



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**GLUKO-LİPOTOKSİSİTE İLE İNDÜKLENMİŞ,
AMİLOİD- β ARACILI NÖRODEJENERASYONDA
ENDOKANNABİNOİD SİSTEMİN ROLÜNÜN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

ZÜBEYİR ELMAZOĞLU

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

MART 2020



**GLUKO-LİPOTOKSİSİTE İLE İNDÜKLENMİŞ, AMİLOİD- β ARACILI
NÖRODEJENERASYONDA ENDOKANNABİNOİD SİSTEMİN ROLÜNÜN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Zübeyir ELMAZOĞLU

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Mart 2020

Zübeyir ELMAZOĞLU tarafından hazırlanan "GLUKO-LİPOTOKSİSİTE İLE İNDÜKLENMİŞ, AMİLOİD- β ARACILI NÖRODEJENERASYONDA ENDOKANNABİNOİD SİSTEMİN ROLÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüriler tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Çimen KARASU

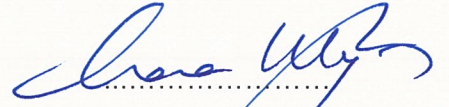
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi



Başkan : Prof. Dr. Canan ULUOĞLU

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

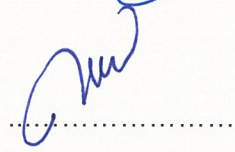
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Nuray ARI

Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Emine Pelin KELİCEN UĞUR

Farmakoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

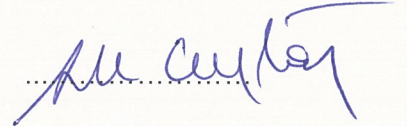
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Aslı Fahriye CEYLAN IŞIK

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Doç. Dr. Ergin DİLEKÖZ

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Tez Savunma Tarihi: 09/03/2020

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

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



Zübeyir ELMAZOĞLU

09.03.2020

GLUKO-LİPOTOKSİSİTE İLE İNDÜKLENMİŞ, AMİLOİD- β -ARACILI
NÖRODEJENERASYONDA ENDOKANNABİNOİD SİSTEMİN ROLÜNÜN
DEĞERLENDİRİLMESİ
(Doktora Tezi)

Zübeyir ELMAZOĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Mart 2020

ÖZET

Alzheimer hastalığı (AH) çok yönlü nörodejeneratif bir bozukluk olup, çoğunlukla nörofibriler yumak ve senil plakların eşlik ettiği beyin hasarı ile karakterizedir. Yapılan çalışmalar hipergliseminin oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, inflamasyon ve eksitotoksitenin AH'nın başlaması ve ilerlemesine aracılık ettiğini göstermiştir. Günümüzdeki tedavi rejimleri, AH'da görev alan çoklu mekanizmaları baskılayamamaktadır. Endokannabinoid sistem, nöronal plastisite, nöroinflamasyon, nörodejenerasyon, sirkadyan ritim ve redoks homeostazı gibi birçok fizyolojik süreçte görev almaktadır ve AH patogenezeine karşı etkili olabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında endokannabinoid araşidoniletanolamid (AEA) ve 2-araşidonilgliserol (2-AG), sentetik kannabinoid CP 55940 ve WIN 55,212-2 ve yağ asidi amid hidrolaz (FAAH) enzim inhibitörü URB 597 bileşiklerinin, primer hipokampal nöronlarında hiperglisemi ve oligomerik amiloid beta peptid ($A\beta$ 1-42) ile oluşturulan nörotoksik modeldeki nöroprotektif özellikleri araştırılmıştır. Bu amaçla, hücreler artan konsantrasyonlarda (1 nM- 1 μ M) kannabinomimetiklerle 6 saat boyunca muamele edildikten sonra 150 mM GLU (24 saat) ve takiben 500 nM $A\beta$ 1-42 (24 saat) ile inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı, hücre içi reaktif oksijen türevleri (ROS), $A\beta$ düzeyleri, mitokondri membran potansiyeli ($\Delta\Psi$ m), antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, CAT, GPx, GRx), oksidatif-nitrozatif stres son ürünleri (AGE, HNE ve 3-NT), inflamatuvar belirteçler (iNOS, IL-1 β ve TNF- α) ve antioksidan (p-Nrf2), nörogenez (p-CREB) ve metabolik (p-GSK3 β) proteinlerin düzeyleri ölçülmüştür. Kannabinomimetikler $A\beta$ seviyelerini, oksidatif-nitrozatif stres son ürünlerini ve inflamatuvar belirteçlerin düzeylerini azaltırken, hücre canlılığını, $\Delta\Psi$ m ve antioksidan enzim aktivitelerini artırmakta, ayrıca p-GSK3 β , p-Nrf2 ve p-CREB protein düzeylerinde artış meydana getirmektedirler. Bulgularımız, kannabinoid türevlerinin antioksidan, anti-inflamatuvar ve nöroprotektif etkilerinden dolayı hipergliseminin eşlik ettiği AH'da potansiyel terapötik ajanlar olabileceğini göstermiştir.

Bilim Kodu : 1018.2

Anahtar Kelimeler : Alzheimer hastalığı, Hiperglisemi, Amiloid beta peptid, Endokannabinoid, Nöroprotektif etki

Sayfa Adedi : 142

Danışman : Prof. Dr. Çimen KARASU

EVALUATION THE ROLE OF ENDOCANNABINOID SYSTEM IN GLUCO-LIPOTOXICITY INDUCED, AMYLOID- β MEDIATED NEURODEGENERATION

(Ph. D. Thesis)

Zubeyir ELMAZOGLU

GAZI UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

March 2020

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a multifactorial neurodegenerative disorder linked to various mechanisms converging to damage the brain. Senile plaques and neurofibrillary tangles are commonly found in the brains of AD patients. Several studies suggest that hyperglycemia renders oxidative stress, mitochondrial toxicity, inflammation and excitotoxicity, playing all important roles in the onset and progression of AD. Current treatment regimens are unable to counteract the multiple mechanisms involved in AD. The endocannabinoid system (ECS) has been shown to orchestrate several physiological responses such as neuronal plasticity, neuroprotection, anti-inflammatory events, circadian rhythm, redox homeostasis. The multi-targeted effectiveness of the ECS emerges as a potential approach to treat AD. Therefore, herein we investigated the neuroprotective properties of the endocannabinoids arachidonylethanolamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), the synthetic cannabinoids CP 55-940 and WIN 55,212-2, and the fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitor URB597, on a combined hyperglycemia HG+oligomeric amyloid β peptide ($A\beta$ 1-42) neurotoxic model in primary hippocampal neurons. For the experiments, cells were treated with the cannabinoid agents at growing concentrations (1 nM to 1 μ M) for 6 h, and then co-treated with 150 mM GLU (24 h), followed by incubation with 500 nM $A\beta$ 1-42 (24 h). Cell viability/survival, intracellular levels of reactive oxygen species (ROS), $A\beta$ mitochondria membrane potential ($\Delta\Psi_m$), antioxidant enzyme (SOD, CAT, GPx and GRx) activities, biological products of oxidative-nitrosative stress (AGE and HNE adducts and 3-NT), and endpoints of inflammatory responses (iNOS, IL-1 β and TNF- α) and antioxidant (p-Nrf2), neurogenetic (p-CREB) and metabolic (p-GSK3 β) protein levels were all quantified. Cannabinomimetics were able to reduce oxidative-nitrosative endpoints and inflammatory markers in a differential manner and promote cell viability, $\Delta\Psi_m$, antioxidant enzyme capacity. Moreover, p-Nrf2, p-CREB and p-GSK3 β protein levels were increased by cannabinomimetics. According to our findings, cannabinoidomimetics can be considered as potential therapeutic agents against AD concomitant with hyperglycemia due to their antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects.

