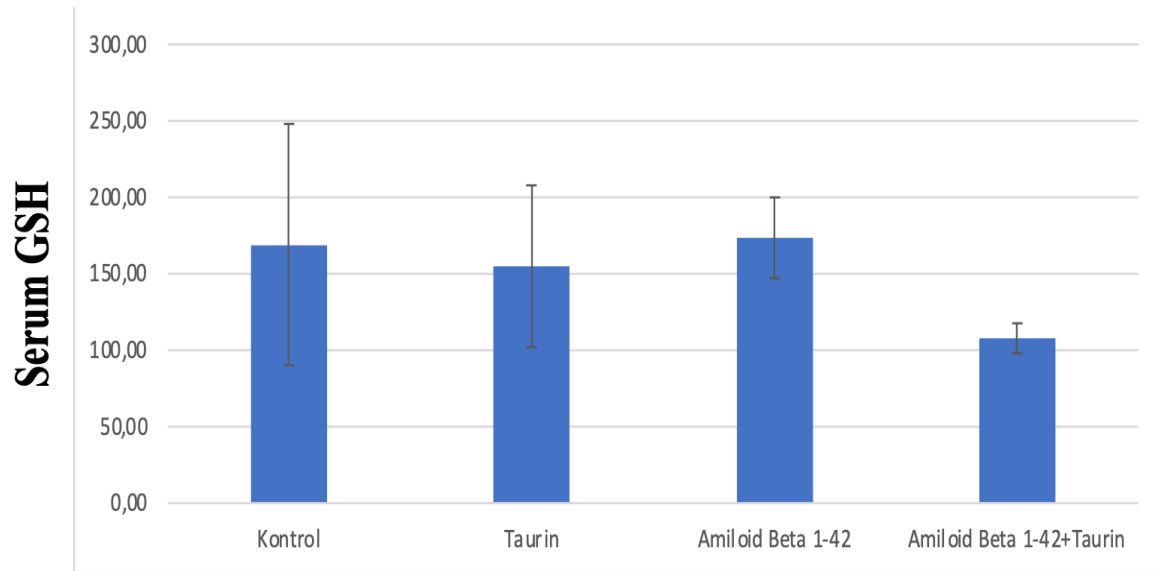
Şekil 4-20 Beyin GSH

Serum GSH

Kruskal Wallis analiz sonucunda serum glutatyon (GSH) değerlerinde gruplar arası anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4-21 Serum GSH İstatistiksel Veriler

Serum GSH (mg/L)	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
	Kontrol	7	169	78.85
	Taurin	7	155	53.24
	Amiloid Beta 1-42	8	174	26.38
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	8	107	9.85



Şekil 4-21 Serum GSH

4.8. ELISA Sonuçları

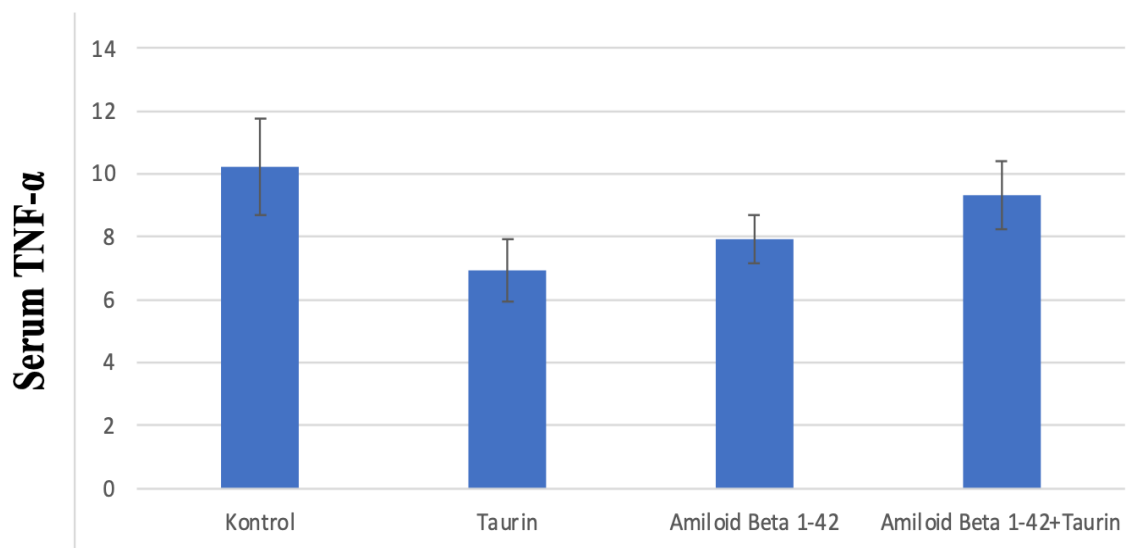
Elisa tekniğiyle TNF- α , IL-1 β ve IL-10 gibi inflamatuvar süreçle ilişkili sitokinler çalışılmıştır.

Serum TNF- α

Kruskal Wallis analiz sonucunda serum TNF- α değerlerinde gruplar arası anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4-22 Serum TNF- α İstatistiksel Veriler

Serum TNF- α (pg/ml)	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
	Kontrol	7	10.22	1.539
	Taurin	7	6.92	0.999
	Amiloid Beta 1-42	8	7.92	0.773
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	8	9.33	1.072



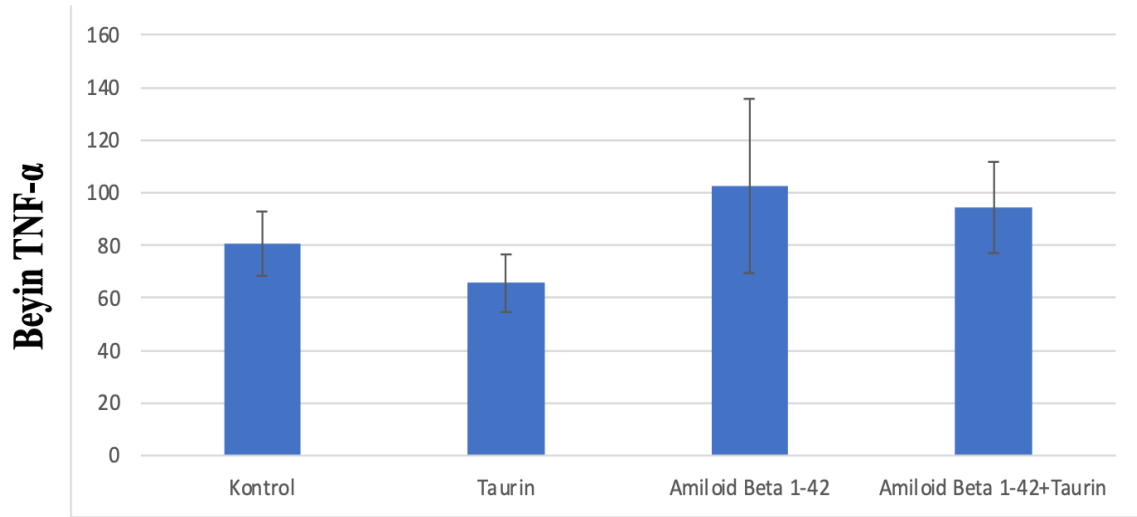
Şekil 4-22 Serum TNF- α

Beyin TNF- α

Kruskal Wallis analiz sonucunda beyin TNF- α değerlerinde gruplar arası anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$). Amiloid beta 1-42 uygulanmış olan Alzheimer benzeri hastalık modeli grubunda beyin TNF- α değerlerinin, kontrol grubuna göre yüksek olduğu görülmekle birlikte istatistiksel anlamlılık saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4-23 Beyin TNF- α İstatistiksel Veriler

	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
Beyin TNF- α (pg/ml)	Kontrol	6	80.8	12.3
	Taurin	6	65.6	10.9
	Amiloid Beta 1-42	7	102.6	33.0
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	7	94.3	17.2



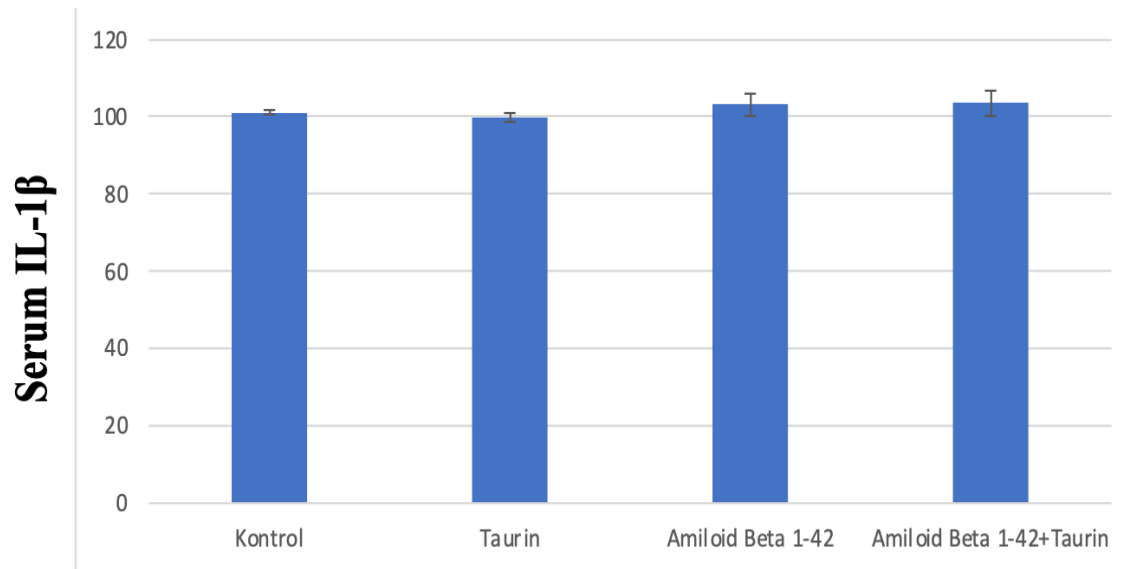
Şekil 4-23 Beyin TNF- α

Serum IL-1 β

Kruskal Wallis analiz sonucunda serum IL-1 β değerlerinde gruplar arası anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4-24 Serum IL-1 β İstatistiksel Veriler

Serum IL-1 β (pg/ml)	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
	Kontrol	7	101.0	0.621
	Taurin	7	99.7	1.132
	Amiloid Beta 1-42	8	103.1	2.895
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	8	103.5	3.424



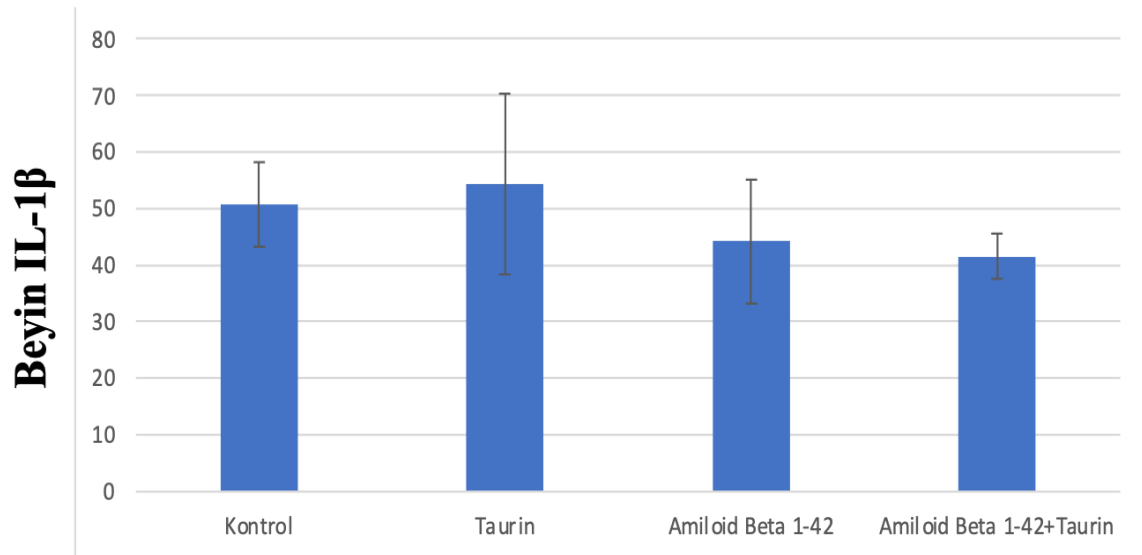
Şekil 4-24 Serum IL-1 β

Beyin IL-1 β

Kruskal Wallis analiz sonucunda beyin IL-1 β değerlerinde gruplar arası anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4-25 Beyin IL-1 β İstatistiksel Veriler

	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
Beyin IL-1β (pg/ml)	Kontrol	6	50.7	7.41
	Taurin	6	54.3	16.04
	Amiloid Beta 1-42	7	44.1	10.95
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	7	41.5	4.00



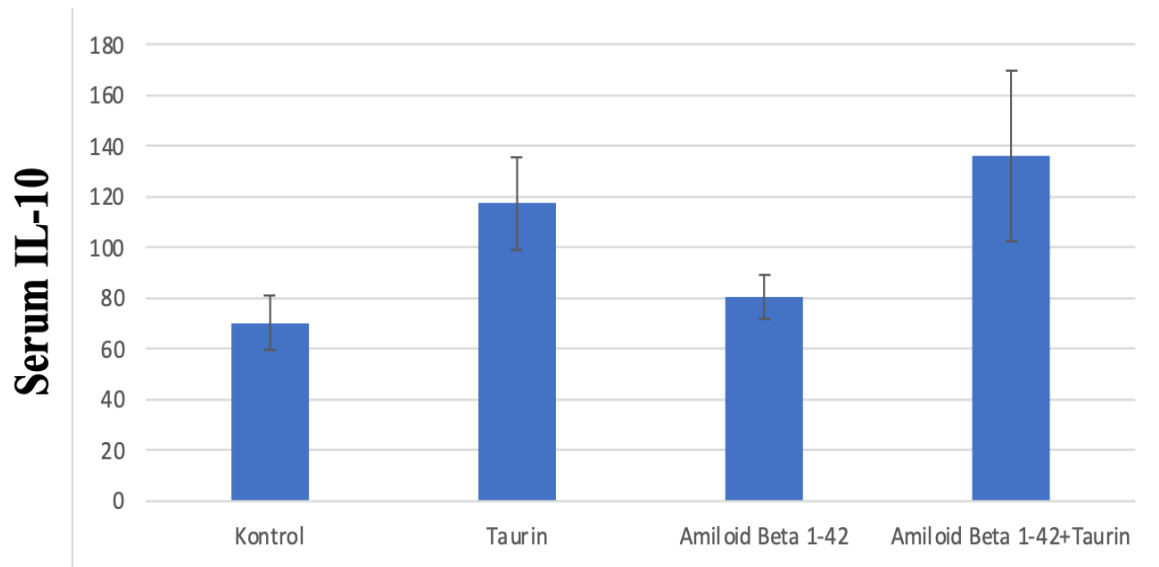
Şekil 4-25 Beyin IL-1 β

Serum IL-10

Kruskal Wallis analiz sonucunda serum IL-10 değerlerinde gruplar arası anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$). Taurin uygulanmış olan amiloid beta 1-42 grubu, amiloid beta 1-42 grubundan daha yüksek serum IL-10 değerine sahip olmakla birlikte bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

Tablo 4-26 Serum IL-10 İstatistiksel Veriler

Serum IL-10 (pg/ml)	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
	Kontrol	7	70.2	10.79
	Taurin	7	117.5	18.24
	Amiloid Beta 1-42	8	80.5	8.60
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	8	136.1	33.85



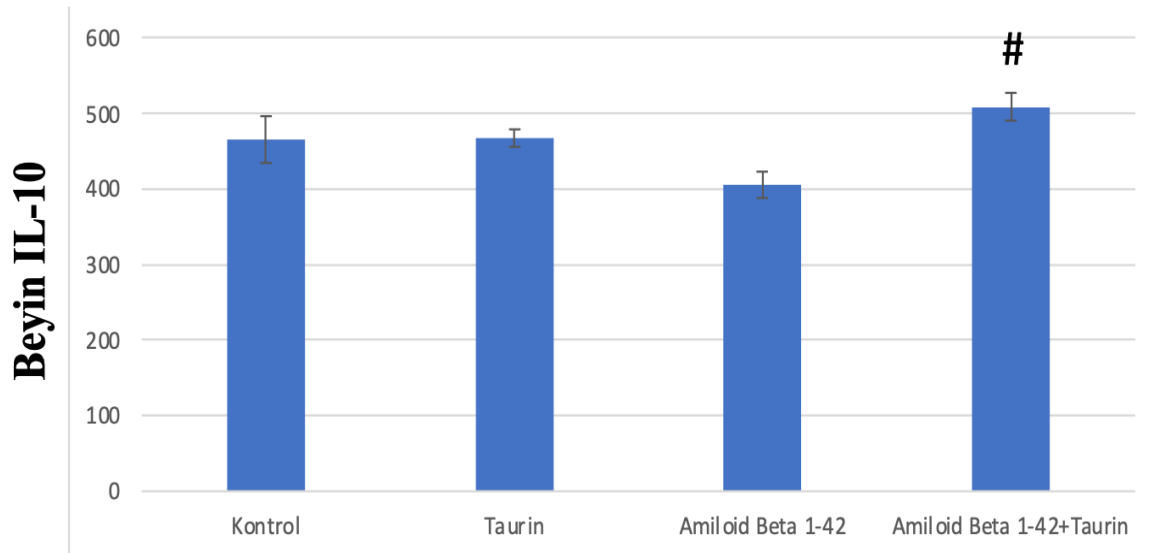
Şekil 4-26 Serum IL-10

Beyin IL-10

Kruskal Wallis analiz sonucunda beyin IL-10 değerlerinde gruplar arası anlamlı farklılık saptandı ($p<0,05$). Taurin uygulanmış olan amiloid beta 1-42 grubunun beyin IL-10 değerleri, amiloid beta 1-42 grubundan yüksek bulundu ($p<0,05$).

Tablo 4-27 Beyin IL-10 İstatistiksel Veriler

Beyin IL-10 (pg/ml)	Gruplar	N	Ortalama	Standart Hata
	Kontrol	6	465	30.9
	Taurin	6	468	11.7
	Amiloid Beta 1-42	7	405	17.1
	Amiloid Beta 1-42+Taurin	7	508 [#]	18.4
# Aβ 1-42 grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0,05$)				



Şekil 4-27 Beyin IL-10

4.9. Korelasyon Analizleri

Yapılan Spearman korelasyon analizleri sonucunda saptanan önemli korelasyonlar şu şekildedir;

Plazma miR-34a ile beyin bcl-2 arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Tablo 4-28 Plazma miR-34a-Bcl-2 Korelasyon Analizi

Korelasyon Analizi		Plazma miR-34a
Bcl-2	Spearman's rho	0.392
	df	22
	p-value	0.030
Not: H_a pozitif korelasyon seçilmiştir.		

Beyin IL-10 ile bcl-2 arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Tablo 4-29 Beyin IL-10-Bcl-2 Korelasyon Analizi

Korelasyon Analizi		Beyin IL-10
Bcl-2	Spearman's rho	0.426
	df	22
	p-value	0.020
Not: H_a pozitif korelasyon seçilmiştir.		

Beyin TOS ile bax arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür ($p<0,05$) .

Tablo 4-30 Beyin TOS-Bax Korelasyon Analizi

Korelasyon Analizi		Beyin TOS
Bax	Spearman's rho	0.449
	df	22
	p-value	0.015
Not: H_a pozitif korelasyon seçilmiştir.		

Serum OSI ile Beyin OSI arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Tablo 4-31 Serum OSI-Beyin OSI Korelasyon Analizi

Korelasyon Analizi		Serum OSI
Beyin OSI	Spearman's rho	0.410
	df	22
	p-value	0.023
Not: H_a pozitif korelasyon seçilmiştir.		

Beyin IL-10 ile bax arasında negatif korelasyon olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

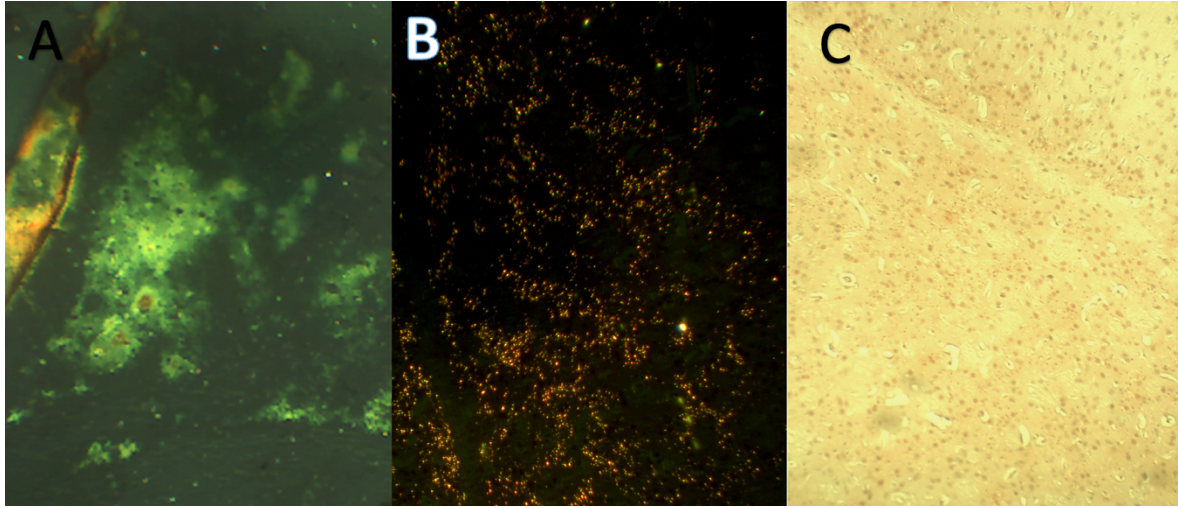
Tablo 4-32 Beyin IL-10-Bax Korelasyon Analizi

Korelasyon Analizi		Beyin IL-10
bax	Spearman's rho	-0.500
	df	22
	p-value	0.007
Not: H_a negatif korelasyon seçilmiştir.		

4.10. Kongo Red Boyama Sonuçları

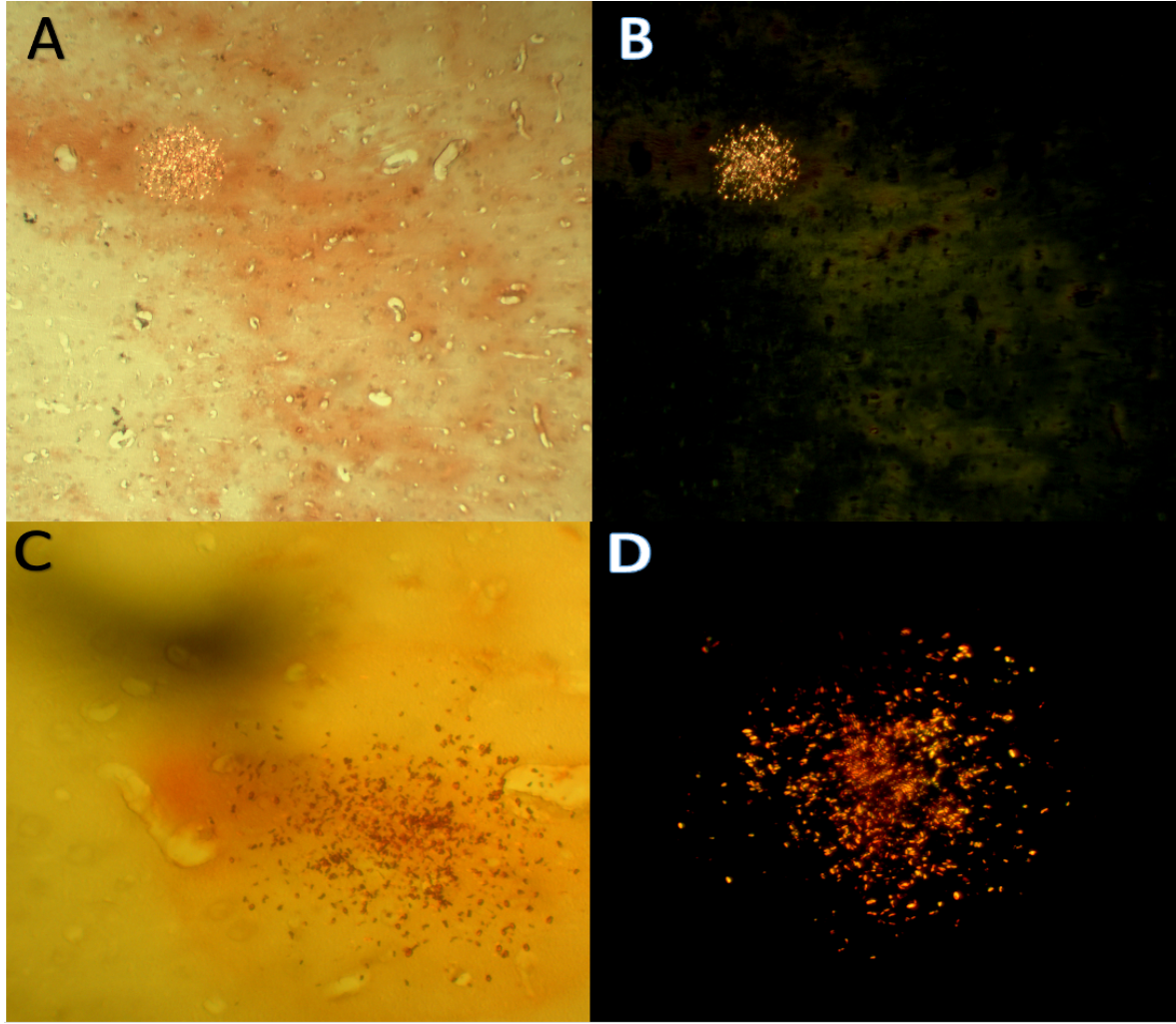
Amiloid yapıları, kongo red ile boyandığında polarize ışık mikroskopunda tipik olarak sarı-yeşil çifte kırınım gösterip, refle vermektedir.

Yapılan kongo red ile boyama sonucunda beyin dokusunda sarı-yeşil refle veren tipik amiloid birikimi görüntüleri elde edildi. Sarı-yeşil çifte kırınım gösteren plak görüntüsü de saptandı (Resim 4.7 ve 4.8).



Resim 4-7 Amiloid depozisyonunu gösteren temsili beyin mikrografları

A: Kongo red ile polarize ışık altında sarı-yeşil refle (100×, paxinos atlası göre 38.plate bölgesi) B: Kongo red ile polarize ışık altında sarı-yeşil refle, amiloid birikimi (100×, paxinos atlası göre 11.plate bölgesi) C: Kongo red ile ışık mikroskopisi görüntüsü (100×, paxinos atlası göre 11.plate bölgesi)



Resim 4-8 Amiloid plaklarını gösteren temsili beyin mikrografları

A. Kongo red ile hafif polarizasyon altında sarı-yeşil refle veren plak yapısı (100×, Paxinos atlası göre 38.plate bölgesi), b. Kongo red ile polarize ışık altında sarı-yeşil refle veren plak yapısı (100×, Paxinos atlası göre 38.plate bölgesi), c. Kongo red ile ışık mikroskopisinde plak yapısı (400×, Paxinos atlası göre 38.plate bölgesi), d. Kongo red ile polarize ışık altında sarı-yeşil refle veren plak yapısı (400×, Paxinos atlası göre 38.plate bölgesi) görünmektedir.



5. TARTIŞMA

Bu uzmanlık tezinde, sıçanlarda A β 1-42'nin intraserebroventriküler enjeksiyonu ile oluşturulmuş Alzheimer benzeri hastalık modelinde taurinin; apoptotik süreçler ve bunun miR-34a ile olan ilişkisi ile oksidatif ve inflamatuvar süreçlere olan etkisi değerlendirilmiştir.

Alzheimer benzeri hastalık modelleri oluşturmak için yapılan çalışmalara bakıldığında transgenik modeller ve transgenik olmayan modeller dikkati çekmektedir. Biz çalışmamızda isv olarak uygulanan amiloid beta 1-42 aracılığıyla indüklenen Alzheimer benzeri hastalık modelini kullandık. Bu model amiloid beta 1-42'nin oluşturduğu nörotoksisitenin etkilerine dayanmakta olup, literatürde en çok dillendirilen hipotez olan amiloid beta kaskad hipotezinde yer alan patogeneze mekanizmalarını iyi taklit ettiği daha önce gösterilmiş olan bir modeldir. İsv A β 1-42 uygulaması yapılan bir çalışmada hem yaşlı hem genç ratlarda lipid peroksidasyonunda artış olduğu gözlenmiştir (Cetin, Yazihan, Dincer, & Akbulut, 2013). Başka bir çalışmada farelere isv olarak uygulanan A β 1-42'nin reaktif oksijen ürünlerini arttırdığı, nöroinflamasyona, sinaptik hasarlara, nörodejenerasyona ve bellek bozukluğuna neden olduğu gösterilmiştir (Amin, Shah, & Kim, 2017). İsv olarak uygulanan A β 1-42'nin sinaptik fonksiyon bozukluğuna ve apoptoza neden olduğu da gösterilmiştir (X. Wu et al., 2018). A β 1-42 peptidi hızlıca agrege olup, oligomer, fibril ve plak yapılarını oluşturarak Alzheimer hastalık patogenezinde de önemli yer tutan kalsiyum homeostaz bozukluğu, oksidatif, inflamatuvar ve apoptotik süreçlerin tetiklenmesi gibi önemli mekanizmaları taklit etmektedir (Shree et al., 2017). Bu nedenlerle isv A β 1-42 uygulaması Alzheimer çalışmalarında oldukça sık kullanılan değerli bir modeldir.

Çalışmada 5 μ g/5 μ l dozundaki A β 1-42 bilateral olarak intraserebroventriküler (isv) uygulanmıştır. Modelin doğruluğunun kontrol edilmesi amacıyla literatürde birçok farklı yöntem bulunmaktadır.

İlk olarak uygulanacak olan A β 1-42'nin intraserebroventriküler bölgeye ait doğru koordinatlara enjekte edildiğinin gösterilmesi için Paxinos atlası ve literatürden yararlanarak belirlenen koordinatlara metilen mavisi enjeksiyonun yapıldığı çalışmalar bulunmaktadır (İlhan, Güney, & Dincer, 2021; H. Y. Kim et al., 2016; Y. Li et al., 2014). Biz de çalışmamız öncesinde bir ön çalışma hayvanına, isv uygulama için belirlemiş olduğumuz koordinatlara (bregmadan 0,8 mm posterior; sagittal suturdan 1,5 mm lateral ve derinlik 3,8 mm) metilen

mavisi enjeksiyonu yaptık (Paxinos & Watson, 2007). Metilen mavisinin ventriküler bölge boyunca uygun şekilde yayıldığını gözledik.

İsv A β 1-42 enjeksiyonu ile oluşturulan Alzheimer benzeri hastalık modelinde, enjekte edilen A β 1-42'nin oligomer formunun enjekte edilmesi nörotoksistenin sağlanması açısından önemlidir. Monomer yapıdaki amiloid beta formunun olumlu etkileri olabileceği gösterilmişken A β 1-42 oligomer formunun önemli toksik etkileri olduğu gösterilmiştir (M. K. Jana et al., 2016; Penke et al., 2020). İsv uygulanacak olan A β 1-42 peptidinin oligomerizasyonunun sağlanması amacıyla, A β 1-42 uygulama öncesinde 3-7 gün arasında 37°C'de inkübe edilmektedir (Aslan Karakelle et al., 2021; Jang et al., 2017; Shekarian et al., 2020; Shen, Chen, Lu, Peng, & Qiu, 2014; Turunc Bayrakdar, Uyanikgil, Kanit, Koylu, & Yalcin, 2014; J. Zhang, Ke, Liu, Qiu, & Peng, 2013). A β 1-42 peptidi oligomerleştikçe kütlesi artmakta ve boyutları değişmektedir, boyut farklılığından yararlanılarak büyüklükçe ayırma kromatografisi ile inceleme yapılabilmekte ve bu incelemeler ile oligomerizasyon lehine bulgular elde edilebilmektedir (Bruggink, Müller, Kuiperij, & Verbeek, 2012; Jan et al., 2010; H. Y. Kim et al., 2016). Biz de çalışmamız öncesinde inkübe edilmiş olan A β 1-42 ile inkübe edilmemiş olan A β 1-42'yi büyüklükçe ayırma kromatografisi ile kıyasladık ve oligomerizasyon lehine bulgular elde ettik. Kromatografi sonuçlarında inkübe edilmiş olan A β 1-42'de, inkübe edilmemiş olan A β 1-42'den farklı bir pik görülmekteydi.

Uygulamanın koordinatlarının doğruluğu ve uygulanacak ajanın oligomerizasyonu teyit edildikten sonra uygulama yapıldı. Uygulama sonrasında da modelin oluşumuyla ilgili teyit aşamaları kullanıldı. Çalışmamızda A β 1-42 uygulanmış olan bir ön çalışma hayvanının beyin dokusu, sakrifikasyon sonrasında histokimyasal olarak kongo red boyası ile incelendi. Kongo red boyası, amiloid birikimi varlığında polarize ışık mikroskobu altında çift kırıcılı yeşil refle veren bir özelliğe sahiptir (Picken, 2020). Bu bulgunun amiloid varlığının önemli bir kanıtı olup hayvan modelinde saptanması Alzheimer benzeri hastalık oluştuğunun önemli bir belirticidir (Bruggink et al., 2012; Götz, Bodea, & Goedert, 2018). Çalışmamızda A β 1-42 uygulanmış olan ön çalışma hayvanında kongo red boyaması sonucunda, polarize ışık altında sarı-yeşil renkli refle alındı ve amiloid depozisyonu gözlemlendi.

Metilen mavisi ile koordinatın doğruluğunun tespiti, kromatografide A β 1-42 oligomerizasyonu lehine bulgu saptanması ve kongo red boyaması sonucunda polarize ışık mikroskobunda sarı-yeşil refle alınması, modelin doğruluğunu kanıtlar nitelikte bulgularıdır.

Bununla birlikte çalışmamızda hem modelimizin çalıştığını göstermek hem de taurinin A β 1-42 ile oluşturulmuş olan Alzheimer benzeri hastalık modelinde etkinliğini değerlendirmek amacıyla Morris Su Tankı testi yapıldı.

Morris Su Tankı testi uzaysal öğrenme ve bellek fonksiyonlarını değerlendiren, A β 1-42 ile oluşturulmuş Alzheimer benzeri hastalık modellerinde sıklıkla kullanılan değerli bir testtir (Bromley-Brits, Deng, & Song, 2011; Dong, Ji, Han, & Han, 2019; Othman, Hassan, & Che Has, 2022). A β 1-42 uygulamasının oluşturduğu nörotoksisite sonucunda öğrenme ve bellekte bozulmaya yol açarak MST testi verilerinde değişikliklere neden olduğu; A β 1-42 uygulaması ile sıçanların platformu bulana kadar geçirdikleri süre olan kaçış latansı sürelerinin uzadığı ve hedef kadranda geçirilen süre olan probe test sürelerinin kısaldığı görülmüştür (Kasza et al., 2017; Min et al., 2017; Shekarian et al., 2020).