Science Code : 1018.2

Key Words : Alzheimer's disease; Hyperglycemia; Amyloid beta peptide, Endocannabinoid, Neuroprotection

Page Number : 142

Advisor : Prof. Dr. Cimen KARASU

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimi ve tez çalışmalarım süresince düşünce aşamasından yazım aşamasına kadar geçen süreç içerisinde gerek bilgi birikimi gerekse yapıcı düşünceleri ile bana anlayışla desteklerini esirgemeyen ve küçük düşünmek yerine daha büyük düşünmemi sağlayan, sevgi ve hoşgörüsü ile daima yanımda olan, özellikle bilimsel projelerin hazırlanmasından tamamlanmasına kadar geçen süreçlerde aktif rol almamı sağlayan değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Çimen KARASU'ya yapmış olduğu bütün yardımlarından ve bana olan güveninden dolayı teşekkür ederim. Ayrıca Prof. Dr. Cimen KARASU'nun yürütücülüğünde, bursiyeri olduğum TÜBİTAK-CONACYT (Meksika), 315S088 kodlu proje kapsamında yapılan çalışmaların bir çıktısı olan bu tezimde desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a ve proje ekibimizin ana araştırmacısı olan Prof. Dr. Emine Pelin KELİCEN UĞUR'a, Meksika ortaklarımız olan Prof. Dr. Abel SANTAMARIA'ya, Dr. Edgar Rangel-LOPEZ'e ve ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Doktora programı kapsamında değerli bilgi ve birikimlerini esirgmeden paylaşıp, eğitim-öğretim hayatıma katkı sağlayan anabilim dalımız öğretim üyelerine çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimi süresince sorunlara nasıl yaklaşmam gerektiğini ve çözüm yolları ararken alternatif bakış açısı getirmemi sağlayan Prof. Dr. Aslı CEYLAN-IŞIK'a, tezimi çalışmalarımda aydınlatıcı fikirleri ile bana yardımcı olan, özellikle hücre kültürü ve modelleme çalışmalarına ışık tutan Dr. Volkan ERGİN'e, ayrıca eleştirel ve öğretici yaklaşımlarıyla deneysel aşamalarda destek olan Doç. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM ve laboratuvarında yardımlarını esirgemeyen Dr. Zehra AYDIN BEK'e teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarım süresince geç saatlere kadar yanımda olan ve beni değerli hissettiren, güzel insan Uzm. Bio. Özüm ATLİTÜRK'e, ayrıca beni sabırla destekleyip motive eden ev arkadaşlarım Dt. Altuğ ÖZBEYCAN ve Ar. Gör. Osman KARAMAN'a teşekkür ederim.

Asla yerleri doldurulamayacak olan, akademik kariyer hayallerimin peşinden yorulmadan koşturamı sağlayan, ben mutlu oldukça mutlu olan o değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa	
iv	ÖZET
v	ABSTRACT
vi	TEŞEKKÜR
vii	İÇİNDEKİLER
xi	ÇİZELGELERİN LİSTESİ
xii	ŞEKİLLERİN LİSTESİ
xvi	RESİMLERİN LİSTESİ
xv	SİMGELER VE KISALTMALAR
1	1. GİRİŞ
5	2. GENEL BİLGİLER
5	2.1. Alzheimer Hastalığı
7	2.2. . Alzheimer Hastalığının Oluşum Hipotezleri.....
7	2.2.1. Kolinerjik disfonksiyon hipotezi
7	2.2.2. Amiloid-β hipotezi
10	2.2.3. Tau hipotezi.....
11	2.2.4. Kalsiyum homeostazı ve eksitotoksisite hipotezi
13	2.2.5. Nörovasküler disfonksiyon hipotezi.....
14	2.2.6. Nöroinflamasyon hipotezi.....
15	2.2.7. Mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres hipotezi.....
18	2.2.8. Glukoz hipometabolizması hipotezi
19	2.2.9. Metal iyon hipotezi
20	2.2.10. Lenfatik sistem hipotezi.....

	Sayfa
2.3. Alzheimer Hastalığına Semptomatik Tedavi Yaklaşımı	20
2.4. Alzheimer hastalığını Modifiye Edici Tedavi Yaklaşımı	21
2.5. Alzheimer hastalığı (AH) ve Diabetes Mellitus (DM) ilişkisi	25
2.6. Endokannabinoid Sistem	27
2.7. Alzheimer Hastalığı (AH) ve Endokannabinoid Sistem (EKS) ilişkisi...	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Kullanılan Makine ve Teçhizatlar	37
3.2. Kullanılan Kit, Kimyasal ve Sarf Malzemeler	37
3.3. Yöntemler	38
3.3.1. Hipokampus dokusu izolasyonu ve primer hipokampal nöron kültürü	38
3.3.2. Deneysel gluko-lipotoksisite ve Alzheimer hastalığı (AH) modelinin oluşturulması.....	40
3.3.3. Hücre canlılığı analizi	41
3.3.4. Eş zamanlı hücre analizörü ile hücre impedansının ölçülmesi (RTCA iCELLigence)	42
3.3.5. Glukotoksisite modeli oluşturulmuş primer hipokampal nöron hücrelerine oligomerik A β 1-42 plaklarının uygulanması	43
3.3.6. Primer hipokampal nöron hücrelerinde hücre içi reaktif oksijen türevleri (ROS) düzeylerinin belirlenmesi	44
3.3.7. Thioflavin T (ThT) boyama yöntemi ile oligomerik amiloid-beta agregatlarının gösterilmesi.....	44
3.3.8. Primer hipokampal nöron hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli ölçümü ($\Delta\Psi_m$)	45
3.3.9. Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) ve Western Blot (WB) analizleri için hücrelerden protein izolasyonu	45

Sayfa

3.3.10. İntresik antioksidan enzim aktivitesi (SOD, CAT, GPx ve GRx), oksidatif- nitrozatif stres ileri son ürünleri (AGE, HNE, 3-NT) ve inflamatuvar belirteçlerin (iNOS, IL-1 β ve TNF- α) düzeylerinin ELISA yöntemi ile	46
3.3.11. Western blot analizi	47
3.3.12. İstatistiksel analiz	48
4. BULGULAR.....	49
4.1. Hipokampus Dokusu İzolasyonu ve Primer Hipokampal Nöron Kültürü	49
4.2. Primer Hipokampal Nöron Hücre Kültürlerinde Endokannabinoidler ve Sentetik Kannabinomimetiklerin Sitotoksisite Analizleri	50
4.3. Primer Hipokampal Nöron Hücre Kültürlerinde Glukotoksisite Modelinin Oluşturulması ve Kannabinomimetiklerin Bu Modeldeki Etkileri	53
4.4. Primer Hipokampal Nöron Hücre Kültürlerinde Lipotoksisite Modelinin Oluşturulması ve Kannabinomimetiklerin Bu Modeldeki Etkileri.....	56
4.5. Primer Hipokampal Nöron Hücre Kültürlerinde Glukolipotoksisite Modelinin Oluşturulması ve Kannabinomimetiklerin Bu Modeldeki Etkileri	59
4.6. Primer Hipokampal Nöron Hücre Kültürlerinde Oligomerik Amiloid Beta (A β 1-42) ile Alzheimer Hastalığı (AH) Modelinin Oluşturulması ve Kannabinomimetiklerin Bu Modeldeki Etkileri.....	61
4.7. Glukotoksisite Modeli Oluşturulmuş Primer Hipokampal Nöron Hücrelerine Oligomerik A β 1-42 Plaklarının Uygulanması: <i>in vitro</i> Diyabetik Alzheimer Hastalığı (DM-AH) Modeli.....	62
4.8. <i>In vitro</i> Diyabetik Alzheimer Hastalığı (DM-AH) Modelinde Kannabinomimetiklerin Toksisite Analizleri.....	67
4.9. <i>In vitro</i> Diyabetik Alzheimer Hastalığı (DM-AH) Modelinde Kannabinomimetiklerin Amiloid Beta Düzeyleri Üzerine Olan Etkisi.....	68
4.10. <i>In vitro</i> Diyabetik Alzheimer Hastalığı (DM-AH) Modelinde Kannabinomimetiklerin Mitokondri Membran Potansiyeline($\Delta\Psi$ M) Etkileri.....	71

Sayfa

4.11. <i>İn vitro</i> Diyabetik Alzheimer Hastalığı (DM-AH) Modelinin Antioksidan (SOD, KAT, GPx, GRx), Oksidatif/Nitrozatif Stres (AGE, HNE, 3-NT) ve İnflamasyon (iNOS, IL- β , Tnf- α) Parametreler ile Karakterizasyonu .	73
4.12. <i>İn Vitro</i> Diyabetik Alzheimer Hastalığı (DM-AH) Modelinde Kannabinomimetiklerin İntrinsik Antioksidan Enzim Aktiviteleri (SOD, KAT, GPx, GRx) Üzerine Olan Etkileri	74
4.13. <i>İn vitro</i> Diyabetik Alzheimer Hastalığı (DM-AH) Modelinde Kannabinomimetiklerin Oksidatif-Nitrozatif Stres İleri Son Ürünleri (AGE, HNE, 3-NT) Üzerine Olan Etkileri	76
4.14. <i>İn vitro</i> Diyabetik Alzheimer Hastalığı (DM-AH) Modelinde Kannabinomimetiklerin İnflamatuvar Belirteçler (iNOS, IL-1 β , TNF- α) Üzerine Olan Etkileri.....	79
4.15. <i>İn vitro</i> Diyabetik Alzheimer Hastalığı (DM-AH) Modelinde Kannabinomimetiklerin p-Nrf-2, p-CREB ve p-GSK 3 β Protein Düzeyleri Üzerine Olan Etkileri.....	81
5. TARTIŞMA.....	83
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	93
KAYNAKLAR	95
EKLER.....	127
EK-1. DM-AH modelinde intrinsik antioksidan enzim aktiviteleri.....	128
EK-2. DM-AH modelinde oksidatif/nitrozatif stres ileri son ürünlerinin düzeyleri	129
EK-3. DM-AH modelinde inflamatuvar belirteçlerin düzeyleri	130
EK-4. Deney hayvanları etik kurul onay belgesi	131
ÖZGEÇMİŞ.....	133