Çalışmamızda 14.-18. günler arasında yapılan ilk MST testinde ilk 4 gün boyunca kaçış latansı süreleri arasında A β 1-42 uygulanmış olan model grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılığa rastlanmazken, 5.günde yapılan probe testte A β 1-42 uygulanmış olan model grubunun hedef kadranda geçirdiği süre kontrol grubuna göre daha kısa bulundu. 24.-28.günler arasında yapılan ikinci MST testinde A β 1-42 uygulanmış olan model grubunun 3. ve 4. günlerdeki kaçış latans süreleri kontrol grubuna göre daha uzun bulunurken, 5.gündeki probe test süresi ise daha kısa bulundu. Bu bulgular model grubumuzda A β 1-42 uygulamasının literatürle uyumlu şekilde öğrenme ve belleği bozduğunu göstermektedir. Ayrıca 28.-32.günler arası yapılan MST testinde A β 1-42 uygulama grubunun 2. ile 4.günlerinin kaçış latansı süreleri arasında anlamlı farklılık saptanmazken, diğer grupların kaçış latansı sürelerinin 4. günde, 2. güne oranla anlamlı olarak daha düşük bulunması; A β 1-42 uygulamasının öğrenme ve belleği önemli ölçüde bozduğuna işaret etmektedir.

28.-32. günler arasında yapılan MST testinde A β 1-42 uygulanan grupta 3. ve 4.günlerde kaçış latans sürelerinde bozulma olurken, 14.-18.günler arasında yapılan MST testinde herhangi bir günde grupların kaçış latans süreleri arasında farklılık saptanmaması; A β 1-42'inin öğrenme ve bellek üzerindeki olumsuz etkisinin zaman geçtikçe daha da belirginleştiğine işaret etmektedir. Literatürde isv A β 1-42 uygulaması sonrasında ikinci haftada kaçış latansının bozulduğunu gösteren çalışmalar olmakla birlikte, haftalar ilerledikçe kaçış latansı süresinin uzadığı gözlenen çalışmalar da mevcuttur (Prakash, Medhi, & Chopra, 2013; S. Sharma, Saini, & Nehru, 2021). Çalışmada kullanılan MST testi

protokollerindeki farklılıklar, uygulananan A β 1-42 dozaj farklılıkları, hayvan ağırlık farklılıkları gibi birçok neden bu konudaki farklılıkları açıklayabilir. Ayrıca literatürde iki farklı zamanda MST testinin yapıldığı çalışma sayısı sınırlıdır. Çalışmamız bu noktada kısıtlı olan literatüre katkıda bulunmaktadır.

Taurinin; uygulamış olduğumuz Alzheimer hastalık modelinde öğrenme ve bellek bozulmasına olan etkileri de MST testi ile değerlendirildi. 14.-18. günler arasında yapılan birinci MST test süreci probe test süresi A β 1-42 uygulama grubunda, kontrol grubuna göre düşük bulunurken; 250 mg/kg/gün dozda taurin verilen isv A β 1-42 uygulanmış grupta, taurinin probe test süresini kontrol grubunun değerlerine yaklaştırdığı görüldü. Taurin uygulanan A β 1-42 grubunun probe test süresi, A β 1-42 uygulama grubuna göre daha uzundu ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu veriler ışığında taurinin, A β 1-42 uygulamasının neden olduğu öğrenme ve bellek bozukluğunu hafiflettiğini ancak bu etkinin kısmi olduğunu düşünmekteyiz. 28.-32. günler arasında yapılan MST testi 3. ve 4. gün kaçış latans sürelerinin, A β 1-42 uygulama grubunda, kontrol grubuna göre daha uzunken; taurin uygulanmış olan A β 1-42 grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı farklılığının olmaması da bu fikrimizi desteklemektedir. A β 1-42 uygulama grubunun 2. ile 4.günlerinin kaçış latansı süreleri arasında anlamlı farklılık saptanmazken, taurin uygulanmış olan A β 1-42 grubunun kaçış latansı sürelerinin 4. günde, 2. güne oranla anlamlı olarak daha kısa bulunması da bu görüşümüze katkıda bulunmaktadır. 28.-32. günler arasında yapılan probe test sonuçlarını değerlendirdiğimizde hem A β 1-42 uygulama grubu hem de taurin uygulanmış olan A β 1-42 grubunun probe test süreleri, kontrol grubuna göre daha kısaydı, A β 1-42 uygulama grubunun probe test süresi, taurin uygulanmış olan A β 1-42 grubundan daha kısa olsa da bu sonuç anlamlı değildi. Hedef kadranda geçirilen süre yüzdelere bakıldığında A β 1-42 uygulama grubunun probe test süresi %25'in altındayken, taurin uygulanmış olan A β 1-42 grubunun probe test süresi %25 üstündeydi. Bu sonuçlar da A β 1-42 ile oluşturulmuş Alzheimer benzeri hastalık modelinde meydana gelen öğrenme ve bellek bozukluğunu taurinin kısmen de olsa engellediğini göstermektedir.

Intraserebroventriküler olarak streptozosin (STZ) uygulanan bir çalışmada; taurin uygulamasının STZ aracılı öğrenme ve bellek bozukluğunu azalttığı, kaçış latans sürelerini kısaltırken, probe test süresini uzattığı görülmüştür (Reeta, Singh, & Gupta, 2017). Daha önce merkezimizde yapılan, 1000 mg/kg/gün taurinin içme suyuna karıştırılarak profilaksi amacıyla verildiği bir çalışmada da taurinin; öğrenme ve bellek bozukluğunu hafiflettiği

gösterilmiştir (Aslan Karakelle et al., 2021). A β 1-42'nin isv olarak uygulanmış olduğu farklı bir çalışmada 10 gün boyunca içme suyu içerisinde 250 mg/kg/gün taurin verilmiş olup, uzaysal çalışma belleğini değerlendiren Y-maze testi ve korku aracılı hipokampal bellek oluşumunu değerlendiren pasif kaçınma testi ile bellek değerlendirmesi yapılmıştır. Taurinin, öğrenme ve bellek fonksiyon bozukluğunu düzelttiği gözlenmiştir (Jang et al., 2017). İntraperitoneal olarak 14 gün boyunca hem profilaktik hem de tedavi olarak ayrı ayrı uygulanan 25, 50 ve 100 mg/kg/gün dozlarındaki taurinin, skopolamin ile oluşturulmuş olan pasif kaçınma testinde meydana gelen bozulmayı düzelttiği gözlenmiştir (Gorgani, Jahanshahi, & Elyasi, 2019). Taurinin transgenik Alzheimer hastalık modelinde (H. Y. Kim et al., 2014) ve farklı nörotoksisite modellerinde (Guan et al., 2017; Wenting, Ping, Haitao, Meng, & Xiaofei, 2014) öğrenme ve bellek üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir. Çalışmamızda taurinin etkisinin literatürde yer alan verilere benzer nitelikte olduğunu gözlemledik.

Çalışmamızda kontrol, taurin ve taurin uygulanmış olan A β 1-42 gruplarında deney süreci boyunca anlamlı şekilde kilo alımı görülürken, A β 1-42 grubunda kilo alımında anlamlılık gözlenmemesi (p: 0,052), isv A β 1-42 uygulamasının kilo alımını bozabileceğini ve taurin uygulamasının bu bozulmayı engelleyebileceğini düşündürmüştür. Bununla birlikte p değerinin (p: 0,052) anlamlılığa yakın olması nedeniyle isv A β 1-42 uygulamasının kilo alımını bozmaktan çok, yavaşlattığını söyleyebiliriz. İhp A β uygulamasının enerji alımı üzerine olan etkilerinin incelendiği bir çalışmada, uygulama sonrasında sıçanlarda metabolik bozulmanın görüldüğü, enerji alımının %20 azaldığı, enerji harcanmasının %8-10 arttığı ve kilo kaybı olduğu gösterilmiştir (James, Kang, & Park, 2014). Transgenik Alzheimer fare modelinde de aynı yaş kontrol grubuna kıyasla ağırlık düşüklüğü saptanmıştır (Knopp, Baumann, Wilson, Banks, & Erickson, 2022). Bu veriler çalışmamızdaki bulgularla örtüşmektedir. Taurin ve vücut ağırlığı ilişkisinin incelendiği çalışmalarda genellikle taurinin obezite karşıtı etkilerinin olup, metabolik dengeyi sağladığı yönünde veriler elde edilmiştir (Bae, Ahmed, & Yim, 2022; K. S. Kim et al., 2019). Ayrıca taurinin büyümeyi de olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (Han et al., 2020). Ancak bizim çalışmamızda başlangıçta metabolik bir bozukluk olmamakla birlikte isv A β 1-42 uygulaması kilo alımını yavaşlatmış olabilir (James et al., 2014), taurin ise (Han et al., 2020) kilo alımının kontrol grubu ile benzer şekilde olmasını sağlamış olabilir.

Alzheimer hastalık patogenezinde sinaptik kayıp, nöral hücre ölümü ve apoptoz önemli yer tutmaktadır (Baliou et al., 2021). A β 1-42 uygulamasının da nörotoksositeye neden olarak apoptotik süreci tetiklemesi beklenmektedir (Bhat et al., 2020; H. Wu et al., 2005). bax ve bcl-2 gibi proteinler mitokondriyal geçirgenliği düzenleyen önemli proteinler olup, sitokrom C salınmasını kontrol etmektedir; bu yolakla apoptotik sürecin aktivasyonu durumunda efektör kaspazlardan olan kaspaz-3 ün ve diğer efektör kaspazların aktivasyonu ile hücre apoptoza gitmektedir. bax ve bcl-2 intrinsik apoptotik yolağın, aktif kaspaz-3 ise hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptotik yolağın önemli komponentleridir (Elmore, 2007). Çalışmamızda intraserebroventriküler A β 1-42 uygulaması ile oluşturmuş olduğumuz Alzheimer benzeri hastalık modelinde; A β 1-42 uygulamasının yol açacağı nörotoksosite ve ilişkili mekanizmalar sonucunda apoptotik sürecin gelişeceği, buna bağlı olarak apoptotik olan bax ve aktif kaspaz-3'ün miktarının artarken, antiapoptotik olan bcl-2 protein miktarının azalacağı ve taurinin bu sürece karşı koruma sağlayacağı hipotezini kurmuştuk.

Sonuçlarımız değerlendirildiğinde apoptotik bax ve aktif kaspaz-3 (cleaved caspase-3) proteinleri A β 1-42 uygulama grubunda, kontrol grubuna göre yüksek olarak bulunurken antiapoptotik bcl-2 proteini ise A β 1-42 uygulama grubunda, kontrol grubuna göre daha düşük olarak bulundu. Bax/bcl-2 oranı da apoptotik sürecin değerlendirilmesinde önemli olan ve yüksekliği apoptotik süreç lehine olan bir belirteçtir. Çalışmamızda A β 1-42 uygulama grubu bax/bcl-2 oranı, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi. A β 1-42 uygulaması, apoptotik protein olan bax'ı arttırmakta, antiapoptotik protein olan bcl-2'yi ise azaltmaktadır. Bax/bcl-2 oranının artışı, mitokondriyal geçirgenliğin artmasına ve sitokrom C salınmasına neden olduğu, sitokrom C'nin ise apoptotik kaskadı devam ettirerek efektör kaspazları uyardığı gösterilmiştir (Elmore, 2007). Kaspaz-3 aktiflendiğinde bunun parçalanmış hali olan aktif kaspaz-3'de artış meydana gelmektedir. Çalışmamızda aktif kaspaz-3 artmış olarak bulunmuştur. Sonuç olarak A β 1-42 uygulaması apoptotik süreci uyarmıştır. A β 1-42 aracılı Alzheimer benzeri hastalık modeli oluşturulmuş olan sıçanlarda yapılan bir çalışmada da A β 1-42 uygulamasının bax ve aktif kaspaz-3'ü arttırdığı ve bcl-2'yi azalttığı gösterilmiştir (Jia et al., 2016). İnsan nöron hücrelerinde yapılan hücre kültürü çalışmasında; bcl-2, bax nötralize edici antikolar ve kaspaz inhibitörlerinin A β 1-42 aracılı nöronal hücre ölümünü azalttığı gözlenmiş olup A β 'nın toksisitesine bağlı hücre ölüm yollarında bu mekanizmaların etkili olabileceği düşünülmüştür. (Zhang , McLaughlin , Goodyer , & LeBlanc 2002) Sıçanlara isv A β 1-42 uygulanan bir başka çalışmada antiapoptotik olan bcl-2 proteininde düşme görülürken, apoptotik etkileri bulunan bax,

kaspaz-3, -9 ve sitokrom C seviyelerinde artış olduğu gözlenmiştir (S. Sharma et al., 2021). Çalışmamızda A β 1-42'nin bax, bcl-2 ve kaspaz-3 gibi apoptotik süreç parametreleri üzerindeki etkileri literatürle uyumludur. A β 1-42 nörotoksitesi apoptoza yol açarak Alzheimer hastalık patogenezinde katkıda bulunmaktadır.

Taurin tedavisi uygulanan A β 1-42 grubunun bax ve aktif kaspaz-3 değeri ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık saptanmadı, taurin uygulanmış olan A β 1-42 grubu bax ve aktif kaspaz-3 değerleri, A β 1-42 uygulama grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü. Taurin tedavisi uygulanan A β 1-42 grubunun bcl-2 değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı farklılık yokken, A β 1-42 grubuna göre anlamlı olarak yüksekti. Taurin uygulamasının, A β 1-42 ile bozulan bax/bcl-2 oranını normale çevirdiğini gözlemledik. Farklı çalışmalar değerlendirildiğinde, taurin uygulamasının, alüminyum toksisitesi aracılığıyla rat hipokampusunda meydana gelen apoptozu azalttığı, bax proteini ve aktif kaspaz-3 oranını azalttığı, bcl-2 protein seviyelerini ise arttırdığı gösterilmiştir. (Y. Zhang, Guo, Ding, Wang, & Liu, 2023). İsofloran aracılığıyla endoplazmik retikulum stresi oluşturulup, apoptoz ve kognitif bozuklukların değerlendirildiği bir çalışmada; taurinin bax/bcl-2 oranını düşürdüğü ve sitokrom C ile aktif kaspaz-3 proteinini azalttığı görülmüştür (Y. Zhang, Li, Li, Hou, & Hou, 2016). Yine farklı bir toksisite çalışmasında arsenik uygulamasının hipokampüste yapmış olduğu nörotoksite sonucu oluşan apoptozisin taurin uygulaması ile gerilediği, taurinin; bax, kaspaz-3 ve sitokrom C'yi azaltırken, bcl-2'yi arttırdığı gösterilmiştir (S. Li, L. Yang, et al., 2017). Kronik depresyon rat modeli ve nöronal kök hücre kültürü yapılan bir çalışmada, taurinin hem kronik depresyon modeli hem de hücre kültüründe apoptozu engellediği gösterilmiştir (G. Wu et al., 2022). LPS tarafından tetiklenen kronik nöroinflamasyon varlığında taurinin, sıçan serebellumunda aktif kaspaz-3'ü düşürücü etki gösterdiği görülmüştür (Silva et al., 2021). PC-12 hücre kültüründe yapılan bir çalışmada da taurinin bax, kaspaz-3 ve sitokrom C yi azaltıp, bcl-2'yi arttırarak apoptotik süreci tersine çevirdiği gözlenmiştir (S. Li, H. Guan, et al., 2017). Literatürde gördüğümüz kadarıyla çalışmamız, isv A β 1-42 uygulanmış olan Alzheimer benzeri hastalık modelinde, taurinin apoptotik süreçlere olan etkisini değerlendiren ilk çalışmadır. Çalışmamızda taurin uygulaması Alzheimer hastalık patogenezinde yer alan apoptotik süreç üzerine olumlu etkiler göstermiştir. Bu durum literatürde yer alan taurinin antiapoptotik etkilerinin görüldüğü diğer nörotoksiste çalışmalarıyla benzerlik taşımaktadır. Çalışmamızda taurinin, intrinsik apoptotik yolak komponentleri olan bax ve bcl-2 ile hem intrinsik hem de ekstrinsik

apoptotik yolak komponenti olan aktif kaspaz-3 değerlerindeki değişimleri olumlu yönde etkileyerek koruyucu etki gösterdiğini düşünmekteyiz.

Alzheimer hastalığında miR-34a değişiklikleri gösterilmiştir (Reddy et al., 2017; Swarbrick et al., 2019). Aβ 1-42'nin de miR-34a'yı uyardığı gözlenmiştir (Russell et al., 2016). miR-34a, antiapoptotik bcl-2 proteinini hedef aldığı gösterilmiş olan ve apoptotik süreçlerle ilişkisi bulunan bir mikroRNA'dır (X. Wang et al., 2009). Taurin uygulamasının ise hem bcl-2'yi artırdığı (Jeong et al., 2009; Leon et al., 2009) hem de miR-34a'yı azalttığı (Cheleschi et al., 2017) farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Çalışmamızdaki sonuçların da desteklediği üzere Alzheimer hastalık patogeneğinde apoptoz rol oynamaktadır, bax protein artışı, bcl-2 azalması ve aktif kaspaz-3 artışı gözlenmektedir. Biz Aβ 1-42 uygulaması sonucunda gelişen apoptotik süreçte gözlenen beyin bcl-2 seviyelerindeki azalmanın miR-34a ile ilişkili olabileceği ve taurinin bu süreci tersine çevirebileceği hipotezini kurmuştuk.

Çalışmamızda hem plazma hem de beyin dokusunda miR-34a ölçümünü qPCR ile yaptık. Gruplar arası karşılaştırmada hem plazma hem de beyin dokusunda miR-34a seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Ancak Aβ 1-42 uygulama gruplarının plazma miR-34a seviyeleri, kontrol grubu ile kıyaslandığında belirgin olarak daha düşüktü. Bu durumun Kruskal Wallis testinin, analiz ettiği tüm grupların verilerini kullanmasından kaynaklandığını düşünüyoruz. Çünkü bizim sadece taurin uyguladığımız grubun standart sapma ve hatasının yüksek olması, analiz sonuçlarının p değerinin büyümesine neden olmuştur. Bu nedenle gruplar arasındaki farkı değerlendirmek için Mann Whitney U ikili karşılaştırma testi uyguladık. Amiloid beta 1-42 ve taurin verilen amiloid beta 1-42 gruplarında plazma miR-34a'nın kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğunu saptadık. Ayrıca yaptığımız korelasyon analizinde plazma miR-34a ile beyin bcl-2 proteini arasında pozitif korelasyon olduğunu da gördük. Bu noktada biyolojik ve bağımsız değişkenli verilerin kıyaslanmasında farklı istatistiksel metodlara ihtiyaç duyulduğunu düşünmekteyiz.

Alzheimer hastalarının plazma ve BOS'larının değerlendirildiği bazı çalışmalar da miR-34a seviyeleri, kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuş olup, bu durumun Alzheimer hastalığı bulunan kişilerin beyinlerinde miR-34a'nın klirens ve sekresyon mekanizmalarında bozulma meydana gelip, birikmesi nedeniyle beyinden, BOS ile plazmaya daha az miR-34a salınmasından kaynaklanıyor olabileceği öne sürülmüştür (Cosín-Tomás et al., 2017; Kiko

et al., 2014). Serum miR-34a da Alzheimer hastalarında anlamlı olarak düşük bulunmuş olup (Abuelezz, Nasr, Abdel Aal, Molokhia, & Zaky, 2022), yürütücü zihinsel fonksiyon bozukluğuyla ve kortikal incelik ile ters orantılı olduğu görülmüştür (Maldonado-Lasuncion, Atienza, Sanchez-Espinosa, & Cantero, 2018). Kan mononükleer hücrelerinde yapılan miRNA analizinde ise yukarıdaki bulguların tersi olarak; miR-34a, Alzheimer hastalarında yüksek bulunmuştur (Schipper, Maes, Chertkow, & Wang, 2007). Plazma ile farklı numuneler olmakla birlikte BOS eksozomunda bakılan miRNA profil analizine göre miR-34a ile Alzheimer hastalığı arasında bir ilişki bulunmadığı ifade edilmiştir (Chua & Tang, 2019; Gui, Liu, Zhang, Lv, & Hu, 2015). Özetlendiğinde Alzheimer hastalığında plazma ve serum miR-34a değerleri nadiren farklı sonuçlar olmakla birlikte genellikle düşük bulunmaktadır.

Biz de çalışmamızda A β 1-42 uygulanan gruplarda, plazma miR-34a seviyelerinde düşüş saptadık. Bunun nedeni yukarıdaki çalışmalarda da bahsedildiği gibi Alzheimer benzeri hastalık modelimizde de miR-34a klirensinin bozulması ve beyinde birikimi olabilir. Çalışmamızda plazma miR-34a ile beyin bcl-2 arasındaki pozitif korelasyon da bunu desteklemektedir. A β 1-42'ye bağlı olarak oluşan nörotoksisite sonucunda beyinde biriken miR-34a ya bağlı olarak apoptotik süreç tetiklenip bcl-2 inhibe oluyor ve miR-34a'nın klirensinin bozulmasıyla da plazmaya geçen miR-34a miktarı azalıyor olabilir.

Plazma miR-34a değerleri açısından A β 1-42 uygulama grubu ile taurin uygulanmış olan A β 1-42 grubu arasında farklılık olmaması ise taurinin A β 1-42'nin neden olduğu plazma miR-34a düşüşünü engelleyemediğini göstermektedir.

Beyin dokusu miR-34a seviyelerinde ise gruplar arası farklılık saptamadık. Bu noktada literatür değerlendirildiğinde farklı bulgulara rastlanılmıştır. SH-SY5Y hücrelerine A β 1-42 uygulaması sonrası miR-34a artışı gözleendiği (Chanda, Jana, & Mukhopadhyay, 2021), 3xTg-AD transgenik Alzheimer benzeri hastalık modelinde fare hipokampusünde miR-34a artışının bulunduğu (Y. L. Zhang et al., 2016), Alzheimer hastalığında temporal kortekste miR-34a artışının gösterildiği (Sarkar et al., 2016) yayınların yanı sıra, SH-SY5Y hücrelerine A β 1-40 uygulaması sonucunda miR-34a seviyelerinin ilk 6 saatte yükselmekle birlikte, 24. ve 48. saatlerde azaldığının gözleendiği (Q. Li, Liu, Yang, & Zhang, 2019), kortikal nöron kültürüne uygulanan A β 1-42'nin yine zamana bağlı olarak 48.saatte miR-34a'yı azalttığı ve yine aynı çalışmada transgenik Alzheimer benzeri hastalık modelinde

kortekste miR-34a'nın zamana bağılı değişiklik göstererek 6.aya kadar artış gösterip 6. aydan sonra kontrol grubuna göre azalma gösterdiği (Modi, Jaiswal, & Sharma, 2016) çalışmalar da bulunmaktadır. Ayrıca Alzheimer hastalarının hipokampusunda (Müller, Kuiperij, Claassen, Küsters, & Verbeek, 2014) ve frontal korteksinde (Sarkar et al., 2016) miR-34a seviyelerinde değişimin olmadığı da bildirilmiştir.

Çalışmamızda Aβ 1-42 uygulaması ile total beyin dokusunda miR-34a da değişiklik gözlenmemiş olması, bize bu durumun zamana da bağılı olarak miR-34a'nın beynin bazı bölgelerinde artarken, bazı bölgelerinde azalmasıyla ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Alzheimer hastalığı dinamik bir süreci içermektedir. Braak sınıflandırılmasında da (Braak & Braak, 1991) belirtildiği üzere Alzheimer patolojisi zaman içerisinde beyinde yayılım göstermektedir. Bu durumda hastalığın erken evrelerinde bazı nöronların ölümü gerçekleşmişken, bazı nöronlar sağlıklı durumdadır, patogeneze yer alan birçok mekanizma beynin bir bölgesinde başlarken belki de beynin diğer bölgelerinde sona ermektedir. Bu dinamik süreç içerisinde farklı mekanizmaların değerlendirilmesinde sürecin zamanlamasına da dikkat etmek gerekmektedir. Plazma ve apoptotik süreç bulgularımızla birlikte değerlendirildiğinde miR-34a'nın beynin patogenezin sirayet etmediği bölgelerinden, patogenezin başlamış olduğu bölgelere şift yapıyor olması öne sürülebilir. Bu nedenle plazmaya geçen miR-34a'nın miktarının azalmasıyla birlikte, total beyindeki miR-34a ekspresyon seviyeleri değişmemiş olabilir. Bu noktada yapılacak olan ileri lokalizasyon çalışmaları miR-34a ile ilgili olan yorumlara yön verebilir.

Taurin ile miR-34a ilişkisini inceleyen çalışmalara bakıldığında bu konuda literatürde çok az yayın olduğunu saptadık. Cheleschi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2017) H₂O₂ uygulaması sonucunda hücre kültüründe miR-34a gen ekspresyonu artmış olup, taurinin bu artışı engellediği gözlenmiştir. Bu çalışmada H₂O₂ ile uyarılmış olan apoptozun da taurin tedavisi ile azaldığı görülmüştür. (Cheleschi et al., 2017). Bu çalışma haricinde literatürde taurinin miR-34a üzerine olan etkisinin değerlendirildiği dikkatimizi çeken başka bir çalışma bulunmamaktadır. miR-34a, apoptoz gibi Alzheimer hastalık patogenezinde de yer alabilen birçok farklı süreçle ilişki halindedir. Çalışmamızda miR-34a ve apoptotik süreçle ilişkili olarak; Aβ 1-42 aracılı nörotoksisitenin beyinde miR-34a birikimine neden olmuş olabileceği, bunun beyin bcl-2'de ve plazmaya salınan miR-34a'da azalmaya yol açabileceği değerlendirmesi yapılmıştır. Taurinin, apoptotik süreçlerle olan ilişkisini göstermekle birlikte, miR-34a seviyelerini etkilemediğini gözlemledik. **Çalışmamız deney**

hayvanlarında yapılan taurin ve miR-34a ilişkisini değerlendiren ilk çalışmadır. Bu noktada taurinin, miR-34a ve ilişkili yollar üzerine olan etkinliğinin farklı çalışmalar ve modellerle de değerlendirilmesi gerekliliğini vurgulamak isteriz.

Çalışmamızda nörotoksisite ile ilişkili olan oksidatif stres parametrelerinin de değerlendirmesini yaptık. Değerlendirmemizde Aβ 1-42 uygulamasının serum oksidatif stres indeksini (OSI) arttırdığını, taurinin ise OSI'yı azalttığını gözlemledik, ancak bu bulgularımız istatistiksel olarak anlamlı değildi. Serum total oksidan seviye (TOS) değerinin Aβ 1-42 uygulaması sonucunda arttığını gözlemledik. Aβ 1-42 uygulamasının Beyin OSI değerini ve beyin TOS seviyelerini de arttırdığı gözlemlendi ancak bu artışlar da istatistiksel olarak anlamlı değildi. Literatürde ise Aβ 1-42 uygulamasının total oksidan seviyeyi (TOS) arttırırken, total antioksidan seviyeyi (TAS) azalttığına yönelik çalışmalar mevcuttur (Arabi, Karimi, Salehi, Haddadi, & Komaki, 2023; Asadbegi et al., 2023). Alzheimer hastalarında yapılan bir çalışmada serumda TOS ve OSI değerlerinin kontrole göre yüksek olduğu ve TAS seviyelerinin kontrole göre düşük olduğu gözlenmiştir (Yildiz et al., 2021). Bununla birlikte Alzheimer benzeri hastalık modelinde OSI indeksinin değişmediği çalışmalar da mevcuttur (Çakmak et al., 2022). Taurinin antioksidan özellikleri mevcut olup (Jong et al., 2012; Schaffer & Kim, 2018), TAS'ı arttırdığı gösterilmiştir (Moludi, Qaisar, Kadhim, Ahmadi, & Davari, 2022). Çalışmamızda TAS, TOS ve OSI testleri sonucunda, Aβ 1-42'nin oksidan stresi arttırdığına yönelik literatürle uyumlu bazı bulgularımız olmakla birlikte, taurinin bu parametreler üzerine olumlu etkisi sınırlıydı.

Ek olarak ise Aβ 1-42 uygulaması sonucunda serum oksidatif stres parametrelerinde meydana gelen artış ve yaptığımız analizde Beyin OSI ile Serum OSI arasında korelasyon görmemiz, ise Aβ 1-42'nin etkilerinin beyin dışına da yayılıyor olabileceğine işaret etmektedir.

Çalışmamızda ayrıca oksidatif stresi değerlendirmeye yönelik serum ve beyin MDA ile GSH değerlerini de araştırdık. Aβ 1-42 uygulanmış olan grubun beyin dokusunda MDA seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekken, taurin tedavisi verilen Aβ 1-42 grubunda bu artış görülmedi. Taurin, Aβ 1-42 uygulanmış olan sıçanlarda beyinde MDA'yı azalttı ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Aβ 1-42 uygulanmış olan her iki grubun (model ve taurin tedavi grubu) beyin glutatyon (GSH) seviyeleri kontrol grubuna göre hafif düşük

bulundu, bulgumuz istatistiksel olarak anlamlı değildi. Serum MDA ve GSH değerlerinde ise anlamlı farklılığa rastlanmadı.

Yapılan bir hücre kültürü çalışmasında A β 1-42 uygulamasının MDA seviyelerinde artışa ve GSH'da azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (Hui et al., 2018). Farklı hayvan çalışmalarında da A β 1-42 uygulamasının beyin dokusunda MDA'yı arttırdığı (Aslan Karakelle et al., 2021; Cetin et al., 2013) ve GSH'ı azalttığı gösterilmiştir (Jiang et al., 2021). Bununla birlikte GSH'ın A β 1-42 uygulanmış olan yaşlı ratlarda arttığının da gösterilmiş olduğu bazı çalışmalar mevcuttur. Taurinin MDA ve GSH üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde ise, oksidan durum varlığında MDA seviyelerini azalttığı (Cetin, Dinçer, Ay, & Guney, 2012; Dinçer, Babül, Erdoğan, Ozoğul, & Dinçer, 1996; Dinçer, Ozenirler, Oz, Akyol, & Ozoğul, 2002; Göktaş, Dinçer, Korkmaz, & Sönmez, 2008; C. Liu et al., 2022), GSH seviyeleri arttırdığı (Aydın et al., 2016) gözlenmiştir. Bununla birlikte taurinin, oksidatif hasarın olmadığı durumlarda MDA'yı arttırdığını (Ozan, Türközkan, Bircan, & Balabanlı, 2018), yani prooksidan olarak davranabildiğini gösteren yayınlar da vardır (Dinçer & Karakelle, 2019). Çalışmamızda da A β 1-42'nin neden olduğu MDA seviyeleri artışının taurin tedavisi uygulanmış olan A β 1-42 grubunda görülmemesi, literatüre de benzer şekilde taurinin hasar varlığında gösterdiği antioksidan özelliğinden kaynaklanıyor olabilir.

Son olarak da taurinin, Alzheimer hastalık patogenezinde yer alan inflamatuvar süreçlere olan etkisinin değerlendirilmesi amacıyla TNF- α , IL-1 β ve IL-10 gibi inflamasyonla ilişkili parametreler değerlendirildi. A β 1-42 uygulama grubunda TNF-a beyin dokusunda yüksek bulunmakla birlikte bu durum anlamlılığa yansımadı. Bunun yanı sıra beyin ve serum IL-1 β düzeylerinde de gruplar arasında anlamlı değişiklik gözlenmedi. Anti-inflamatuvar özellikte olan IL-10 ise taurin uygulanmış olan A β 1-42 grubunun beyin dokusunda, A β 1-42 grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Bununla birlikte taurin uygulanmış olan A β 1-42 grubunda serum IL-10, A β 1-42 grubundan yüksekti ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Literatür değerlendirmesinde isv A β 1-42 uygulaması sonucunda IL-10'un azaldığı ve TNF- α ve IL-1 β 'nin arttığı çalışmalar mevcuttur (Q. Wang et al., 2017; Xu et al., 2021). Hem inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar parametrelerin artışının birlikte olabileceğini belirten yayınlara da rastlanmaktadır (W. Y. Wang et al., 2015). Bununla birlikte serum ve BOS'ta inflamatuvar ve anti-inflamatuvar tüm parametrelerin azaldığı ve Alzheimer hastalığında immün yanıt azalmasının patogeneizde yer alıp almadığının

sorgulandığı (Richartz et al., 2005) çalışmalar da literatürde yer almaktadır. Alzheimer hastalarının beyin dokusunda IL-1 β 'nin değişmediğini; TNF- α seviyelerinin ise frontal, superior temporal girus ve entorinal korteks bölgelerinde azaldığını gösteren ve bu durumun bozulmuş immünregülasyonla ilişkili olabileceğini öne süren çalışmalar da (Lanzrein et al., 1998) mevcuttur. 3xTg-AD transgenik Alzheimer benzeri hastalık modelinde yapılan bir çalışmada farelerin korteks ve hipokampusünde 3. ayda TNF- α , IL-1 β değerleri kontrole göre azalmış olup, 9. ayda kortekste TNF- α seviyeleri hala düşük iken, IL-1 β seviyeleri normale dönmüştür, hipokampüste ise hem TNF- α hem de IL-1 β yüksek bulunmuştur (Fernandes et al., 2022). Literatürde Alzheimer hastalığının inflamatuvar özelliklerine daha fazla değinilse de görüldüğü üzere inflamatuvar süreç; hastalık şiddeti, süresi, mikrogliaların farklı formları gibi birçok faktöre bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Wei & Li, 2022). Çalışmamızda A β 1-42 uygulanmış olan Alzheimer hastalık model grubunda anlamlı olmamakla birlikte TNF- α 'da artışa rastlamamız, literatürde genel olarak bahsedilen Alzheimer hastalığındaki nöroinflamatuvar süreçle benzerlik göstermekteydi, ancak buradaki etkinin belirgin olmamasının mikroglial fenotiplerin hastalık boyunca farklılık göstermesiyle ilgili olabileceğini düşünmekteyiz. Anti-inflamatuvar etkinliği olan IL-10 seviyelerinin taurin uygulanmış A β 1-42 grubunda, A β 1-42 model grubuna göre daha yüksek bulunması, taurinin Alzheimer hastalık patogenezinde anti-inflamatuvar etkinlik gösterebileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda ayrıca bax, bcl-2 gibi apoptotik süreçte yer alan proteinler ile oksidatif süreç belirteci olan beyin total oksidan seviye ve anti-inflamatuvar sitokin olan IL-10 gibi parametreler arasında korelasyon olduğunu tespit etmiş olmamız; Alzheimer hastalık patogenezinde bu süreçlerin birbirleriyle olan sıkı ilişkisini ve birbirlerini karşılıklı olarak etkilediklerini göstermektedir.