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Klinik Faz 3 çalışmalarında A β ve tau'yu hedef alan ajanlar	22
Çizelge 4.2. AH'da klinik Faz 3 çalışmalarında yer alan ve A β dışı hedeflere özgü ajanlar	23

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. Primer hipokampal nöron hücrelerine artan konsantrasyonlarda (1 nM- 25 µM) AEA (A) veya 2-AG (B) uygulanmasının hücre canlılığı (MTT, NRU) üzerine olan etkisi. NRU: Nötral kırmızısı alımı; AEA: Anandamid; 2-AG: 2-araşidonigliserol. Kontrol: % 0.02 DMSO çözeltisi uygulanmış hücreler (n=6). *p<0,05, kontrol grubuna göre (Tek-yönlü ANOVA post hoc Tukey testi)	51
Şekil 4.2. Primer hipokampal nöron hücrelerine artan konsantrasyonlarda (1 nM- 25 µM) URB-597 (A) veya CP55-940 (B) veya WIN 55,212-2 (C) uygulanmasının hücre canlılığı (MTT, NRU) üzerine olan etkisi. NRU: Nötral kırmızısı alımı; AEA: Anandamid; 2-AG: 2-araşidonigliserol. Kontrol: % 0.02 DMSO çözeltisi uygulanmış hücreler.(n=6). *p<0,05, kontrol grubuna göre (Tek-yönlü ANOVA post hoc Tukey testi).....	52
Şekil 4.3. Primer hipokampal nöron hücrelerine 24 veya 48 saat süreyle artan konsantrasyonlarda D-glukoz (GLU, 25-150 mM) uygulanmasının hücre canlılığı/sağkalımı üzerine olan etkisi. Kontrol: % 0.1 PBS çözeltisi uygulanmış hücreler (n=6). *p<0,05, kontrol grubuna göre (Tek-yönlü ANOVA post hoc Dunnett's testi).....	53
Şekil 4.4. Artan glukoz konsantrasyonuna (25-150 mM) bağlı olarak primer hipokampal nöron hücrelerinin adezyon/proliferasyon profillerinin zamana göre değişimi (n=3). Kontrol: %0.1 PBS uygulanmış hücreler. GLU: D-Glukoz	54
Şekil 4.5. Primer hipokampal nöron hücrelerine anandamid (AEA), 2-araşidonigliserol (2-AG), URB-597, CP 55-940, WIN 55,212-2 (1 nM- 1 µM) tek başına 54 saat (A) veya 6 saat inkübe edildikten sonra ortama 150 mM glukoz (GLU) uygulanarak ilave 48 saat inkübasyon işlemleri sonucunda hücre canlılığında meydana gelen değişim (B). (n=6).*p < 0.05, kontrol grubuna göre; +p < 0.05, GLU grubuna göre (Tek-yönlü ANOVA post hoc Holm Sidak testi).....	55
Şekil 4.6. Primer hipokampal hücrelerde 24 ve 48 saat PAM/BSA uygulanmasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi. PAM: palmitik asit, BSA: sığır serum albumini. (n=6). *p < 0.05; **p < 0.01; ffp < 0.001, 0.150 mM BSA verilmiş kontrol (Tek-yönlü ANOVA post hoc Dunnett's testi)	56
Şekil 4.7. Artan PAM konsantrasyonuna (0.075-0.150 mM) bağlı olarak primer hipokampal nöron hücrelerinin adezyon/proliferasyon profillerinin zamana göre değişimi (n=2). Kontrol: 0.150 mM BSA taşıyıcısı uygulanmış hücreler. PAM: Palmitik asit; BSA: Sığır serum albumini..	57

Şekil**Sayfa**

- Şekil 4.8. Primer hipokampal nöron hücreleri, anandamid (AEA), araşidonilgliserol (2-AG), URB-597, CP 55-940, WIN 55,212-2 (1 nM- 1 μ M) ile 50 saat (6+44 saat) inkübe edildikten sonra ortama 0.15 mM palmitik asit (PAM/BSA) uygulanarak ilave 4 saat inkübasyon işlemleri sonucunda hücre canlılığında meydana gelen değişim (n=6). **p < 0.01, 0.15 mM BSA uygulanmış kontrol grubuna göre; +p < 0.05, ++p < 0.01, 0.15 mM PAM/BSA (1:1) grubuna göre (Tek-yönlü ANOVA post hoc Holm Sidak testi) 58
- Şekil 4.9. Primer hipokampal nöron hücrelerine PAM/BSA (4 saat) veya GLU (48 saat) veya önce GLU (44 saat) ve ardından ortamda GLU varken PAM/BSA (4 saat) uygulanmasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi. PAM: palmitik asit/BSA, 0.150 mM; BSA: sığır serum albumini, 0.150 mM; GLU; D-glukoz, 150 mM (n=6). *p < 0.05; **p < 0.01, çözücü verilmiş kontrol grubuna göre (Tek-yönlü ANOVA post hoc Dunnett's testi) 59
- Şekil 4.10. Primer hipokampal hücreler anandamid (AEA), 2-Araşidonilgliserol (2-AG), URB-597, CP 55,940, WIN 55,212-2 (1 nM- 1 μ M) ile 6 saat inkübe edildikten sonra ortama 44 saat 150 mM glukoz (GLU) uygulanıp ardından 0.15 mM palmitik asit (PAM/BSA) ilave edilerek 4 saat inkübasyon işlemleri sonucunda hücre canlılığında meydana gelen değişim (n=5-6). *p<0,05, kontrol grubuna göre; +p < 0.05, GLU+PAM/BSA (1:1) grubuna göre (Tek-yönlü ANOVA post hoc Holm Sidak testi)..... 60
- Şekil 4.11. Primer hipokampal hücreler artan konsantrasyonlarda (10 nM-4 μ M) oligomerik A β 1-42 ile 24 saat (A) veya anandamid (AEA), 2-Araşidonilgliserol (2-AG), URB-597, CP 55-940, WIN 55,212-2 (1 nM- 1 μ M) ile 30 saat (6+24) inkübe edildikten sonra ortama 500 nM A β 1-42 uygulanıp, 24 saat daha inkübe edilmesi sonucunda hücre canlılığında meydana gelen değişim (n=6). *p < 0.05, **p < 0.01, kontrol grubuna göre; +p < 0.05, A β 1-42 grubuna göre (Tek-yönlü ANOVA..... 62
- Şekil 4.12. Primer hipokampal hücreler 150 mM glukoz (GLU) ile 24 saat inkübe edildikten sonra, glukoz varlığında A β 1-42 plaklarının (10 nM- 8 μ M) 24 saat uygulanması sonucunda hücre canlılığında meydana gelen değişim (n=6). *p < 0.05, **p < 0.01, β p < 0.001, kontrol grubuna göre; +p < 0.05, ++p < 0.01, GLU grubuna göre (Tek yönlü ANOVA post hoc Holm sidak test)..... 63
- Şekil 4.13. Primer hipokampal nöron hücrelerine 150 mM glukozun (48 saat) ve 500 nM A β 1-42 plaklarının (24 saat) veya HG+ A β 1-42 (24+24 saat) uygulanması ile hücre canlılığı (A) ve hücre içi ROS düzeylerinde (B) meydana gelen değişim. GLU; D-glukoz, 150 mM (n=5). *p < 0.05, **p < 0.01, çözücü verilmiş kontrol grubuna göre; ^ap < 0.05, ^bp < 0.01, ^cp < 0.001, H2O2 pozitif standart grubuna 66