6. SONUÇ, KISITLILIKLAR VE ÖNERİLER

6.1. Sonuç

Alzheimer hastalığı ortalama yaşam süresinin artmasıyla sıklığı artan ve multifaktöryel etyopatogeneze sahip olan önemli bir sağlık problemidir. Hastalığın patogenezinin anlaşılmasına yönelik çalışmalar devam etmekle birlikte erken tanı yöntemleri geliştirilmesi ve tedavi edici olabilecek yeni etken maddelerin araştırılması konusunda da çalışmalar sürmektedir. Bu tez çalışmasında wistar albino sıçanlarda, isv A β 1-42 uygulaması ile oluşturulmuş Alzheimer benzeri hastalık modelinde; 32 gün süreyle, 250 mg/kg/gün dozda taurin tedavisinin bilişsel fonksiyonlar ile oksidatif, inflamatuvar, apoptotik süreçler ve apoptotik süreçlerle ilişkisi olabileceği düşünülen ve erken tanı konusunda bir belirteç olabileceği konusunda araştırmalar sürmekte olan miR-34a üzerindeki etkilerini değerlendirdik. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar şunlardır;

- i. Çalışmamızın başlangıcında isv uygulanan metilen mavisinin doğru koordinatlara enjekte edildiğinin gösterilmesi; isv uygulamadan önce, inkübe edilmiş A β 1-42'nin oligomerize olduğu lehine bulgular elde edilmesi; ön çalışma hayvanının beyin dokusunda amiloid beta 1-42 varlığının kongo red boyası ile gösterilebilmesi, Alzheimer benzeri hastalık modelinin başarılı bir şekilde oluştuğunu düşündürmektedir.
- ii. MST testinde, isv A β 1-42 verilmiş grupta kaçış latans sürelerinin uzaması ve hedef kadranda geçirilen sürelerin (probe test) kısalması, A β 1-42 uygulamasının öğrenme ve belleği bozduğunu göstermektedir. Taurin uygulanan A β 1-42 grubunda ise kaçış latanslarında uzama görülmemiş ve birinci MST testi probe test sürelerinde kısalma olmamıştır. Bulgularımız A β 1-42'nin neden olduğu öğrenme ve bellek bozukluğunun taurin tarafından engellenebileceğini göstermektedir.
- iii. İsv olarak uygulamış olduğumuz A β 1-42'nin bax, aktif kaspaz-3 gibi proapoptik proteinleri arttırdığı ve antiapoptotik nitelikte olan bcl-2'yi azalttığı görülmüştür. Bu sonuçlar isv A β 1-42 uygulamasının, apoptoza yol açtığını göstermektedir. Literatürde gördüğümüz kadarıyla çalışmamız, isv A β 1-42 uygulanmış olan Alzheimer benzeri hastalık modelinde, taurinin apoptotik süreçlere olan etkisini değerlendiren ilk çalışma

olup, taurin uygulanan A β 1-42 grubunda apoptotik bulguların düzelmesi, taurinin antiapoptotik etkinliğine işaret etmektedir.

- iv. A β 1-42 uygulaması ile plazma miR-34a seviyelerinde düşüş görülmüştür, beyin miR-34a seviyeleri ise değişmemiştir. Bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç olmakla birlikte isv A β 1-42'nin uygulandığı bölgeye hasar verdiği, bu hasara bağlı olarak miR-34a'nın hasarlı bölgelerde biriktiği ve plazmaya az salındığı öne sürülebilir. Beyin miR-34a seviyelerinin değişmemesi ise hastalık sürecinde patolojinin beynin farklı bölgelerinde zamana bağlı olarak geliştiği, total bir miR-34a artışından ziyade hasarlı bölgede artışın görülüp, miR-34a'nın bu bölgelerde artıp diğer bölgelerde azalmış olabileceği ile açıklanabilir. Ayrıca plazma miR-34a ile beyin bcl-2 arasında korelasyon bulunmuş olması da, literatürde yer alan miR-34a'nın bcl-2'yi hedeflediği verisiyle uyumaktadır. Alzheimer benzeri hastalık modelinde, taurin uygulamasının miR-34a seviyelerine etkisi gözlenmedi, araştırmamız bu konuda yapılan ilk çalışma olup, taurinin apoptotik süreçleri hangi mekanizmalarla etkilediği ve miR-34a'nın bu süreçteki etkisiyle ilgili yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.
- v. A β 1-42 uygulanan grupta serum total oksidan seviye (TOS) ve beyin malondialdehit (MDA) düzeyleri gibi oksidatif stres belirteçlerinin artması, A β 1-42'nin oksidatif strese yol açtığına işaret etmektedir. Bu durumun taurin uygulanmış olan A β 1-42 grubunda görülmemesi, taurinin hasar varlığında oluşturduğu antioksidan etkiye işaret etmektedir.
- vi. İsv A β 1-42'nin inflamatuvar belirteçler üzerine kuvvetli bir etkisi gözlenmemiştir. Bu durum Alzheimer hastalığında inflamatuvar süreçlerin hastalık boyunca değişiklik göstermesiyle açıklanabilir. Anti-inflamatuvar sitokin olan IL-10 (beyin) seviyesinin, taurin verilmiş A β 1-42 grubunda, A β 1-42 grubuna göre yüksek olduğu görülmüştür bu durum taurinin anti-inflamatuvar etkisini göstermektedir.

6.2. Kısıtlılıklar

- i. İsv A β 1-42 aracılığıyla oluşturulmuş olan Alzheimer benzeri hastalık modeli, literatürde sıkça kullanılan ve kaskad hipotezine uygun olan bir model olmakla birlikte, deney hayvan modellerinin hiçbirisi hastalığı tüm yönleriyle yansıtamamaktadır.

- ii. Çalışmamızda yalnızca miR-34a değerlendirilebilmiştir, diğer miRNA'ların, Alzheimer hastalık patogenezinde yer alan mekanizmalarla olan ilişkilerinin araştırılması Alzheimer hastalığının anlaşılması, yeni biyobelirteçlerin bulunabilmesi ve hastalığın tedavisi yolunda önemli gelişmelere yol açabilir.
- iii. Morris Su Tankı testinde video kayıt sistemi kullanılarak görüntüler alınmış olmakla birlikte verilerin değerlendirilmesinin otomatize takip sistemi ile yapılamamış olması çalışmamızın diğer bir kısıtlı yönüdür.

6.3. Öneriler

- i. Alzheimer hastalık etyopatogenezinin aydınlatılması amacıyla deneysel hayvan modeli çalışmalarına ve hastalıkla ilişkili yolların değerlendirildiği moleküler çalışmalara devam edilmelidir.
- ii. miRNA'lar, bir çok yolla ilişki halinde bulunmaktadır. miR-34a ve diğer miRNA'ların Alzheimer hastalık patogenezindeki yerinin araştırılmasına yönelik daha fazla ve detaylı çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.
- iii. miR-34a ile ilgili literatürde farklı bilgiler yer almaktadır. miR-34a'nın ileri lokalizasyon çalışmaları ve hastalığın evresine göre değerlendirilmesi bu sürecin aydınlatılmasına yardımcı olabilir.
- iv. Alzheimer hastalığının halen kesin bir tedavisi bulunmamaktadır, ileri araştırmalarla desteklenirse taurin profilaksi ya da destek tedavi protokollerinde yer alabilir.



KAYNAKLAR

- 2023 Alzheimer's disease facts and figures. (2023). *Alzheimers Dement*, 19(4), 1598-1695. doi:10.1002/alz.13016
- Abuelezz, N. Z., Nasr, F. E., Abdel Aal, W. M., Molokhia, T., & Zaky, A. (2022). Sera miR-34a, miR-29b and miR-181c as potential novel diagnostic biomarker panel for Alzheimers in the Egyptian population. *Exp Gerontol*, 169, 111961. doi:10.1016/j.exger.2022.111961
- Agarwal, M., Alam, M. R., Haider, M. K., Malik, M. Z., & Kim, D. K. (2020). Alzheimer's Disease: An Overview of Major Hypotheses and Therapeutic Options in Nanotechnology. *Nanomaterials (Basel)*, 11(1). doi:10.3390/nano11010059
- Alhajj, M., Zubair, M., & Farhana, A. (2023). Enzyme Linked Immunosorbent Assay. In *StatPearls*. Treasure Island (FL) StatPearls Publishing LLC.
- Alzheimer, A. (1907). Uber eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *All Z Psychiatr*, 64, 146-148.
- Amin, F. U., Shah, S. A., & Kim, M. O. (2017). Vanillic acid attenuates A β (1-42)-induced oxidative stress and cognitive impairment in mice. *Sci Rep*, 7, 40753. doi:10.1038/srep40753
- Arabi, A., Karimi, S. A., Salehi, I., Haddadi, R., & Komaki, A. (2023). Effects of sesamin on A β (1-42)-induced oxidative stress and LTP impairment in a rat model of Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis*, 38(5), 1503-1511. doi:10.1007/s11011-023-01191-w
- Armstrong, R. A. (2019). Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol*, 57(2), 87-105. doi:10.5114/fn.2019.85929
- Arnsten, A. F. T., Datta, D., Del Tredici, K., & Braak, H. (2021). Hypothesis: Tau pathology is an initiating factor in sporadic Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 17(1), 115-124. doi:10.1002/alz.12192
- Asadbegi, M., Komaki, H., Faraji, N., Taheri, M., Safari, S., Raoufi, S., . . . Komaki, A. (2023). Effectiveness of coenzyme Q10 on learning and memory and synaptic plasticity impairment in an aged A β -induced rat model of Alzheimer's disease: a behavioral, biochemical, and electrophysiological study. *Psychopharmacology (Berl)*, 240(4), 951-967. doi:10.1007/s00213-023-06338-2
- Aslan Karakelle, N., Dinçer, S., & Yar Sağlam, A. S. (2021). The effect of intracerebroventricular amyloid beta 1-42 application on cognitive functions in aged rats supplemented with taurine and the change of peroxisomal proteins in this process. *Brain Res Bull*, 172, 89-97. doi:10.1016/j.brainresbull.2021.04.011
- Aydın, A. F., Çoban, J., Doğan-Ekici, I., Betül-Kalaz, E., Doğru-Abbasoğlu, S., & Uysal, M. (2016). Carnosine and taurine treatments diminished brain oxidative stress and apoptosis in D-galactose aging model. *Metab Brain Dis*, 31(2), 337-345. doi:10.1007/s11011-015-9755-0

- Bachurin, S. O., Bovina, E. V., & Ustyugov, A. A. (2017). Drugs in Clinical Trials for Alzheimer's Disease: The Major Trends. *Med Res Rev*, 37(5), 1186-1225. doi:10.1002/med.21434
- Bae, M., Ahmed, K., & Yim, J. E. (2022). Beneficial Effects of Taurine on Metabolic Parameters in Animals and Humans. *J Obes Metab Syndr*, 31(2), 134-146. doi:10.7570/jomes21088
- Baliou, S., Adamaki, M., Ioannou, P., Pappa, A., Panayiotidis, M. I., Spandidos, D. A., . . . Zoumpourlis, V. (2021). Protective role of taurine against oxidative stress (Review). *Mol Med Rep*, 24(2). doi:10.3892/mmr.2021.12242
- Bazrgar, M., Khodabakhsh, P., Prudencio, M., Mohagheghi, F., & Ahmadiani, A. (2021). The role of microRNA-34 family in Alzheimer's disease: A potential molecular link between neurodegeneration and metabolic disorders. *Pharmacol Res*, 172, 105805. doi:10.1016/j.phrs.2021.105805
- Bhat, M. A., Ahmad, K., Khan, M. S. A., Bhat, M. A., Almatroudi, A., Rahman, S., & Jan, A. T. (2020). Expedition into Taurine Biology: Structural Insights and Therapeutic Perspective of Taurine in Neurodegenerative Diseases. *Biomolecules*, 10(6). doi:10.3390/biom10060863
- Blocq, P., & Marinescu, G. (1892). *Sur les lésions et la pathogénie de l'épilepsie dite essentielle*.
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82(4), 239-259. doi:10.1007/bf00308809
- Braak, H., & Del Tredici, K. (2013). Amyloid- β may be released from non-junctional varicosities of axons generated from abnormal tau-containing brainstem nuclei in sporadic Alzheimer's disease: a hypothesis. *Acta Neuropathol*, 126(2), 303-306. doi:10.1007/s00401-013-1153-2
- Braak, H., & Del Tredici, K. (2015). Neuroanatomy and pathology of sporadic Alzheimer's disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 215, 1-162.
- Bromley-Brits, K., Deng, Y., & Song, W. (2011). Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *J Vis Exp*(53). doi:10.3791/2920
- Bruggink, K. A., Müller, M., Kuiperij, H. B., & Verbeek, M. M. (2012). Methods for analysis of amyloid- β aggregates. *J Alzheimers Dis*, 28(4), 735-758. doi:10.3233/jad-2011-111421
- Burguillos, M. A., Deierborg, T., Kavanagh, E., Persson, A., Hajji, N., Garcia-Quintanilla, A., . . . Joseph, B. (2011). Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature*, 472(7343), 319-324. doi:10.1038/nature09788
- Butterfield, D. A. (2002). Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res*, 36(12), 1307-1313. doi:10.1080/1071576021000049890

- Butterfield, D. A. (2018). Perspectives on Oxidative Stress in Alzheimer's Disease and Predictions of Future Research Emphases. *J Alzheimers Dis*, 64(s1), S469-s479. doi:10.3233/jad-179912
- Cai, Z., Zhao, B., & Ratka, A. (2011). Oxidative stress and β -amyloid protein in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*, 13(4), 223-250. doi:10.1007/s12017-011-8155-9
- Callens, M., Kraskovskaya, N., Derevtsova, K., Annaert, W., Bultynck, G., Bezprozvanny, I., & Vervliet, T. (2021). The role of Bcl-2 proteins in modulating neuronal Ca(2+) signaling in health and in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1868(6), 118997. doi:10.1016/j.bbamcr.2021.118997
- Caspersen, C., Wang, N., Yao, J., Sosunov, A., Chen, X., Lustbader, J. W., . . . Yan, S. D. (2005). Mitochondrial A β : a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *Faseb j*, 19(14), 2040-2041. doi:10.1096/fj.05-3735fje
- Castro, R. E., Santos, M. M., Glória, P. M., Ribeiro, C. J., Ferreira, D. M., Xavier, J. M., . . . Rodrigues, C. M. (2010). Cell death targets and potential modulators in Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des*, 16(25), 2851-2864. doi:10.2174/138161210793176563
- Cervellati, C., Wood, P. L., Romani, A., Valacchi, G., Squerzanti, M., Sanz, J. M., . . . Zuliani, G. (2016). Oxidative challenge in Alzheimer's disease: state of knowledge and future needs. *J Investig Med*, 64(1), 21-32. doi:10.1136/jim-2015-000017
- Cetin, F., Dinçer, S., Ay, R., & Guney, S. (2012). Systemic taurine prevents brain from lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation in rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6(15). doi:10.5897/ajpp12.275
- Cetin, F., Yazihan, N., Dincer, S., & Akbulut, G. (2013). The effect of intracerebroventricular injection of beta amyloid peptide (1-42) on caspase-3 activity, lipid peroxidation, nitric oxide and NOS expression in young adult and aged rat brain. *Turk Neurosurg*, 23(2), 144-150. doi:10.5137/1019-5149.Jtn.5855-12.1
- Cha, M. Y., Han, S. H., Son, S. M., Hong, H. S., Choi, Y. J., Byun, J., & Mook-Jung, I. (2012). Mitochondria-specific accumulation of amyloid β induces mitochondrial dysfunction leading to apoptotic cell death. *PLoS One*, 7(4), e34929. doi:10.1371/journal.pone.0034929
- Chanda, K., Jana, N. R., & Mukhopadhyay, D. (2021). Receptor tyrosine kinase ROR1 ameliorates A β (1-42) induced cytoskeletal instability and is regulated by the miR146a-NEAT1 nexus in Alzheimer's disease. *Sci Rep*, 11(1), 19254. doi:10.1038/s41598-021-98882-0
- Che, Y., Hou, L., Sun, F., Zhang, C., Liu, X., Piao, F., . . . Wang, Q. (2018). Taurine protects dopaminergic neurons in a mouse Parkinson's disease model through inhibition of microglial M1 polarization. *Cell Death Dis*, 9(4), 435. doi:10.1038/s41419-018-0468-2

- Cheleschi, S., De Palma, A., Pascarelli, N. A., Giordano, N., Galeazzi, M., Tenti, S., & Fioravanti, A. (2017). Could Oxidative Stress Regulate the Expression of MicroRNA-146a and MicroRNA-34a in Human Osteoarthritic Chondrocyte Cultures? *Int J Mol Sci*, 18(12). doi:10.3390/ijms18122660
- Chen, Z., & Zhong, C. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull*, 30(2), 271-281. doi:10.1007/s12264-013-1423-y
- Chêne, G., Beiser, A., Au, R., Preis, S. R., Wolf, P. A., Dufouil, C., & Seshadri, S. (2015). Gender and incidence of dementia in the Framingham Heart Study from mid-adult life. *Alzheimers Dement*, 11(3), 310-320. doi:10.1016/j.jalz.2013.10.005
- Chi, H., Chang, H.-Y., & Sang, T.-K. (2018). Neuronal Cell Death Mechanisms in Major Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 3082. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/10/3082>
- Chua, C. E. L., & Tang, B. L. (2019). miR-34a in Neurophysiology and Neuropathology. *J Mol Neurosci*, 67(2), 235-246. doi:10.1007/s12031-018-1231-y
- Cline, E. N., Bicca, M. A., Viola, K. L., & Klein, W. L. (2018). The Amyloid- β Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. *J Alzheimers Dis*, 64(s1), S567-s610. doi:10.3233/jad-179941
- Cosín-Tomás, M., Antonell, A., Lladó, A., Alcolea, D., Fortea, J., Ezquerra, M., . . . Kaliman, P. (2017). Plasma miR-34a-5p and miR-545-3p as Early Biomarkers of Alzheimer's Disease: Potential and Limitations. *Mol Neurobiol*, 54(7), 5550-5562. doi:10.1007/s12035-016-0088-8
- Cotman, C. W., Poon, W. W., Rissman, R. A., & Blurton-Jones, M. (2005). The role of caspase cleavage of tau in Alzheimer disease neuropathology. *J Neuropathol Exp Neurol*, 64(2), 104-112. doi:10.1093/jnen/64.2.104
- Çakmak, G., Kaplan, D. S., Yıldırım, C., Ulus, H., Tarakçıoğlu, M., & Öztürk, Z. A. (2022). Improvement of cognitive deficit of curcumin on scopolamine-induced Alzheimer's disease models. *Caspian J Intern Med*, 13(1), 16-22. doi:10.22088/cjim.13.1.16
- Das, A. K. (2012). *Proteomics studies of neurotoxic amyloid β oligomers using size exclusion chromatography*.
- Davies, P., & Maloney, A. J. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*, 2(8000), 1403. doi:10.1016/s0140-6736(76)91936-x
- Dinçer, S., Babül, A., Erdoğan, D., Ozoğul, C., & Dinçer, S. L. (1996). Effect of taurine on wound healing. *Amino Acids*, 10(1), 59-71. doi:10.1007/bf00806093
- Dinçer, S., Bostanoğlu, S., & Dursun, A. (1997). The Effect of Taurine on Healing of Experimental Colonic Anastomosis. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 22.
- Dinçer, S., & Karakelle, N. A. (2019). Santral Sinir Sisteminde Taurinin Rolu ve Dozun Önemi. *Gazi Medical Journal*, 30(2). doi:10.12996/gmj.2019.59

- Dinçer, S., Ozenirler, S., Oz, E., Akyol, G., & Ozoğul, C. (2002). The protective effect of taurine pretreatment on carbon tetrachloride-induced hepatic damage--a light and electron microscopic study. *Amino Acids*, 22(4), 417-426. doi:10.1007/s007260200025
- Dong, P., Ji, X., Han, W., & Han, H. (2019). Oxymatrine attenuates amyloid beta 42 (A β (1-42))-induced neurotoxicity in primary neuronal cells and memory impairment in rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 97(2), 99-106. doi:10.1139/cjpp-2018-0299
- Du, X., Wang, X., & Geng, M. (2018). Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl Neurodegener*, 7, 2. doi:10.1186/s40035-018-0107-y
- Elder, G. A., Gama Sosa, M. A., & De Gasperi, R. (2010). Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med*, 77(1), 69-81. doi:10.1002/msj.20159
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4), 495-516. doi:10.1080/01926230701320337
- Facchinetti, R., Bronzuoli, M. R., & Scuderi, C. (2018). An Animal Model of Alzheimer Disease Based on the Intrahippocampal Injection of Amyloid β -Peptide (1-42). *Methods Mol Biol*, 1727, 343-352. doi:10.1007/978-1-4939-7571-6_25
- Fernandes, A., Caldeira, C., Cunha, C., Ferreira, E., Vaz, A. R., & Brites, D. (2022). Differences in Immune-Related Genes Underlie Temporal and Regional Pathological Progression in 3xTg-AD Mice. *Cells*, 11(1). doi:10.3390/cells11010137
- Fischer, O. (1907). Miliare Nekrosen mit drüsigen Wucherungen der Neuro-fibrillen, eine regelmässige Veränderung der Hirnrinde bei. *Monatsschr Psychiatr Neurol*, 22, 361.
- Fischer, O. (1910). Die presbyophrene Demenz, deren anatomische Grundlage und klinische Abgrenzung. *Z Ges Neurol Psychiat*, 3, 371-471.
- Frost, B., Jacks, R. L., & Diamond, M. I. (2009). Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem*, 284(19), 12845-12852. doi:10.1074/jbc.M808759200
- Gamblin, T. C., King, M. E., Kuret, J., Berry, R. W., & Binder, L. I. (2000). Oxidative regulation of fatty acid-induced tau polymerization. *Biochemistry*, 39(46), 14203-14210. doi:10.1021/bi001876l
- Gastard, M. C., Troncoso, J. C., & Koliatsos, V. E. (2003). Caspase activation in the limbic cortex of subjects with early Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 54(3), 393-398. doi:10.1002/ana.10680
- Gervais, F. G., Xu, D., Robertson, G. S., Vaillancourt, J. P., Zhu, Y., Huang, J., . . . Nicholson, D. W. (1999). Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell*, 97(3), 395-406. doi:10.1016/s0092-8674(00)80748-5
- Ghavami, S., Shojaei, S., Yeganeh, B., Ande, S. R., Jangamreddy, J. R., Mehrpour, M., . . . Łos, M. J. (2014). Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol*, 112, 24-49. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.10.004

- Goedert, M. (2009). Oskar Fischer and the study of dementia. *Brain*, 132(Pt 4), 1102-1111. doi:10.1093/brain/awn256
- Goel, P., Chakrabarti, S., Goel, K., Bhutani, K., Chopra, T., & Bali, S. (2022). Neuronal cell death mechanisms in Alzheimer's disease: An insight. *Front Mol Neurosci*, 15, 937133. doi:10.3389/fnmol.2022.937133
- Gorgani, S., Jahanshahi, M., & Elyasi, L. (2019). Taurine Prevents Passive Avoidance Memory Impairment, Accumulation of Amyloid- β Plaques, and Neuronal Loss in the Hippocampus of Scopolamine-Treated Rats. *Neurophysiology*, 51(3), 171-179. doi:10.1007/s11062-019-09810-y
- Göktaş, T., Dinçer, S., Korkmaz, A., & Sönmez, F. (2008). Ana safra kanalı bağlanması (ASKB) ile kolestaz oluşturulan sıçanlarda taurin uygulamasının karaciğerde oksidatif stres üzerine etkisi. *Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 34.Ulusal Fizyoloji Kongresi, Turkey*.
- Götz, J., Bodea, L. G., & Goedert, M. (2018). Rodent models for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*, 19(10), 583-598. doi:10.1038/s41583-018-0054-8
- Guan, H., Qiu, Z., Zhou, X., Li, S., Liu, X., Zhang, C., & Piao, F. (2017). Protection of Taurine Against Impairment in Learning and Memory in Mice Exposed to Arsenic. *Adv Exp Med Biol*, 975 Pt 1, 255-269. doi:10.1007/978-94-024-1079-2_23
- Gui, Y., Liu, H., Zhang, L., Lv, W., & Hu, X. (2015). Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Oncotarget*, 6(35), 37043-37053. doi:10.18632/oncotarget.6158
- Guo, H., Albrecht, S., Bourdeau, M., Petzke, T., Bergeron, C., & LeBlanc, A. C. (2004). Active caspase-6 and caspase-6-cleaved tau in neuropil threads, neuritic plaques, and neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 165(2), 523-531. doi:10.1016/s0002-9440(10)63317-2
- Hampel, H., Hardy, J., Blennow, K., Chen, C., Perry, G., Kim, S. H., . . . Vergallo, A. (2021). The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol Psychiatry*, 26(10), 5481-5503. doi:10.1038/s41380-021-01249-0
- Han, H. L., Zhang, J. F., Yan, E. F., Shen, M. M., Wu, J. M., Gan, Z. D., . . . Wang, T. (2020). Effects of taurine on growth performance, antioxidant capacity, and lipid metabolism in broiler chickens. *Poult Sci*, 99(11), 5707-5717. doi:10.1016/j.psj.2020.07.020
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), 184-185. doi:10.1126/science.1566067
- Hasan, N., Zameer, S., Najmi, A. K., Parvez, S., Yar, M. S., & Akhtar, M. (2021). Roflumilast and tadalafil improve learning and memory deficits in intracerebroventricular A β 1-42 rat model of Alzheimer's disease through modulations of hippocampal cAMP/cGMP/BDNF signaling pathway. *Pharmacol Rep*, 73(5), 1287-1302. doi:10.1007/s43440-021-00264-w

- Hippius, H., & Neundörfer, G. (2003). The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci*, 5(1), 101-108. doi:10.31887/DCNS.2003.5.1/hhippius
- Huang, H. Y., Lin, Y. C., Cui, S., Huang, Y., Tang, Y., Xu, J., . . . Huang, H. D. (2022). miRTarBase update 2022: an informative resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res*, 50(D1), D222-d230. doi:10.1093/nar/gkab1079
- Huang, R., Gong, X., Ni, J. Z., Jia, Y. W., & Zhao, J. (2019). [Effect of acupuncture plus medication on expression of Bcl-2 and Bax in hippocampus in rats with Alzheimer's disease]. *Zhongguo Zhen Jiu*, 39(4), 397-402. doi:10.13703/j.0255-2930.2019.04.014
- Hui, Y., Chengyong, T., Cheng, L., Haixia, H., Yuanda, Z., & Weihua, Y. (2018). Resveratrol Attenuates the Cytotoxicity Induced by Amyloid- β (1-42) in PC12 Cells by Upregulating Heme Oxygenase-1 via the PI3K/Akt/Nrf2 Pathway. *Neurochem Res*, 43(2), 297-305. doi:10.1007/s11064-017-2421-7
- Ito, T., Miyazaki, N., Schaffer, S., & Azuma, J. (2015). Potential Anti-aging Role of Taurine via Proper Protein Folding: A Study from Taurine Transporter Knockout Mouse. *Adv Exp Med Biol*, 803, 481-487. doi:10.1007/978-3-319-15126-7_38
- İlhan, A., Güney, Ş., & Dincer, S. (2021). Effects of intracerebroventricularly administered opioid peptide antagonists on tissue glycogen levels in rats after exercise. *Turk J Med Sci*, 51(4), 2185-2192. doi:10.3906/sag-2011-323
- James, D., Kang, S., & Park, S. (2014). Injection of β -amyloid into the hippocampus induces metabolic disturbances and involuntary weight loss which may be early indicators of Alzheimer's disease. *Aging Clin Exp Res*, 26(1), 93-98. doi:10.1007/s40520-013-0181-z
- Jan, A., Hartley, D. M., & Lashuel, H. A. (2010). Preparation and characterization of toxic A β aggregates for structural and functional studies in Alzheimer's disease research. *Nature protocols*, 5(6), 1186-1209. doi:10.1038/nprot.2010.72
- Jana, K., Banerjee, B., & Parida, P. K. (2013). Caspases: A Potential Therapeutic Targets in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Translational Medicine*, 01(S2). doi:10.4172/2161-1025.S2-006
- Jana, M. K., Cappai, R., Pham, C. L., & Ciccotosto, G. D. (2016). Membrane-bound tetramer and trimer A β oligomeric species correlate with toxicity towards cultured neurons. *J Neurochem*, 136(3), 594-608. doi:10.1111/jnc.13443
- Jang, H., Lee, S., Choi, S. L., Kim, H. Y., Baek, S., & Kim, Y. (2017). Taurine Directly Binds to Oligomeric Amyloid- β and Recovers Cognitive Deficits in Alzheimer Model Mice. *Advances in experimental medicine and biology*, 975 Pt 1, 233-241.
- Jeong, J. E., Kim, T. Y., Park, H. J., Lee, K. H., Lee, K. H., Choi, E. J., . . . Kim, W. T. (2009). Taurine exerts neuroprotective effects via anti-apoptosis in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Korean Journal of Pediatrics*, 52(12). doi:10.3345/kjp.2009.52.12.1337

- Jia, X. T., Ye, T., Yuan, L., Zhang, G. J., Liu, Z. Q., Di, Z. L., . . . Pan, Y. F. (2016). Exendin-4, a glucagon-like peptide 1 receptor agonist, protects against amyloid- β peptide-induced impairment of spatial learning and memory in rats. *Physiol Behav*, 159, 72-79. doi:10.1016/j.physbeh.2016.03.016
- Jian, C., Lu, M., Zhang, Z., Liu, L., Li, X., Huang, F., . . . Zou, D. (2017). miR-34a knockout attenuates cognitive deficits in APP/PS1 mice through inhibition of the amyloidogenic processing of APP. *Life Sci*, 182, 104-111. doi:10.1016/j.lfs.2017.05.023
- Jiang, P., Chen, L., Xu, J., Liu, W., Feng, F., & Qu, W. (2021). Neuroprotective Effects of Rhynchophylline Against A β (1-42)-Induced Oxidative Stress, Neurodegeneration, and Memory Impairment Via Nrf2-ARE Activation. *Neurochem Res*, 46(9), 2439-2450. doi:10.1007/s11064-021-03343-9
- Jong, C. J., Azuma, J., & Schaffer, S. (2012). Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production. *Amino Acids*, 42(6), 2223-2232. doi:10.1007/s00726-011-0962-7
- Kamelia, E., Islam, A. A., Hatta, M., Kaelan, C., Patellongi, I., Massi, M. N., . . . Miko, H. (2017). Evaluation of Caspase-3 mRNA Gene Expression Activity in Amyloid Beta-induced Alzheimer's Disease Rats. *Journal of Medical Sciences*, 17(3), 117-125. doi:10.3923/jms.2017
- Kametani, F., & Hasegawa, M. (2018). Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*, 12, 25. doi:10.3389/fnins.2018.00025
- Karran, E., & De Strooper, B. (2016). The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J Neurochem*, 139 Suppl 2, 237-252. doi:10.1111/jnc.13632
- Kasza, Á., Penke, B., Frank, Z., Bozsó, Z., Szegedi, V., Hunya, Á., . . . Fülöp, L. (2017). Studies for Improving a Rat Model of Alzheimer's Disease: Icv Administration of Well-Characterized β -Amyloid 1-42 Oligomers Induce Dysfunction in Spatial Memory. *Molecules*, 22(11). doi:10.3390/molecules22112007
- Kiko, T., Nakagawa, K., Tsuduki, T., Furukawa, K., Arai, H., & Miyazawa, T. (2014). MicroRNAs in plasma and cerebrospinal fluid as potential markers for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 39(2), 253-259. doi:10.3233/jad-130932
- Kim, C., & Cha, Y. N. (2014). Taurine chloramine produced from taurine under inflammation provides anti-inflammatory and cytoprotective effects. *Amino Acids*, 46(1), 89-100. doi:10.1007/s00726-013-1545-6
- Kim, H. Y., Kim, H. V., Yoon, J. H., Kang, B. R., Cho, S. M., Lee, S., . . . Kim, Y. (2014). Taurine in drinking water recovers learning and memory in the adult APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Rep*, 4, 7467. doi:10.1038/srep07467
- Kim, H. Y., Lee, D. K., Chung, B. R., Kim, H. V., & Kim, Y. (2016). Intracerebroventricular Injection of Amyloid- β Peptides in Normal Mice to Acutely Induce Alzheimer-like Cognitive Deficits. *J Vis Exp*(109). doi:10.3791/53308

- Kim, K. S., Jang, M. J., Fang, S., Yoon, S. G., Kim, I. Y., Seong, J. K., . . . Hahm, D. H. (2019). Anti-obesity effect of taurine through inhibition of adipogenesis in white fat tissue but not in brown fat tissue in a high-fat diet-induced obese mouse model. *Amino Acids*, 51(2), 245-254. doi:10.1007/s00726-018-2659-7
- Kim, S. Y., Park, T., & Kim, H. W. (2009). Inhibition of apoptosis by taurine in macrophages treated with sodium nitroprusside. *Adv Exp Med Biol*, 643, 481-489. doi:10.1007/978-0-387-75681-3_50
- Kinney, J. W., Bemiller, S. M., Murtishaw, A. S., Leisgang, A. M., Salazar, A. M., & Lamb, B. T. (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)*, 4, 575-590. doi:10.1016/j.trci.2018.06.014
- Knopman, D. S., Amieva, H., Petersen, R. C., Ch  telat, G., Holtzman, D. M., Hyman, B. T., . . . Jones, D. T. (2021). Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primers*, 7(1), 33. doi:10.1038/s41572-021-00269-y
- Knopp, R. C., Baumann, K. K., Wilson, M. L., Banks, W. A., & Erickson, M. A. (2022). Amyloid Beta Pathology Exacerbates Weight Loss and Brain Cytokine Responses following Low-Dose Lipopolysaccharide in Aged Female Tg2576 Mice. *Int J Mol Sci*, 23(4). doi:10.3390/ijms23042377
- Kudo, W., Lee, H. P., Smith, M. A., Zhu, X., Matsuyama, S., & Lee, H. G. (2012). Inhibition of Bax protects neuronal cells from oligomeric A   neurotoxicity. *Cell Death Dis*, 3(5), e309. doi:10.1038/cddis.2012.43
- Kumar, S., & Reddy, P. H. (2016). Are circulating microRNAs peripheral biomarkers for Alzheimer's disease? *Biochim Biophys Acta*, 1862(9), 1617-1627. doi:10.1016/j.bbadis.2016.06.001
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., . . . Klein, W. L. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11), 6448-6453. doi:10.1073/pnas.95.11.6448
- Lanzrein, A. S., Johnston, C. M., Perry, V. H., Jobst, K. A., King, E. M., & Smith, A. D. (1998). Longitudinal study of inflammatory factors in serum, cerebrospinal fluid, and brain tissue in Alzheimer disease: interleukin-1beta, interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist, tumor necrosis factor-alpha, the soluble tumor necrosis factor receptors I and II, and alpha1-antichymotrypsin. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 12(3), 215-227. doi:10.1097/00002093-199809000-00016
- Lassmann, H., Bancher, C., Breitschopf, H., Wegiel, J., Bobinski, M., Jellinger, K., & Wisniewski, H. M. (1995). Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ. *Acta Neuropathol*, 89(1), 35-41. doi:10.1007/bf00294257
- Leon, R., Wu, H., Jin, Y., Wei, J., Buddhala, C., Prentice, H., & Wu, J. Y. (2009). Protective function of taurine in glutamate-induced apoptosis in cultured neurons. *J Neurosci Res*, 87(5), 1185-1194. doi:10.1002/jnr.21926