Şekil**Sayfa**

- Şekil 4.14. Primer hipokampal nöron hücrelerine artan konsantrasyonlarda (1 nM- 1 μ M, 6 saat) anandamid (AEA), 2-araşidonilgliserol (2-AG), URB-597, CP 55-940, WIN 55,212-2 bileşiklerinin HG (150 mM GLU, 24 saat) + A β 1-42 (500 nM, 24 saat) modeline uygulanması ile hücre canlılığı (A) ve hücre içi ROS düzeylerinde (B) meydana gelen değişim. GLU; D-glukoz, 150 mM (n=5-6). *p < 0.05, **p < 0.01, çözücü verilmiş kontrol grubuna göre; +p<0,05, ++p<0,01, HG+ A β 1-42 grubuna göre; cp < 0.001, H2O2 pozitif standart grubuna göre (Tek-yönlü ANOVA post hoc Holm Sidak testi) 68
- Şekil 4.15. DM-AH modeli (A) ve bu modelde kannabinomimetiklerin (10nM-1 μ M) uygulanması (B) sonucu A β 1-42 plaklarının non-nükleer yerleşim yüzdeleri. LG: 25 mM glukoz; HG: 150 mM glukoz (n=4). *p < 0.05, **p < 0.01, $\wp$ p < 0.001, çözücü verilmiş kontrol grubuna göre; +p<0,05, ++p<0,01, $\wp$ p<0,001, HG+ A β 1-42 grubuna göre;(Kruskal Wallis post hoc Dunn's testi) 70
- Şekil 4.16. DM-AH modeli (A) ve bu modelde kannabinomimetiklerin (10nM-1 μ M) uygulanması (B) sonucu A β 1-42 plaklarının bağıl nükleer yerleşim yüzdeleri. LG: 25 mM glukoz; HG: 150 mM glukoz (n=4). *p < 0.05, **p < 0.01, $\wp$ p < 0.001, çözücü verilmiş kontrol grubuna göre; +p<0,05, ++p<0,01, $\wp$ p<0,001, HG+ A β 1-42 grubuna göre (Kruskal Wallis post hoc Dunn's testi) 71
- Şekil 4.17. DM-AH modeli (A) ve bu modelde kannabinomimetiklerin (10nM-1 μ M) uygulanması (B) sonucu mitokondri membran potansiyelinde meydana gelen değişim. LG: 25 mM glukoz; HG: 150 mM glukoz (n=4). *p < 0.05, **p < 0.01, $\wp$ p < 0.001, çözücü verilmiş kontrol grubuna göre; +p<0,05, ++p<0,01, $\wp$ p<0,001, HG+ A β 1-42 grubuna göre (Kruskal Wallis post hoc Dunn's testi) 73
- Şekil 4.18. Artan konsantrasyonlarda (10 nM- 1 μ M, 6 saat) anandamid (AEA), 2-araşidonilgliserol (2-AG), URB-597, CP 55-940, WIN 55,212-2 bileşiklerinin DM-AH modeline uygulanması ile süperoksit dismutaz (SOD) (A) ve katalaz (KAT) (B) aktivitesinde meydana gelen değişim (n=2). +p<0,05, ++p<0,01, $\wp$ p<0,001, HG+ A β 1-42 grubuna göre (Kruskal Wallis post hoc Dunn's testi) 75
- Şekil 4.19. Artan konsantrasyonlarda (10 nM- 1 μ M, 6 saat) anandamid (AEA), 2-araşidonilgliserol (2-AG), URB-597, CP 55,940, WIN 55,212-2 bileşiklerinin DM-AH modeline uygulanması ile glutatyon peroksidaz (GPx) (A) ve Glutatyon redüktaz (GRx) (B) aktivitesinde meydana gelen değişim (n=2). +p<0,05, ++p<0,01, $\wp$ p<0,001, GLU+A β 1-42 grubuna göre (Kruskal Wallis post hoc Dunn's testi) 76

Şekil**Sayfa**

- Şekil 4.20. Artan konsantrasyonlarda (10 nM- 1 µM, 6 saat) anandamid (AEA), 2-araşidonilgliserol (2-AG), URB-597, CP 55-940, WIN 55,212-2 bileşiklerinin DM-AH modeline uygulanması ile AGE (A), HNE (B) 3-NT (C) aktivitesinde meydana gelen değişim (n=2). **p < 0.01, fp < 0.001, çözücü verilmiş kontrol grubuna göre; +p<0,05, ++p<0,01, fp<0,001, GLU+Aβ1-42 grubuna göre (Kruskal Wallis post hoc Dunn's testi) 78
- Şekil 4.21. Artan konsantrasyonlarda (10 nM- 1 µM, 6 saat) anandamid (AEA), 2-araşidonilgliserol (2-AG), URB-597, CP 55-940, WIN 55,212-2 bileşiklerinin DM-AH modeline uygulanması ile indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) (A), interlekin 1β (IL-1β) (B) tümör nekrosis faktör α (Tnf- α) (C) aktivitesinde meydana gelen değişim (n=2). **p < 0.01, fp < 0.001, çözücü verilmiş kontrol grubuna göre; +p<0,05, ++p<0,01, fp<0,001, GLU+Aβ1-42 grubuna göre (Kruskal Wallis post hoc Dunn's testi) 80
- Şekil 4.22. DM-AH modelinde (A), p-Nrf2 (B), p-CREB (C), p-GSK3β (D) proteinlerinin dansitometrik analizi. K: Kontrol; LG: 25 mM glukoz; HG: 150 mM glukoz (n=3). *p < 0.05, **p < 0.01, fp < 0.001, çözücü verilmiş kontrol grubuna göre; +p<0,05, ++p<0,01, fp<0,001, HG+Aβ grubuna göre (Kruskal Wallis post hoc Dunn's testi)..... 82

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Amiloid prekürsör proteinin (APP) α veya β -sekretaz enzimiyle kesilmesi	8
Resim 2.2. Tau proteinlerinin hiperfosforilasyonu ile mikrotübüllerin depolimerize olarak nörofibriler yumakların oluşumu	10
Resim 2.3. AH patofizyolojisinde oksidatif stres, mitokondrial disfonksiyon, makromolekül oksidasyonu, hücre içi ROS oluşumu, metal iyon dengesinin bozularak A β plaklarının oluşumu, Tau hiperfosforilasyonu ve A β sentezine aracılık etmektedir. NMDAR ve fyn kinaz aktivasyonu ile dendrik ve sinaptik ve buna bağlı LTP'nin baskılanması ile kognitif disfonksiyon görülmektedir. (ROS: reaktif oksijen türevleri; A β : amiloid beta; AGE:ileri glikasyon son ürünleri, RAGE: reseptör AGE, NMDAR: N-metil-D-aspartat reseptörü, LTP: Uzun süreli potensiyelizasyon).....	18
Resim 2.4. DM ve AH patogenezi ile ilişkilendirilen mekanizmalar	27
Resim 2.5. Endokannabinoidlerin sentez ve hidroliz şeması.....	29
Resim 2.6. Endokannabinoid sisteminsinaptik iletimdeki rolü	30
Resim 2.7. Endokannabinoid sistem ve AH ilişkinin moleküler mekanizması .	32
Resim 2.8. Endokannabinoidlerin AH patogenezindeki protektif rolü.....	33
Resim 3.1. Hipokampus dokusunun elde edilmesi amacıyla, gebe sıçana açılan insizyon ile ovaryektomi yapılması ve alınan E18-E19 sıçanların hafif anestezi altında servikal dislokasyon sonucu beyin dokusunun izolasyonu	39
Resim 4.1. Primer hipokampal nöron hücrelerin farklılaşma süreci; 0. saat (A), 2. gün (B), 3 gün (C), 5. gün (D), 8. gün (E), 15. gün (F). (Ölçek: 200 μ m)	50
Resim 4.2. Primer hipokampal hücreler 25 mM (A) veya 150 mM (B) glukoz (GLU) ile 48 saat veya 150 mM GLU ile 24 saat inkübe edildikten sonra, GLU varlığında A β ₁₋₄₂ plaklarının 500 nM (C), 1 μ M (D), 2 μ M (E), 4 μ M (F) 24 saat uygulanması sonucunda hücre morfolojilerinde meydana gelen değişim (Ölçek: 100 μ m)	65
Resim 4.3. DM-AH modelinde kannabinomimetiklerin farklı konsantrasyonlarda (10nM- 1 μ M) uygulanması sonucu A β ₁₋₄₂ plak seviyeleri ve hücre içi lokalizasyonu. (Yeşil: A β ₁₋₄₂ , Thioflavin-T; mavi: çekirdek, Hoechst 33342) (Ölçek: 100 μ m)	69

Resim**Sayfa**

- Resim 4.4. DM-AH modelinde kannabinomimetiklerin farklı konsantrasyonlarda (10nM- 1µM) uygulanması sonucu mitokondri membran potansiyelinde meydana gelen değişim. (Kırmızı: JC-1 agregat, sağlıklı hücreler; Yeşil: JC-1 monomer, apoptotik/ nekrotik hücreler) (Ölçek: 100 µm)..... 72
- Resim 4.5. DM-AH modelinde artan konsantrasyonlarda (10 nM- 1 µM, 6 saat) anandamid (AEA), 2-araşidonilgliserol (2-AG), URB-597, CP 55-940, WIN 55,212-2 bileşiklerinin DM-AH modeline uygulanması izole edilen p-Nrf2, p-CREB, p-GSK3β protein bantları. K: Kontrol; LG: 25 mM glukoz; HG: 150 mM glukoz 81

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
°C	Santigrat derece
µL	Mikrolitre
µg	Mikrogram
M	Molar
µM	Mikromolar
nM	Nanomolar
nM	Nanometre
α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa
Δ	Delta
ψ	Mitokondri membran potansiyeli
Ca ⁺²	Kalsiyum
Zn ⁺²	Çinko
Fe ⁺²	Demir
Cu ⁺²	Bakır
kDa	Kilo dalton
mg	Miligram
rpm	Dakika başına dönme sayısı
sn	Saniye
V	Voltaj
%	Yüzde

Kısaltmalar**Açıklamalar**

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Aβ	Amiloid Beta
AEA	2-Araşidoniletanolamin
2-AG	2-Araşidonilgliserol
AGE	Advanced Glycation End Products (İleri Glikasyon Son Ürünleri)
AH	Alzheimer Hastalığı
AMPA	Aminohidroksimetilizoksazolpropiyonik Asit
ALE	Advanced Lipooxidation End Products (İleri Lipooksidasyon Son Ürünleri)
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amiloid Prekürsör Protein
APS	Amonyum Persülfat
ATP	Adenosine Triphosphate (Adenozin Trifosfat)
BACE	Beta-Site APP Cleaving Enzyme (β -sekretaz)
CAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate (Siklik Adenozin Monofosfat)
CAMK	Calcium Calmodulin Dependent Protein Kinase (Kalsiyum Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz)
CDK	Cyclin Dependent Kinase (Siklin Bağımlı Kinaz)
CREB	cAMP Response Element Binding Protein (CAMP Cevap Elementi Bağlayan Protein)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DM	Diabetes Mellitus
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EBAH	Erken-başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EKS	Endokannabinoid Sistem

Kısaltmalar**Açıklamalar**

ER	Endoplazmik Retikulum
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase (Hücre Dışı Sinyal İle Regüle Edilen Kinaz)
FAAH	Fatty Acid Amide Hydrolase (Yağ Asidi Amid Hidrolaz)
FBS	Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Serumu)
FDA	Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç Dairesi)
GBAH	Geç-başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
GPX	Glutasyon Peroksidaz
GSK3β	Glikojen Sentaz Kinaz 3 beta
GWAS	Genome Wide Association Study (Tüm Genom Sekans Analizi)
IGLUR	İyonotropik Glutamat Reseptörü
KBB	Kan Beyin Bariyeri
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LTP	Long-Term Potentiation (Uzun Süreli Potensiyalizasyon)
MAPK	Mitojen Aktive Protein Kinaz
MEK	Mitojen Ekstraselüler Regüle Kinaz
MRI	Magnetic Resonance Imaging (Manyetik Rezonans Görüntüleme)
MRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
MTOR	Mammalian Target of Rapamycin (Memeli Rapamisin Hedef Proteini)
MTT	Dimethylthiazoldiphenyltetrazolium bromid
NFL	Nörofilament Hafif Zincir
NFY	Nörofibriler Yumak
NMDAR	N-Metil-D- Aspartat Reseptörü
NNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz

Kısaltmalar**Açıklamalar**

NO	Nitrik Oksit
NP-40	Nonidet P-40
ODAH	Otozomal Dominant Alzheimer Hastalığı
PBS	Phosphate Buffer Salin (Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi)
PH	Parkinson Hastalığı
PDI	Phoshodisulfide Isomerase (Fosfodisulfit İzomeraz)
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase (Fosfoinositid-3-Kinaz)
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (Fosfotidilinositol 4,5-Bifosfat)
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphate (Fosfotidilinositol 3,4,5-Trifosfat)
PKA	Protein Kinaz A
PMSF	Fenilmetilsülfonilflorid
PSD-95	Post Synaptic Density Protein 95 (Post Sinaptik Yoğunluk Proteini 95)
PSEN	Presenilin
RNA	Ribonükleik Asit
RNAZ A	Ribonükleaz A
RSK	Ribozomal S6 Kinaz
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SOD	Süperoksit Dismutaz
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
THC	Tedrahidrokannabinol
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun yaşlanmasıyla giderek artan sıklıkta tanı konulan ve toplumsal sağlık sorunu haline gelen Alzheimer hastalığı (AH), ilerleyici hafıza kaybını takiben, kişilik ve davranış bozukluğu gibi nöropsikiyatrik bozuklukların eşlik ettiği nörodejeneratif bir hastalıktır [1]. AH dünya genelinde yaklaşık 24 milyon insanın doğrudan etkilendiği bir hastalık olması nedeniyle önemli bir sağlık problemi olarak sayılmaktadır [2]. AH'nın patogenezi kesin olarak aydınlatılamamış olsa da, ekstraselüler amiloid beta ($A\beta$) peptidlerinin birikmesi, tau hiperfosforilasyonuna bağlı olarak nörofibriler yumakların intraselüler yerleşimi, yaygın nöronal hücre kaybı, nöroinflamasyon ve oksidatif stres ile karakterize bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır [3, 4].

AH'nın tedavisinde Amerikan Besin ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmış dört ilaç bulunmaktadır. Bu ilaçların üçü kolinesteraz inhibitörleri (donezepil, rivastigmin ve galantamin) ve diğeri de yarışmasız NMDAR inhibitörü olan memantin'dir. Klinikte kullanılan bu ajanlar hastalığın progresyonunu baskılayarak, semptomatik etki gösterirken kognitif fonksiyonlarda radikal bir değişiklik meydana getirememektedir [5].

Son yıllarda yapılan çalışmalar, kronik hiperglisemi, hiperlipidemi, insulin rezistansı ve oksidatif stres gibi patofizyolojik komplikasyonlarla karakterize Diabetes mellitus (DM) olgularında, hipokampal nöronlarda ve kognitif fonksiyonlarda azalma meydana geldiği gösterilmiş [6, 7] ve DM'nin, AH'nın oluşumu veya progresyonunda bir risk faktörü olduğu sonucuna varılmıştır [8]. Ayrıca DM ve AH'nın patogeneplerinde oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, inflamasyon, hücre içi yüksek Ca^{2+} seviyeleri gibi birçok ortak yolağın bulunması iki hastalığın birbiriyle doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir [9]. DM-AH olgularında, hiperglisemiye bağlı olarak hücreesel redoks homeostazın bozulması, toksik reaktif oksijen metabolitlerinin, ileri glikolipooksidasyon ürünlerinin (AGEs/ALEs) ve bunların proteinler ile yaptıkları komplekslerin (AGEs/ALEs-protein eklentileri) üretiminin artmasına neden olmaktadır [10, 11]. Bunun sonucunda $A\beta$ agregatların oluşması ve birikmesi, tau proteinin hiperfosforilasyonu gerçekleşmektedir [12-14].

Ayrıca, hiperglisemik ortam beyinde nöroinflamatuvar yanıtın oluşmasına ve mitokondriyal disfonksiyona aracılık etmektedir [15, 16].

AH ve DM arasındaki ilişkinin kısmen aydınlatılmış olması ve hastalığın kompleks hücresel patogenezi, *in vitro* veya *in vivo* modellerin yetersiz kalması, tasarlanan ilacın beyin dokusuna hedeflendirilememesi, uygun ilaç taşıyıcı sistemlerin seçilememesi, kan-beyin bariyer engeli, kullanılan ilacın moleküler düzeyde selektif olmaması veya sadece semptomları gidermeye yönelik olması gibi birçok sorun nedeniyle gerek AH gerekse DM-AH olgularında radikal tedaviye ulaşılamamıştır. Bu nedenle, semptomatik tedavi yerine, patogeneizde görev alan yolları birden fazla mekanizma ile inhibe edebilen, sinaptik disfonksiyon, nöroinflamasyon, oksidatif/nitrozatif stres ve nöronal kaybı baskılayarak rejeneratif mekanizmaları uyarabilecek etkiye sahip ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarla, endokannabinoid sistem (EKS) ve düzenleyicilerinin nörodejeneratif hastalıklarda protektif etkilerinin olduğu bilinmektedir. Endokannabinoid sistem ve modülatörlerinin, periferik ve merkezi sinir sisteminde (MSS) birçok patolojik ve fizyolojik fonksiyonlarda görev almaktadır [17]. MSS’de nöronal plastisite, nöroinflamasyon, nörodejenerasyon, sirkadyan ritim ve redoks homeostazındaki rollerinin aydınlatılması ile kannabinoid sistem düzenleyicilerinin AH’da potansiyel terapötik etkilerinin olabileceği görüşünü ortaya çıkarmıştır [18, 19].