- Li, L. H., Tu, Q. Y., Deng, X. H., Xia, J., Hou, D. R., Guo, K., & Zi, X. H. (2017). Mutant presenilin2 promotes apoptosis through the p53/miR-34a axis in neuronal cells. *Brain Res*, 1662, 57-64. doi:10.1016/j.brainres.2017.01.034
- Li, Q., Liu, T., Yang, S., & Zhang, Z. (2019). Upregulation of miR-34a by Inhibition of IRE1 α Has Protective Effect against A β -Induced Injury in SH-SY5Y Cells by Targeting Caspase-2. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2140427. doi:10.1155/2019/2140427
- Li, Q. L., Zhang, H. Y., Qin, Y. J., Meng, Q. L., Yao, X. L., & Guo, H. K. (2016). MicroRNA-34a promoting apoptosis of human lens epithelial cells through down-regulation of B-cell lymphoma-2 and silent information regulator. *Int J Ophthalmol*, 9(11), 1555-1560. doi:10.18240/ijo.2016.11.04
- Li, S., Guan, H., Qian, Z., Sun, Y., Gao, C., Li, G., . . . Hu, S. (2017). Taurine inhibits 2,5-hexanedione-induced oxidative stress and mitochondria-dependent apoptosis in PC12 cells. *Ind Health*, 55(2), 108-118. doi:10.2486/indhealth.2016-0044
- Li, S., Yang, L., Zhang, Y., Zhang, C., Shao, J., Liu, X., . . . Piao, F. (2017). Taurine Ameliorates Arsenic-Induced Apoptosis in the Hippocampus of Mice Through Intrinsic Pathway. *Adv Exp Med Biol*, 975 Pt 1, 183-192. doi:10.1007/978-94-024-1079-2_16
- Li, Y., Zeng, M., Chen, W., Liu, C., Wang, F., Han, X., . . . Peng, S. (2014). Dexmedetomidine reduces isoflurane-induced neuroapoptosis partly by preserving PI3K/Akt pathway in the hippocampus of neonatal rats. *PLoS One*, 9(4), e93639. doi:10.1371/journal.pone.0093639
- Liu, C., He, P., Guo, Y., Tian, Q., Wang, J., Wang, G., . . . Li, M. (2022). Taurine attenuates neuronal ferroptosis by regulating GABA(B)/AKT/GSK3 β / β -catenin pathway after subarachnoid hemorrhage. *Free Radic Biol Med*, 193(Pt 2), 795-807. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2022.11.003
- Liu, P. P., Xie, Y., Meng, X. Y., & Kang, J. S. (2019). History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduct Target Ther*, 4, 29. doi:10.1038/s41392-019-0063-8
- Lorke, D. E., Wai, M. S. M., Liang, Y., & Yew, D. T. (2010). Tunel and Growth Factor Expression in the Prefrontal Cortex of Alzheimer Patients over 80 Years Old. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 23(1), 13-23. doi:10.1177/039463201002300102
- Lu, D. C., Rabizadeh, S., Chandra, S., Shayya, R. F., Ellerby, L. M., Ye, X., . . . Bredesen, D. E. (2000). A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor. *Nat Med*, 6(4), 397-404. doi:10.1038/74656
- Maei, H. R., Zaslavsky, K., Teixeira, C. M., & Frankland, P. W. (2009). What is the Most Sensitive Measure of Water Maze Probe Test Performance? *Front Integr Neurosci*, 3, 4. doi:10.3389/neuro.07.004.2009
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*, 4(9), 429-434. doi:10.4103/1947-2714.100998

- Maldonado-Lasuncion, I., Atienza, M., Sanchez-Espinosa, M. P., & Cantero, J. L. (2018). Aging-Related Changes in Cognition and Cortical Integrity are Associated With Serum Expression of Candidate MicroRNAs for Alzheimer Disease. *Cerebral Cortex*, 29(10), 4426-4437. doi:10.1093/cercor/bhy323
- Mao, S., Sun, Q., Xiao, H., Zhang, C., & Li, L. (2015). Secreted miR-34a in astrocytic shedding vesicles enhanced the vulnerability of dopaminergic neurons to neurotoxins by targeting Bcl-2. *Protein Cell*, 6(7), 529-540. doi:10.1007/s13238-015-0168-y
- Mattson, M. P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I., & Rydel, R. E. (1992). beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci*, 12(2), 376-389. doi:10.1523/jneurosci.12-02-00376.1992
- Means, J. C., Gerdes, B. C., Kaja, S., Sumien, N., Payne, A. J., Stark, D. A., . . . Koulen, P. (2016). Caspase-3-Dependent Proteolytic Cleavage of Tau Causes Neurofibrillary Tangles and Results in Cognitive Impairment During Normal Aging. *Neurochem Res*, 41(9), 2278-2288. doi:10.1007/s11064-016-1942-9
- Mesulam, M. (2012). Cholinergic aspects of aging and Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*, 71(9), 760-761. doi:10.1016/j.biopsych.2012.02.025
- Min, L. J., Kobayashi, Y., Mogi, M., Tsukuda, K., Yamada, A., Yamauchi, K., . . . Horiuchi, M. (2017). Administration of bovine casein-derived peptide prevents cognitive decline in Alzheimer disease model mice. *PLoS One*, 12(2), e0171515. doi:10.1371/journal.pone.0171515
- Modi, P. K., Jaiswal, S., & Sharma, P. (2016). Regulation of Neuronal Cell Cycle and Apoptosis by MicroRNA 34a. *Mol Cell Biol*, 36(1), 84-94. doi:10.1128/mcb.00589-15
- Moludi, J., Qaisar, S. A., Kadhim, M. M., Ahmadi, Y., & Davari, M. (2022). Protective and therapeutic effectiveness of taurine supplementation plus low calorie diet on metabolic parameters and endothelial markers in patients with diabetes mellitus: a randomized, clinical trial. *Nutr Metab (Lond)*, 19(1), 49. doi:10.1186/s12986-022-00684-2
- Mushtaq, G., Greig, N. H., Anwar, F., Zamzami, M. A., Choudhry, H., Shaik, M. M., . . . Kamal, M. A. (2016). miRNAs as Circulating Biomarkers for Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Med Chem*, 12(3), 217-225. doi:10.2174/1573406411666151030112140
- Mutisya, E. M., Bowling, A. C., & Beal, M. F. (1994). Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 63(6), 2179-2184. doi:10.1046/j.1471-4159.1994.63062179.x
- Müller, M., Kuiperij, H. B., Claassen, J. A., Küsters, B., & Verbeek, M. M. (2014). MicroRNAs in Alzheimer's disease: differential expression in hippocampus and cell-free cerebrospinal fluid. *Neurobiol Aging*, 35(1), 152-158. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.07.005

- Nakajima, Y., Osuka, K., Seki, Y., Gupta, R. C., Hara, M., Takayasu, M., & Wakabayashi, T. (2010). Taurine reduces inflammatory responses after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 27(2), 403-410. doi:10.1089/neu.2009.1044
- Nelson, A. R., Sweeney, M. D., Sagare, A. P., & Zlokovic, B. V. (2016). Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1862(5), 887-900. doi:10.1016/j.bbadis.2015.12.016
- Newcombe, E. A., Camats-Perna, J., Silva, M. L., Valmas, N., Huat, T. J., & Medeiros, R. (2018). Inflammation: the link between comorbidities, genetics, and Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, 15(1), 276. doi:10.1186/s12974-018-1313-3
- Niu, X., Zheng, S., Liu, H., & Li, S. (2018). Protective effects of taurine against inflammation, apoptosis, and oxidative stress in brain injury. *Mol Med Rep*, 18(5), 4516-4522. doi:10.3892/mmr.2018.9465
- Oboudiyat, C., Glazer, H., Seifan, A., Greer, C., & Isaacson, R. S. (2013). Alzheimer's disease. *Semin Neurol*, 33(4), 313-329. doi:10.1055/s-0033-1359319
- Othman, M. Z., Hassan, Z., & Che Has, A. T. (2022). Morris water maze: a versatile and pertinent tool for assessing spatial learning and memory. *Exp Anim*, 71(3), 264-280. doi:10.1538/expanim.21-0120
- Oudit, G. Y., Trivieri, M. G., Khaper, N., Husain, T., Wilson, G. J., Liu, P., . . . Backx, P. H. (2004). Taurine supplementation reduces oxidative stress and improves cardiovascular function in an iron-overload murine model. *Circulation*, 109(15), 1877-1885. doi:10.1161/01.Cir.0000124229.40424.80
- Ozan, G., Türközkan, N., Bircan, F. S., & Balabanlı, B. (2018). Effect of Taurine on Brain Energy Status and Malondialdehyde Levels in Endotoxemia Model. *Bozok Med J* 2018;8(1):11-7.
- Paradis, E., Douillard, H., Koutroumanis, M., Goodyer, C., & LeBlanc, A. (1996). Amyloid beta peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulates bax expression in human neurons. *J Neurosci*, 16(23), 7533-7539. doi:10.1523/jneurosci.16-23-07533.1996
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). The rat brain in stereotaxic coordinates. *Elsevier, Sixth Edition*.
- Penke, B., Szűcs, M., & Bogár, F. (2020). Oligomerization and Conformational Change Turn Monomeric β -Amyloid and Tau Proteins Toxic: Their Role in Alzheimer's Pathogenesis. *Molecules*, 25(7). doi:10.3390/molecules25071659
- Picken, M. M. (2020). The Pathology of Amyloidosis in Classification: A Review. *Acta Haematol*, 143(4), 322-334. doi:10.1159/000506696
- Pompl, P. N., Yemul, S., Xiang, Z., Ho, L., Haroutunian, V., Purohit, D., . . . Pasinetti, G. M. (2003). Caspase gene expression in the brain as a function of the clinical progression of Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 60(3), 369-376. doi:10.1001/archneur.60.3.369

- Prakash, A., Medhi, B., & Chopra, K. (2013). Granulocyte colony stimulating factor (GCSF) improves memory and neurobehavior in an amyloid- β induced experimental model of Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav*, 110, 46-57. doi:10.1016/j.pbb.2013.05.015
- Pryor, N. E., Moss, M. A., & Hestekin, C. N. (2012). Unraveling the early events of amyloid- β protein (A β) aggregation: techniques for the determination of A β aggregate size. *Int J Mol Sci*, 13(3), 3038-3072. doi:10.3390/ijms13033038
- Puzzo, D., Gulisano, W., Palmeri, A., & Arancio, O. (2015). Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*, 10(7), 703-711. doi:10.1517/17460441.2015.1041913
- Quinlan, S., Kenny, A., Medina, M., Engel, T., & Jimenez-Mateos, E. M. (2017). MicroRNAs in Neurodegenerative Diseases. *Int Rev Cell Mol Biol*, 334, 309-343. doi:10.1016/bs.ircmb.2017.04.002
- Rais, N., Ved, A., Shadab, M., Ahmad, R., & Shahid, M. (2022). Taurine, a non-proteinous essential amino acid for human body systems: an overview. *Arab Gulf Journal of Scientific Research*, 41(1), 48-66. doi:10.1108/agjsr-04-2022-0019
- Rajesh, Y., & Kanneganti, T. D. (2022). Innate Immune Cell Death in Neuroinflammation and Alzheimer's Disease. *Cells*, 11(12). doi:10.3390/cells11121885
- Reddy, P. H., Williams, J., Smith, F., Bhatti, J. S., Kumar, S., Vijayan, M., . . . Reddy, A. P. (2017). MicroRNAs, Aging, Cellular Senescence, and Alzheimer's Disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 146, 127-171. doi:10.1016/bs.pmbts.2016.12.009
- Redlich, E. (1898). Uber miliare Sklerose der Hirnrinde bei seniler Atrophie. *Jahrb Psychiatry Neurol*, 17, 208-216.
- Reeta, K. H., Singh, D., & Gupta, Y. K. (2017). Chronic treatment with taurine after intracerebroventricular streptozotocin injection improves cognitive dysfunction in rats by modulating oxidative stress, cholinergic functions and neuroinflammation. *Neurochem Int*, 108, 146-156. doi:10.1016/j.neuint.2017.03.006
- Reitz, C. (2012). Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: a critical review. *Int J Alzheimers Dis*, 2012, 369808. doi:10.1155/2012/369808
- Richartz, E., Stransky, E., Batra, A., Simon, P., Lewczuk, P., Buchkremer, G., . . . Schott, K. (2005). Decline of immune responsiveness: a pathogenetic factor in Alzheimer's disease? *J Psychiatr Res*, 39(5), 535-543. doi:10.1016/j.jpsychires.2004.12.005
- Rikimaru, M., Ohsawa, Y., Wolf, A. M., Nishimaki, K., Ichimiya, H., Kamimura, N., . . . Sunada, Y. (2012). Taurine ameliorates impaired the mitochondrial function and prevents stroke-like episodes in patients with MELAS. *Intern Med*, 51(24), 3351-3357. doi:10.2169/internalmedicine.51.7529
- Ripps, H., & Shen, W. (2012). Review: taurine: a "very essential" amino acid. *Mol Vis*, 18, 2673-2686.

- Rohn, T. T., & Head, E. (2009). Caspases as therapeutic targets in Alzheimer's disease: is it time to "cut" to the chase? *Int J Clin Exp Pathol*, 2(2), 108-118.
- Rohn, T. T., Rissman, R. A., Davis, M. C., Kim, Y. E., Cotman, C. W., & Head, E. (2002). Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis*, 11(2), 341-354. doi:10.1006/nbdi.2002.0549
- Rohn, T. T., Rissman, R. A., Head, E., & Cotman, C. W. (2002). Caspase Activation in the Alzheimer's Disease Brain: Tortuous and Torturous. *Drug News Perspect*, 15(9), 549-557. doi:10.1358/dnp.2002.15.9.740233
- Rohn, T. T., Vyas, V., Hernandez-Estrada, T., Nichol, K. E., Christie, L. A., & Head, E. (2008). Lack of pathology in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease after overexpression of the anti-apoptotic protein Bcl-2. *J Neurosci*, 28(12), 3051-3059. doi:10.1523/jneurosci.5620-07.2008
- Rupaimoole, R., & Slack, F. J. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 16(3), 203-222. doi:10.1038/nrd.2016.246
- Russell, A. E., Doll, D. N., Sarkar, S. N., & Simpkins, J. W. (2016). TNF- α and Beyond: Rapid Mitochondrial Dysfunction Mediates TNF- α -Induced Neurotoxicity. *J Clin Cell Immunol*, 7(6). doi:10.4172/2155-9899.1000467
- Sanchez-Varo, R., Mejias-Ortega, M., Fernandez-Valenzuela, J. J., Nuñez-Díaz, C., Caceres-Palomo, L., Vegas-Gomez, L., . . . Gutierrez, A. (2022). Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: An Integrative Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5404. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/10/5404>
- Sarkar, S., Engler-Chiurazzi, E. B., Cavendish, J. Z., Povroznik, J. M., Russell, A. E., Quintana, D. D., . . . Simpkins, J. W. (2019). Over-expression of miR-34a induces rapid cognitive impairment and Alzheimer's disease-like pathology. *Brain Res*, 1721, 146327. doi:10.1016/j.brainres.2019.146327
- Sarkar, S., Jun, S., Rellick, S., Quintana, D. D., Cavendish, J. Z., & Simpkins, J. W. (2016). Expression of microRNA-34a in Alzheimer's disease brain targets genes linked to synaptic plasticity, energy metabolism, and resting state network activity. *Brain Res*, 1646, 139-151. doi:10.1016/j.brainres.2016.05.026
- Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D., George-Hyslop, P. H., Pericak-Vance, M. A., Joo, S. H., . . . et al. (1993). Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 43(8), 1467-1472. doi:10.1212/wnl.43.8.1467
- Schaffer, S., & Kim, H. W. (2018). Effects and Mechanisms of Taurine as a Therapeutic Agent. *Biomol Ther (Seoul)*, 26(3), 225-241. doi:10.4062/biomolther.2017.251
- Scheffer, S., Hermkens, D. M. A., van der Weerd, L., de Vries, H. E., & Daemen, M. (2021). Vascular Hypothesis of Alzheimer Disease: Topical Review of Mouse Models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 41(4), 1265-1283. doi:10.1161/atvbaha.120.311911

- Schipper, H. M., Maes, O. C., Chertkow, H. M., & Wang, E. (2007). MicroRNA expression in Alzheimer blood mononuclear cells. *Gene Regul Syst Bio*, 1, 263-274. doi:10.4137/grsb.s361
- Selekler, K. (2010). Alois Alzheimer and Alzheimer's Disease. *Türk Geriatri Dergisi*, 13, 9-14.
- Sharma, S., Saini, A., & Nehru, B. (2021). Neuroprotective effects of carbenoxolone against amyloid-beta 1-42 oligomer-induced neuroinflammation and cognitive decline in rats. *Neurotoxicology*, 83, 89-105. doi:10.1016/j.neuro.2020.12.015
- Sharma, S., Sharma, N., Saini, A., & Nehru, B. (2019). Carbenoxolone Reverses the Amyloid Beta 1-42 Oligomer-Induced Oxidative Damage and Anxiety-Related Behavior in Rats. *Neurotox Res*, 35(3), 654-667. doi:10.1007/s12640-018-9975-2
- Sharma, V. K., Singh, T. G., Singh, S., Garg, N., & Dhiman, S. (2021). Apoptotic Pathways and Alzheimer's Disease: Probing Therapeutic Potential. *Neurochem Res*, 46(12), 3103-3122. doi:10.1007/s11064-021-03418-7
- Shekarian, M., Komaki, A., Shahidi, S., Sarihi, A., Salehi, I., & Raoufi, S. (2020). The protective and therapeutic effects of vinpocetine, a PDE1 inhibitor, on oxidative stress and learning and memory impairment induced by an intracerebroventricular (ICV) injection of amyloid beta (a β) peptide. *Behav Brain Res*, 383, 112512. doi:10.1016/j.bbr.2020.112512
- Shen, W. X., Chen, J. H., Lu, J. H., Peng, Y. P., & Qiu, Y. H. (2014). TGF- β 1 protection against A β 1-42-induced neuroinflammation and neurodegeneration in rats. *Int J Mol Sci*, 15(12), 22092-22108. doi:10.3390/ijms151222092
- Shree, S., Bhardwaj, R., Kashish, & Deshmukh, R. (2017). Non-transgenic Animal Models of Alzheimer's Disease. In P. K. Bansal & R. Deshmukh (Eds.), *Animal Models of Neurological Disorders: Principle and Working Procedure for Animal Models of Neurological Disorders* (pp. 3-22). Singapore: Springer Singapore.
- Silva, S. P., Zago, A. M., Carvalho, F. B., Germann, L., Colombo, G. M., Rahmeier, F. L., . . . Fernandes, M. D. C. (2021). Neuroprotective Effect of Taurine against Cell Death, Glial Changes, and Neuronal Loss in the Cerebellum of Rats Exposed to Chronic-Recurrent Neuroinflammation Induced by LPS. *J Immunol Res*, 2021, 7497185. doi:10.1155/2021/7497185
- Slota, J. A., & Booth, S. A. (2019). MicroRNAs in Neuroinflammation: Implications in Disease Pathogenesis, Biomarker Discovery and Therapeutic Applications. *Noncoding RNA*, 5(2). doi:10.3390/ncrna5020035
- Su, J. H., Anderson, A. J., Cummings, B. J., & Cotman, C. W. (1994). Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. *Neuroreport*, 5(18), 2529-2533. doi:10.1097/00001756-199412000-00031
- Su, J. H., Zhao, M., Anderson, A. J., Srinivasan, A., & Cotman, C. W. (2001). Activated caspase-3 expression in Alzheimer's and aged control brain: correlation with Alzheimer pathology. *Brain Res*, 898(2), 350-357. doi:10.1016/s0006-8993(01)02018-2