Günümüzde, nörodejeneratif hastalıkların patogenezinden sorumlu mekanizmalarının araştırılmasına yönelik çalışmalarda genellikle benzer yollar üzerine odaklanılmış, buna karşın birçok mekanizma ile ilişkili olan redoks strese bağlı dejeneratif yolların araştırılması ve bu yolların hedeflenerek patolojinin önlenmesine yönelik araştırmalar üzerinde yeterince durulmamıştır. Ayrıca, birbiri ile ilişkili olan DM ve AH gibi patolojilerde iki patogenezi de eş zamanlı taklit edecek *in vitro* modellerin kısıtlı olması ile yeni modellerin oluşturulması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda DM ve AH arasındaki ilişkiyi değerlendirmek üzere primer hipokampal nöron hücre kültürlerinde

oksidatif/nitrozatif stres, nöroinflamasyon ve mitokondriyal disfonksiyonun eşlik ettiği glukolipotoksisite ve A β aracılı *in vitro* DM-AH oluşturulması ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

Oluşturulan DM-AH modelinde, 1) endokannabinoid grubu bileşikler olan anandamid (AEA) ve 2-araşidonilgliserol (2-AG), sentetik kannabinoid reseptör agonistleri WIN 55,212-2 ve CP 55,940, ve endokannabinoid sistem modülatörü olan URB-597 bileşiğinin potansiyel nöroprotektif etki ve etki mekanizmalarının araştırılması, 2) endokannabinoid sistem-redoks modülasyon-nöroinflamasyon ekseninde DM-AH'nı modifiye edecek terapötik bir yaklaşım sağlanması, 3) inflamatuvar nörodejenerasyonda kannabinoid sistemin rolünün aydınlatılması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışması, kannabinoid reseptölerinin stimülasyonu ile oluşan potansiyel nöroprotektif etki, redoks strese verilen yanıtın, oksidatif/nitrozatif süreçlerin ve redoks modülatör proteinlerin detayları ile araştırılacak olması, ayrıca farklı gruptan kannabinoid bileşiklerinin oluşturacağı etkinin reseptör bağımlı olup olmadığının ve bu etkiye antioksidan mekanizmaların aracılık edip etmediğinin belirlenmesi, kannabinoid türevi bileşiklerin diğer nörodejeneratif patogenezlereki davranışlarına ışık tutacak ve bilgi üretecektir

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer Hastalığı (AH) geri dönüşsüz progresif bir nörolojik bozukluk olup hafıza kaybı, sebep-sonuç ilişkilendirmesinde gecikme, bilişsel ve davranışsal anomaliler ile karakterize edilmektedir [20, 21]. Fiziksel ve mental sağlığı ciddi şekilde etkileyen AH için yaşlanma en önemli risk faktörü olarak gösterilmekte ve 65 yaş üstü bireylerdeki insidansı her 5 yıllık periyotlarda iki katına kadar çıkabilmektedir [22].

AH'nın patolojik özellikleri ilk defa Alois Alzheimer tarafından 1906 yılında "37th Southwestern German Psychiatrists" toplantısında sunulmuştur. Alois Alzheimer'ın bu çalışmasından dolayı çalışma arkadaşı Emil Kraepelin tarafından bu hastalığa Alzheimer adı 1910 yılında verilmiştir [23]. 1963 yılına kadar geçen süre sonunda Robert Terry ve Michael Kidd adlı araştırmacılar, Alzheimer hastalarından alınan beyin biyopsilerinde elektron mikroskopi yöntemi kullanarak yaptıkları analizler sonucunda nörofibriler yumakların (NFY) varlığını göstermeleriyle [24], bu hastalığın patogenezinde görev alan mekanizmaların ve bu hastalığa karşı ilaçların geliştirilmesi için gerekli çalışmalar hız kazanmıştır [25].

Yaşlı popülasyonda yaygın olarak görülen AH, demans olgularının, %50-80 gibi yüksek bir oranını oluşturmaktadır [26]. Bu nedenle günümüzde Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından insan sağlığını etkileyen öncelikli sorunlar arasında yer almaktadır. Dünya genelinde 50 milyona yakın insanın etkilendiği ve 30 yıl içerisinde bu sayının 3 katına çıkacağı öngörülmekle birlikte 65 yaş üstü bireylerde % 10 ve 85 yaş üstü bireylerde ise bu oranın % 30 üzerinde olduğu bildirilmiştir [27].

AH, klinik açıdan incelendiğinde, sporadik ve ailesel AH olarak ikiye ayrılmaktadır [28]. Sporadik olgular AH teşhisi konulan bireylerin büyük bir kısmını (%90-95) oluşturmaktadır [29, 30]. Sporadik AH, 65 yaş üstü bireylerde geç-başlangıçlı AH (GBAH); 65 yaş öncesi bireylerde ise erken-başlangıçlı AH (EBAH) olarak

tanımlanmaktadır [31]. Ancak iki olgunun klinik seyrinin ve son evre patolojik bulgularının benzer olması yaş dışında ayırıcı bir faktörün olmadığını göstermektedir [32]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, sporadik AH'na bağlı morbiditenin %71 oranında arttığını ve bu artışın inme (%23), kardiyovasküler hastalıklar (%14) veya prostat kanseri (%11) gibi diğer patolojilerle kıyaslandığında dramatik boyutlarda olduğunu göstermiştir [33]. AH'nın %1-2'lik kısmını oluşturan ailesel AH ise kalıtsal olarak aktarılan otozomal dominant AH (ODAH) olarak adlandırılıp erken yaşlarda ortaya çıkarak, diğer nörolojik anomaliler ile birlikte beyinde daha geniş bir yüzey alanda tutulum göstermektedir [34].

Semptomatik AH, sinsi bir şekilde ilerleyerek geri dönüşümsüz sonuçlar doğurabilmektedir. Tipik AH olgularında, erken evrede hafıza ve öğrenme fonksiyonlarında azalma gözlenirken, orta-ileri seviye olgularda dikkat dağınıklığı, günlük yaşamsal işlevsellikte azalma, konuşma güçlüğü, görsel-uzamsal becerilerde azalma, praksi (pratik yapma-uygulama güçlüğü), gnozis (sezgisel yeteneklerde azalma) ve bunların sonucunda davranışsal ve sosyal boyuttan uzaklaşma gözlenmektedir [35]. Atipik AH olgularında ise hafıza fonksiyonları dışında posterior kortikal atrofiye bağlı olarak görsel-uzamsal işlevsellikte azalma, praksi ve gnozis yaygın olarak görülmektedir [36]. Tipik veya atipik olgulara ek olarak afazinin de gözlemlendiği logopenik varyantlarda, hastaların dil ve konuşma becerilerinde azalma, uygun kelimelerin seçilmesinde güçlük, konuşurken tekrarlama ve takılmalar gözlenmektedir [37, 38].

Antemortem AH nöropatolojik tanısında, serebrospinal sıvıdan veya pozitron emisyon tomografisi (PET) ile serebral amiloid beta ($A\beta$) ve Tau agregatlarının görüntülenmesi yöntemi kullanılmaktadır [39-42]. Günümüzde ise merkezi sinir sistemi (MSS)'nde dağılmış $A\beta$ plaklarının plazmadaki türevlerinin biyobelirteç olarak ölçülmesi esasına dayanan yöntemler üzerine çalışmalar yer almaktadır [43-45]. Bu çalışmalar, erken evre $A\beta$ oluşumu ve buna bağlı olarak kortikal nöronlardaki metabolik aktivitenin azaldığı, hiperfosforile tau birikimi, hipokampal nöronların ölümü ve semptomatik kognitif fonksiyon kaybının aktif olduğu ve bu tablonun 10-20 yıl devam ettiği bireylerde gerçekleştirilmektedir [34, 40, 46-53]. Elde edilen bulgular, serobrospinal sıvı ve nörofilament hafif zincirin (NfL) tüm

nörodejeneratif demans olgularının teşhis ve takibinde biyobelirteç olarak kullanılabileğini kanıtlamaktadır [54, 55]. Bu bulguların, ODAH ve GBAH bireylerde serebrospinal sıvı ve plasma NfL düzeylerindeki değişimlerinin, kortikal kalınlığı gösteren yapısal MRI bulguları ve kognitif performans verileriyle korele olduğunun gösterilmesiyle teşhiste önemli bir adım atılmıştır [56, 57].

2.2. Alzheimer Hastalığının Oluşum Hipotezleri

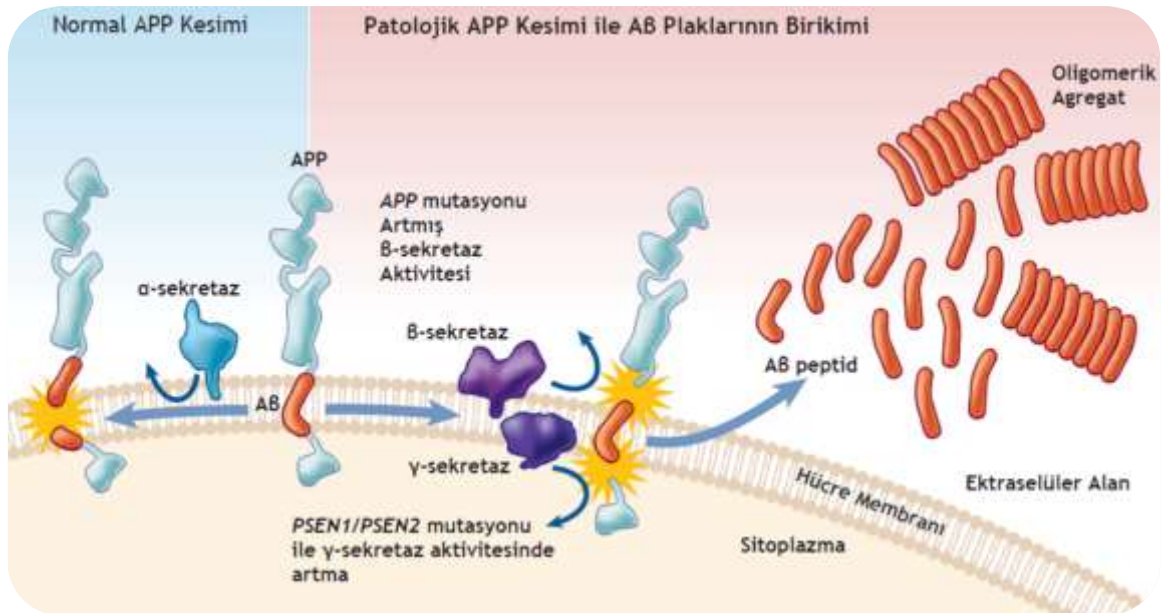
2.2.1. Kolinerjik disfonksiyon hipotezi

Kolinerjik hipotez ilk kez Peter Davis ve A.J.F. Maloney tarafından 1976 yılında yapılan bir çalışma ile açıklanmıştır [58, 59]. Bu çalışmada, insan beyninin 20 bölgesinde asetilkolin, γ -aminobutirik asit, dopamin, noradrenalin ve 5-hidroksitriptamin gibi nörotransmitterlerin sentezinde görev alan enzimlerin aktiviteleri, AH ve sağlıklı bireylerde kıyaslamalı olarak incelenmiştir [60, 61]. Elde edilen bulgular doğrultusunda, AH'na sahip bireylerin beyin dokusunun amigdala, hipokampus ve kortekslerinde kolin asetil transferaz enzim aktivitesinin anlamlı ölçüde azaldığı ve sinaptik aralıkta asetilkolin düzeylerinin düşük olduğu belirlenmiştir [62, 63]. Kolin asetil transferaz, enzimi asetilkolin sentezinde görev alan bir enzim olup katalitik aktivitesi için kolin, asetil-KoA ve adenosin trifosfat (ATP) substratlarına ihtiyaç duymaktadır. AH'na sahip bireylerde bu enzim aktivitesinin düşük olması ile kolinerjik fonksiyon kaybı hipotezi ortaya çıkmıştır [58, 64]. Benzer bulguların, Parkinson Hastalığı (PH), depresyon gibi diğer nörolojik ve psikiyatrik bozukluklarda da bildirilmesiyle kolinerjik disfonksiyon hipotezi nörodejeneratif hastalıklarda kabul gören bir hipotez haline gelmiştir [65].

2.2.2. Amiloid- β hipotezi

Amyloid hipotezi, 1991 yılında John Hardy ve David Allsop tarafından yapılan bir çalışma ile açıklanmıştır. 21. kromozomda bulunan amiloid prekürsör protein (APP) geninin patojenik mutasyonu sonucunda A β birikimi olur ve bu süreç AH'nın ilk aşamalarında gerçekleşmektedir. Ayrıca AH'nın patolojik yollarının A β birikimi, tau fosforilasyonuna bağlı NFY oluşumu ve nöron kaybı ile açıklanabileceğini düşünmüşlerdir [66].

A β plakları ilk kez 1984 yılında izole edilmiş ve AH'nın teşhisi ve patogenezinin aydınlatılmasına ışık tutmuştur. Temel olarak A β , APP'nin çoklu proteolitik kesimi sonucunda 39-43 amino asitlik kalıntıların ürünü olduğu bilinmektedir. APP'nin kesim işlemi 2 yolak ile gerçekleşmektedir. Bu yollardan ilki, APP'nin önce α -sekretaz ve ardından γ -sekretaz enzimi ile parçalanması sonucu çözünebilir A β oluşumu iken; ikinci yolak olarak önce β -sekretaz (BACE1) ve ardından γ -sekretaz (Presenilin, PSEN) enzimi ile kesim sonucu çözünmeyen A β plaklarının oluşumu ile karakterizedir [67]. Normal koşullar altında APP, çoğunlukla α -yolağı ile hidrolize edilmekte ve az bir kısmı ise β -yolağı üzerinden hidrolize edilerek bağışıklık sistemi ile elimine edilmektedir. Ancak APP'de kesim bölgesinde meydana gelen mutasyon sonucunda BACE1 enzimi ile meydana gelen kesim işlemi baskın hale geçerek çözünemeyen A β plaklarının birikim gerçekleşmektedir (Resim 2.1).



Resim 2.1. Amiloid prekürsör proteinin (APP) α veya β -sekretaz enzimiyle kesilmesi [68]

A β üretimi öncelikle endozomlarda gerçekleşmekte, sinaptik aktiviteye bağlı olarak nöronlardan salgılanmaktadır [69, 70]. Salgılanan bu peptidler çoğunlukla β -sheet konformasyonunda olduklarından oligomerik, protofibril veya fibriler formlarda agregatlaşma eğilimi göstermektedir. A β 42 fibrilleri çoğunlukla 7-8 nm çapında protofilamentlerin birbirine paralel olarak yerleşerek katlanmaları sonucu oluşup

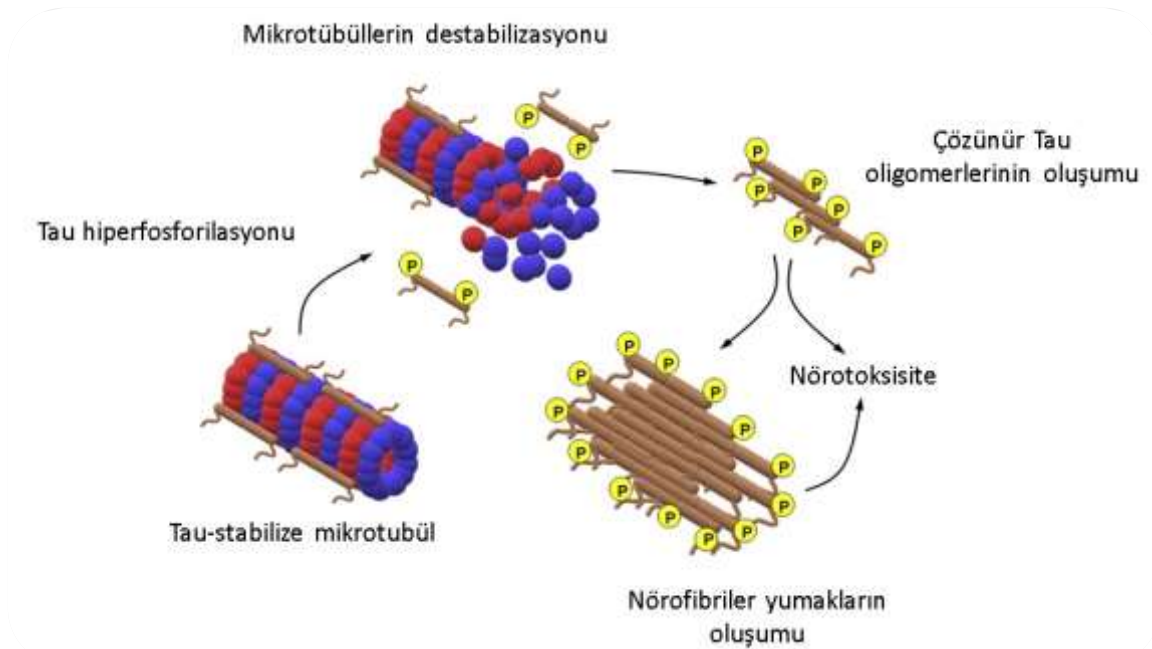
nörotik plakların merkezinde çapraz olarak yerleşmektedir [71]. Öte yandan oligomerik A β 42'ler, monomerlerden sonra oluşan ara formlar olup nöritlerin etrafında bulutsu bir nörotik plak görüntüsü oluşturmaktadır [72]. A β 42'in herhangi bir formdan agregatlaşma sürecine girmesinde mikrogial hücreler ilk basamakta görev almakta ve süreci hızlandırarak nöroinflamasyona aracılık etmektedir. [73]. Bu şekilde yüksek miktarda oluşan A β plakları dendritik ve aksonal atrofiye aracılık ederek, olgun nöron hücrelerinde nörotoksik etki göstermektedir. Plakların birikim düzeylerine bağlı olarak kognitif fonksiyonlarda azalma meydana gelmektedir. Hipokampal nöron hücrelerinde uzun süreli potensiyalizasyonun (LTP) ve beraberinde sinaptik plastisitenin azalması ile kognitif bozukluklara ek olarak nöronal hücre kaybının da gerçekleştiği gözlenmiştir.