- Sun, L., Ju, T., Wang, T., Zhang, L., Ding, F., Zhang, Y., . . . Chi, L. (2019). Decreased Netrin-1 and Correlated Th17/Tregs Balance Disorder in A β (1-42) Induced Alzheimer's Disease Model Rats. *Front Aging Neurosci*, 11, 124. doi:10.3389/fnagi.2019.00124
- Sun, X., Chen, W. D., & Wang, Y. D. (2015). β -Amyloid: the key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front Pharmacol*, 6, 221. doi:10.3389/fphar.2015.00221
- Swarbrick, S., Wragg, N., Ghosh, S., & Stolzing, A. (2019). Systematic Review of miRNA as Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*, 56(9), 6156-6167. doi:10.1007/s12035-019-1500-y
- Swerdlow, R. H., Burns, J. M., & Khan, S. M. (2014). The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives. *Biochim Biophys Acta*, 1842(8), 1219-1231. doi:10.1016/j.bbadis.2013.09.010
- Swerdlow, R. H., & Khan, S. M. (2004). A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Med Hypotheses*, 63(1), 8-20. doi:10.1016/j.mehy.2003.12.045
- Şentürk İ, A., Başar, H. M., Soykök, G. U., Balaban, H., Kayım Yıldız, Ö., Bolayır, E., & Topaktaş, S. (2021). Prevalence of Dementia and Mild Cognitive Impairment in a Rural Area of Sivas, Turkey. *Cureus*, 13(2), e13069. doi:10.7759/cureus.13069
- Takatani, T., Takahashi, K., Uozumi, Y., Shikata, E., Yamamoto, Y., Ito, T., . . . Azuma, J. (2004). Taurine inhibits apoptosis by preventing formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 287(4), C949-C953. doi:10.1152/ajpcell.00042.2004
- Tekin, E., Aslan Karakelle, N., & Dinçer, S. (2023). Effects of taurine on metal cations, transthyretin and LRP-1 in a rat model of Alzheimer's disease. *J Trace Elem Med Biol*, 79, 127219. doi:10.1016/j.jtemb.2023.127219
- Turunc Bayrakdar, E., Uyanikgil, Y., Kanit, L., Koylu, E., & Yalcin, A. (2014). Nicotinamide treatment reduces the levels of oxidative stress, apoptosis, and PARP-1 activity in A β (1-42)-induced rat model of Alzheimer's disease. *Free Radic Res*, 48(2), 146-158. doi:10.3109/10715762.2013.857018
- TÜİK. (2021). İstatistiklerle Yaşlılar, 2020. *Haber Bülteni*, 37227. Retrieved from <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=İstatistiklerle-Yaslilar-2020-37227>
- TÜİK. (2023). İstatistiklerle Yaşlılar, 2022. *Haber Bülteni*, 49667. Retrieved from <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=%C4%B0statistiklerle-Ya%C5%9Fl%C4%B1lar-2022-49667&dil=1#:~:text=Alzheimer%20hastal%C4%B1%C4%9F%C4%B1ndan%20%C3%B6len%20ya%C5%9Fl%C4%B1lar%C4%B1n%20oran%C4%B1,oran%C4%B1%20%253%2C8%20oldu>
- Tzoneva, R., Georgieva, I., Ivanova, N., Uzunova, V., Nenchevska, Z., Apostolova, S., . . . Tchekalarova, J. (2021). The Role of Melatonin on Behavioral Changes and Concomitant Oxidative Stress in icvA β (1-42) Rat Model with Pinealectomy. *Int J Mol Sci*, 22(23). doi:10.3390/ijms222312763

- Viola, K. L., & Klein, W. L. (2015). Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol*, 129(2), 183-206. doi:10.1007/s00401-015-1386-3
- Wang, Q., Li, H., Wang, F. X., Gao, L., Qin, J. C., Liu, J. G., . . . Liu, M. X. (2017). Huannao Yicong Decoction () extract reduces inflammation and cell apoptosis in A β (1-42)-induced Alzheimer's disease model of rats. *Chin J Integr Med*, 23(9), 672-680. doi:10.1007/s11655-016-2255-1
- Wang, W. Y., Tan, M. S., Yu, J. T., & Tan, L. (2015). Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Ann Transl Med*, 3(10), 136. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.49
- Wang, X., Liu, P., Zhu, H., Xu, Y., Ma, C., Dai, X., . . . Qin, C. (2009). miR-34a, a microRNA up-regulated in a double transgenic mouse model of Alzheimer's disease, inhibits bcl2 translation. *Brain Res Bull*, 80(4-5), 268-273. doi:10.1016/j.brainresbull.2009.08.006
- Wei, Y., & Li, X. (2022). Different phenotypes of microglia in animal models of Alzheimer disease. *Immun Ageing*, 19(1), 44. doi:10.1186/s12979-022-00300-0
- Wenting, L., Ping, L., Haitao, J., Meng, Q., & Xiaofei, R. (2014). Therapeutic effect of taurine against aluminum-induced impairment on learning, memory and brain neurotransmitters in rats. *Neurol Sci*, 35(10), 1579-1584. doi:10.1007/s10072-014-1801-x
- WHO. (2023). Dementia . *Fact sheets/Detail/Dementia*. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia#:~:text=Alzheimer%20disease%20is%20the%20most,dependency%20among%20older%20people%20globally>.
- Wu, G., Zhou, J., Yang, M., Xu, C., Pang, H., Qin, X., . . . Hu, J. (2022). The Regulatory Effects of Taurine on Neurogenesis and Apoptosis of Neural Stem Cells in the Hippocampus of Rats. *Adv Exp Med Biol*, 1370, 351-367. doi:10.1007/978-3-030-93337-1_34
- Wu, H., Jin, Y., Wei, J., Jin, H., Sha, D., & Wu, J. Y. (2005). Mode of action of taurine as a neuroprotector. *Brain Res*, 1038(2), 123-131. doi:10.1016/j.brainres.2005.01.058
- Wu, X., Lv, Y. G., Du, Y. F., Chen, F., Reed, M. N., Hu, M., . . . Hong, H. (2018). Neuroprotective effects of INT-777 against A β (1-42)-induced cognitive impairment, neuroinflammation, apoptosis, and synaptic dysfunction in mice. *Brain Behav Immun*, 73, 533-545. doi:10.1016/j.bbi.2018.06.018
- Xu, M., Huang, H., Mo, X., Zhu, Y., Chen, X., Li, X., . . . Liu, L. (2021). Quercetin-3-O-Glucuronide Alleviates Cognitive Deficit and Toxicity in A β (1-42) -Induced AD-Like Mice and SH-SY5Y Cells. *Mol Nutr Food Res*, 65(6), e2000660. doi:10.1002/mnfr.202000660
- Yamakuchi, M., Ferlito, M., & Lowenstein, C. J. (2008). miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(36), 13421-13426. doi:10.1073/pnas.0801613105

- Yildiz, Z., Eren, N., Orcun, A., Münevver Gokyigit, F., Turgay, F., & Gündogdu Celebi, L. (2021). Serum apelin-13 levels and total oxidant/antioxidant status of patients with Alzheimer's disease. *Aging Med (Milton)*, 4(3), 201-205. doi:10.1002/agm2.12173
- Zhang, J., Ke, K. F., Liu, Z., Qiu, Y. H., & Peng, Y. P. (2013). Th17 cell-mediated neuroinflammation is involved in neurodegeneration of $\text{A}\beta$ 1-42-induced Alzheimer's disease model rats. *PLoS One*, 8(10), e75786. doi:10.1371/journal.pone.0075786
- Zhang, T., Chen, D., & Lee, T. H. (2019). Phosphorylation Signaling in APP Processing in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*, 21(1). doi:10.3390/ijms21010209
- Zhang, Y., Guo, T., Ding, Y., Wang, X., & Liu, P. (2023). Taurine and deferiprone against Al-linked apoptosis in rat hippocampus. *J Trace Elem Med Biol*, 76, 127113. doi:10.1016/j.jtemb.2022.127113
- Zhang, Y., Li, D., Li, H., Hou, D., & Hou, J. (2016). Taurine Pretreatment Prevents Isoflurane-Induced Cognitive Impairment by Inhibiting ER Stress-Mediated Activation of Apoptosis Pathways in the Hippocampus in Aged Rats. *Neurochem Res*, 41(10), 2517-2525. doi:10.1007/s11064-016-1963-4
- Zhang, Y., McLaughlin, R., Goodyer, C., & LeBlanc, A. a. (2002). Selective cytotoxicity of intracellular amyloid β peptide1–42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. *Journal of Cell Biology*, 156(3), 519-529. doi:10.1083/jcb.200110119
- Zhang, Y. L., Xing, R. Z., Luo, X. B., Xu, H., Chang, R. C., Zou, L. Y., . . . Yang, X. F. (2016). Anxiety-like behavior and dysregulation of miR-34a in triple transgenic mice of Alzheimer's disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 20(13), 2853-2862.
- Zhao, Y., & Zhao, B. (2013). Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 316523. doi:10.1155/2013/316523
- Zhou, J., Li, Y., Yan, G., Bu, Q., Lv, L., Yang, Y., . . . Cen, X. (2011). Protective role of taurine against morphine-induced neurotoxicity in C6 cells via inhibition of oxidative stress. *Neurotox Res*, 20(4), 334-342. doi:10.1007/s12640-011-9247-x
- Zhu, X., Perry, G., Moreira, P. I., Aliev, G., Cash, A. D., Hirai, K., & Smith, M. A. (2006). Mitochondrial abnormalities and oxidative imbalance in Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis*, 9(2), 147-153. doi:10.3233/jad-2006-9207
- Zilka, N., & Novak, M. (2006). The tangled story of Alois Alzheimer. *Bratisl Lek Listy*, 107(9-10), 343-345.
- Zlokovic, B. V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci*, 12(12), 723-738. doi:10.1038/nrn3114



EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 18.01.2022-E.266905



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : E-66332047-604.01.02-266905
 Konu : Değerlendirme ve Onay

18.01.2022

Sayın Prof. Dr. Sibel DİNÇER
Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Sibel DİNÇER, Burak KAYABAŞI, Nida Aslan KARAKELLE'den oluşan, G.Ü.ET-22.013 kod numaralı ve "*Alzheimer Rat Modelinde Taurin Uygulamasının Bilişsel Fonksiyonlar, miRNA, İnflamasyon ve Oksidatif Stres Belirteçleri Üzerine Etkisi*" başlıklı araştırma önerinin incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-22.013 and entitled "*The Effect of Taurine Administration on Cognitive Functions, miRNA, Inflammation and Oxidative Stress Markers in Rat Model of Alzheimer*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

Hayvan Türü : Sıçan Wistar Albino
 Hayvan Sayısı : 32

Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Belge Doğrulama Kodu :BSDCP1T242

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Takip Adresi : <https://belgedogrulama.gazi.edu.tr/belgedogrulama.aspx>

Emniyet Mahallesi Bandırma Caddesi No :6/1 06560 Yenimahalle/ANKARA
 Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
 e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/
 Kep Adresi: gaziuniversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için :Esengül BOŞNAK
 Genel Evrak Sorumlusu
 Telefon No:03122022666



Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Evrak Tarih ve Sayısı: 25.08.2023-E.728047



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : E-66332047-604.01.02-728047
Konu : Değerlendirme ve Onay

25.08.2023

Sayın Prof. Dr. Sibel DİNÇER
Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Daha önce 18.01.2022 tarihli ve E.266905 sayılı yazımız ile onay alan G.Ü.ET-22.013 kod numaralı *"Alzheimer Rat Modelinde Taurin Uygulamasının Bilişsel Fonksiyonlar, miRNA, İnflamasyon ve Oksidatif Stres Belirteçleri Üzerine Etkisi"* başlıklı çalışmanız ile ilgili vermiş olduğunuz 14.08.2023 tarihli dilekçeniz 18.08.2023 tarih ve 08 sayılı Kurul toplantısında incelenmiş olup,

Dilekçenizde; başvuruda araştırmanızın isminin bazı kelimelerinin sehven unutulmuş olması nedeniyle, çalışmanızın başlığının *"Alzheimer Rat Modelinde Taurin Uygulamasının Bilişsel Fonksiyonlar, Apoptoz, MikroRNA-34a, İnflamasyon ve Oksidatif Stres Belirteçleri Üzerine Etkisi"* olarak değiştirilmesi ile ilgili talebinizin uygun bulunduğu oybirliği ile karar verilmiş olup, karara ilişkin imza listesi ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Mustafa ARSLAN
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :BS4FRME47Z

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/gazi-universitesi-ebys>



Emniyet Mahallesi Bandırma Caddesi No :6/1 06560 Yenimahalle/ANKARA
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/
Kep Adresi: gaziuniversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için :Nursel Güner
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:202 20 57



Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : Kayabaşı, Burak
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 02.07.1991, Çankaya
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 507 144 54 36
 e-mail : burakkayabasi@gazi.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Tıpta Uzmanlık	Gazi Üniversitesi/Tıp Fakültesi/Fizyoloji AD	2019-Devam ediyor
Lisans/	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi	2015
Lise	Milli Piyango Anadolu Lisesi	2009

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2019-...	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD	Arş. Gör. Dr.
2017-2018	Ankara Üni. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hast.	Arş. Gör. Dr.
2015	Çorum Laçın TSM	Tabip

SCI, SSCI ve AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayımlanan Makaleler

Evaluation of the relationship between plasma viscosity and selected menopausal symptoms using the Menopause Rating Scale. Korkmaz H., Arslanca T., Tekin E., Kayabasi B., Akbulut K.G. Menopause (NewYork,N.Y.), cilt.29, sa.00, ss.1071-1076,2022 (SCI-Expanded)

Hakemli Kongre/Sempozyum Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar

- I. Taurin, intraserebroventriküler Aβ1-42 enjeksiyonu ile deneysel Alzheimer benzeri hastalık modeli oluşturulan sıçanlarda, öğrenme ve bellek fonksiyonlarındaki bozulmayı hafifletir. Kayabasi B., Aslan Karakelle N., Dincer S. 21.Ulusal Sinirbilim Kongresi , Bolu, Türkiye, 8 -11 Haziran 2023, ss.120
- II . Döküntüden Meningoensefalite Herpes Virüs: Bir Olgu Sunumu. Bicer B.B., Taskin E.C., Kayabasi B., Akbag S., Ozturk M., Ates O., Ozdemir H., Kendirli T., Ciftci E., Ince E. 54.Türk Pediatri Kongresi, Girne, Kıbrıs (KKTC), 6 -09Mayıs2018, cilt.53, ss.386-387

- III. Suçiçeği Enfeksiyonu Sonrası Gelişen Sakroiliak Eklem Osteomyeliti. Erat T., Yahsi A., Ozturk M., Kayabasi B., Ozdemir H., Fitöz O.S., Ciftci E., Ince E. 11.ULUSAL ÇOCUK ENFEKSİYON HASTALIKLARI KONGRESİ, Antalya, Türkiye, 4 -08 Nisan 2018, sa.424, ss.69
- IV. Suçiçeği Enfeksiyonu Sonrası Gelişen Akut Serebellar Ataksi Seyrinde Ortaya Çıkan İlerleyici Ensefalit. Erat T., Yahsi A., Kayabasi B., Oztürk M., Ozdemir H., Teber S., Fitoz O.S., Ciftci E., InceE. 11.ULUSAL ÇOCUK ENFEKSİYON HASTALIKLARI KONGRESİ, Antalya, Türkiye, 4 -08 Nisan 2018, ss.69-70

Sertifika, Kurs ve Eğitimler

- Nörolojik Hastalıkların Deneysel Hayvan Modelleri Kursu, TÜBİTAK, 2023
- Kognitif Sinirbilim Araştırmalarında EEG Sinyal Analizi, Ulusal Sinirbilim Kongresi, Bolu, 2023
- Nöro-Görüntüleme Kursu, Ulusal Sinirbilim Kongresi, Bolu, 2023
- 8th International Brain Research School, Süleyman Demirel Üniversitesi-BSN Sağlık Analiz Org.Ltd Şti., 2023
- Applied Molecular Biology Methods Training, Diagen, 2022
- ELISA Tests Technique Theoretical and Laboratory Applications Practical Training, Diagen, 2022
- Animal Models of Neurodegenerative Diseases, EgeBingss2022 TÜBAS,2022
- Ex-Ovo Tavuk Embriyosu Kültürü Uygulamalı Eğitimi, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi-ACT Biyoteknoloji ve Danışmanlık,2022
- Hücre Kültürü ve Temel Moleküler Biyoloji Teknikleri Kursu, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi-ACT Biyoteknoloji ve Danışmanlık, 2022
- Sağlık Bilimlerinde Bilimsel Ar-Ge Projesi (TÜBİTAK-ARDEB) Yazma Uygulamalı Eğitimi ,TÜBİTAK,2021
- Tıp Fakültesi Lisansüstü Öğrencilerine Yönelik Laboratuvar Hayvanlarında İleri Düzey Deneysel Araştırmalar Kursu , TÜBİTAK, 2021
- Sağlık Bilimleri Alanında Araştırma Projesi Hazırlama ve Yürütme Eğitimi, TÜBİTAK, 2020
- 24. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Programı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
- Tıpta İletişim Becerileri Temel Eğitimi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2019

Yabancı Dil

İngilizce, Almanca



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..