Amiloid yolak hipotezi en kabul gören hipotezlerden biri olmasına rağmen, günümüzde daha da geniş bir tanımı içine alacak şekilde düzenlenmiştir. AH'nın genetik formu olan ODAH, Down sendromu (Trizomi 21), APP lokus duplikasyonu gibi risk faktörlerinin de A β 42/40 oranı, toplam A β düzeylerini ve fibriller agregasyon sürecini hızlandığını göstermiştir [74]. Benzer şekilde, geç evrede oluşan AH olgularında apolipoprotein E (APOE) mutasyonları da A β 42 oluşumunu hızlandırarak, A β 42 klerensini yavaşlatmaktadır [75, 76]. Genetik açıdan incelendiğinde, A β düzeylerindeki değişimin AH'na katkısı açıklanabilmektedir. Fakat serebral A β 'nin bölgesel birikimi sonucunda nöronal metabolik aktivitede meydana gelen azalma arasında bir korelasyon oluşmaması [77] veya biriken plakların bulunduğu bölgede fonksiyon kaybına ek olarak beyinin diğer bölgelerinde de fonksiyon kaybına aracılık etmesi gibi nedenler [78, 79], A β hipotezini hedef alan terapötik yaklaşımların klinik faz çalışmalarında yetersiz kalmasına aracılık etmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, A β hipotezinin, patogenezin başlangıcında bir etken olabileceği düşünülmüştür. A β 'nin aracılık ettiği hücre içi sinyalizasyon yollarına ek olarak özellikle tau fosforilasyon düzeyi ve nöroinflamasyonu uyacak etkenlerin de bu patogenezi açıklamada gerekli olduğu gerçeği ortaya çıkmaktadır [80]. Bu nedenle, A β hipotezini AH'nın hücre fazı, tau patolojisini ise AH'nın biyokimyasal fazı olarak tanımlanmıştır [81]. Hücrel homeostatik dengenin bozulmasına bağlı nörovasküler ve nöronal aktivite kaybı, astrosit ve mikrogial aktivasyona bağlı nöroinflamasyon ve hücrel

stres artmaktadır. Bu patogenezden de A β ve tau proteopatisinin birlikte sorumlu olduğu düşünülmektedir [80].

2.2.3. Tau hipotezi

Hücre içi tau içeren NFY'ler AH'nın önemli bir patolojik göstergesidir. NFY, helikal filamentlerin agregasyonu ile oluşmaktadır. Patolojik NFY, hiperfosforile edilmiş tau proteinlerinden oluşmaktadır. Tau proteinleri mikrotübül-bağlayıcı proteinler ailesinden olup akson ve dendritlerde iletimin ana iskeletini oluşturmaktadır. Tau hiperfosforilasyonu sonucunda oluşan fibriller veya yanlış katlanmış NFY'ler öncelikle beyinin bir bölgesinde birikip ardından beyinin büyük bir bölümüne yayılmaktadır (Resim 2.2).



Resim 2.2. Tau proteinlerinin hiperfosforilasyonu ile mikrotübüllerin depolimerize olarak nörofibriler yumakların oluşumu [82]

Tau hipotezi temel olarak, hiperfosforilasyona bağlı olarak Tau proteinin mikrotübülleri depolimerize ederek nöron içi ve nöronlar arası sinyal iletimini bozması ile açıklanmaktadır. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalarda amiloid hipotezi ile birlikte ilişkilendirilmektedir. Bir risk faktörü olan APOE4 mutasyonu varlığında tau proteinin fosforilasyonu artmakta ve A β agregatlarının eliminasyonu azalmaktadır. Tau proteininin fosforilasyonunun regülasyonunda görev alan diğer bir protein olan glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3 β) aktivitesinin artmasıyla bir

yandan tau proteini hiperfosforile olurken, diğer yandan APP aracılı patolojik A β oluşumu katalizlenmektedir. Ayrıca tau proteini A β aracılı sinaptik toksisite ve nöronal ağ oluşumunu baskılamaktadır. Öte yandan tau proteini, APP proteininin hücre zarına taşınmasını artırarak ferroportin-1 aracılı demir iyonlarının hücreden atılımını hızlandırmaktadır.

AH patogeneğinde artmış olan tau fosforilasyonu ile tau proteini sitozolik yerleşim göstererek agregasyon ve ardından yumak oluşumu eğilimi göstermektedir. Aşırı fosforillenmiş olan tau proteini aksonal kompartmandan, somatodendirik kompartmana doğru hareket ederek glutamat reseptör taşınımı ve sinaptik etkileşimi inhibe etmektedir [83]. Hücre içerisinde tau fosforilasyonundan sorumlu olan kinazların başında GSK 3 β , siklin bağımlı kinaz-5 (Cdk5), cAMP-bağımlı protein kinaz (PKA) ve kalsiyum kalmodulin bağımlı protein kinaz II (CaMKII) gelmektedir [84].

2.2.4. Kalsiyum homeostazı ve eksitotoksisite hipotezi

AH'da, Ca²⁺ aşırımı ile oluşan eksitotoksisite sonucunda sinaptik fonksiyon kaybı görülmektedir. Eksitotoksisitenin oluşmasına aracılık eden N-Metil-D- Aspartat reseptörlerinin (NMDAR), glutamata karşı duyarlılığı AH'da artmaktadır [85]. Glutamat beyindeki primer eksitator aminoasit olup, iyonotropik ve metabotropik reseptörler üzerinden etki göstermektedir. İyonotropik glutamat reseptörleri (iGluR) nöronal ağın oluşması sırasında hızlı iletimden sorumlu reseptörlerdir. Bu reseptörler, α -amino-3-hidroksil-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit (AMPA) reseptörleri (AMPA), kainat reseptörleri ve NMDAR olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır [86]. Glutamerjik sinyalin fazla miktarda olması ile AH'da görülen eksitotoksisiteye bağlı nörodejenerasyon oluşmaktadır. Oluşan bu eksitotoksisitenin, Ca²⁺ iyonlarına olan geçirgeniliğinin diğer reseptörlere oranla fazla olan NMDAR'nden kaynaklandığı bilinmektedir [87]. NMDAR fizyolojik koşullarda sinaptik iletim ve plastisiteyi sağlayarak öğrenme ve hafıza fonksiyonlarının oluşmasına aracılık etmektedir. Fakat, patolojik koşullarda, fazla miktarda Ca²⁺ iyonlarının hücre içine geçişine aracılık ederek, kademeli sinaptik fonksiyon kaybına ve hücre ölümüne neden olmaktadır [88, 89].

Post sinaptik yoğunluk proteini 95 (PSD-95 proteini), AMPAR ve NMDAR'nin post sinaptik mebrana taşınımı, sinaptik yerleşimi ve stabilizasyonunda görev almaktadır [90, 91]. LTP'nin sağlanmasında sinaptik kuvvet artışının önemli rolü olmasına rağmen, PSD-95 proteininin aşırı ekspresyonuna bağlı olarak oluşan akım, nöronlarda doygunluk meydana getirerek NMDA aracılı LTP'nin sonlanmasına sebep olur. Bu doygunluk nöronlarda AMPAR aracılı LTD'nin oluşumuna aracılık etmektedir [91]. Öte yandan AH'nda, NMDAR ve AMPAR'nin yüzey ekspresyonunun anlamlı ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Eksitotoksisitenin aracılık ettiği nöron içi Ca^{2+} artışı ile birlikte NMDAR'nin yüzey ekspresyonu azaltılarak homeostaz sağlanmaya çalışılmakta, ancak yetersiz kalmaktadır [92]. Bunun sonucunda da Ca^{2+} aracılı sinyal yollarının aşırı uyarılması ile nörodejeneratif mekanizma baskın hale geçmektedir. Özellikle AH'nın ilk evrelerinde görülen iskemik beyin hasarının oluşumundan sorumlu artmış nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) aktivitesi, bu yolların başında gelmektedir. NMDA/PSD-95 kompleksine PDZ bölgeleri aracılığı ile bağlanan nNOS enzimi, Ca^{2+} eksitotoksisitesi ile birlikte aşırı miktarda NO radikali oluşumuna aracılık ederek nöronal hücrelerde nitrozatif hasara neden olmaktadır [93]. nNOS enziminin artmış olan aktivitesine bağlı olarak meydana gelen NO radikali, nitrit, peroksinitrit ve süperoksit radikalleri gibi diğer reaktif oksijen türevlerinin oluşumunu hızlandırarak mitokondriyal membran geçirgenliğini artırır ve mitokondriyal süperoksit dismutaz (SOD) enzimini de bloke ederek mitokondriyal düzeyde oksidatif stresi arttırmaktadır [94]. Ayrıca oluşan NO radikali endoplazmik retikulum (ER)' da yer alan protein-disulfit izomeras (PDI) enzimini nitrolize ederek, hücresel protein katlanmalarını engellemektedir [95]. Diğer yandan, oksidatif stres nöronal DNA, lipid ve özellikle protein düzeyinde hasara neden olarak, AH'nın temel histopatolojik belirteci olan A β peptidlerin yanlış katlanmasına ve agregatlar halinde birikmesine yol açmaktadır [96, 97].

Ayrıca AH'nın patogenezinde etkin rol alan A β plakları, Ca^{2+} / Kalmodulin bağımlı kinaz II (CaMKII) aktivitesini değiştirerek AMPAR ve NMDAR'nin yüzey ekspresyonunu ve iyon akışını azaltmaktadır [98]. NMDAR ve AMPAR'nde meydana gelen bu azalma, post sinaptik yoğunluğun da azalmasına aracılık etmektedir [99]. Hücre içi NFY'lerin oluşumuna aracılık eden tau proteini, Fyn protein kinazı fosforile ederek NMDAR'nin NR2 alt ünitelerinin PSD-95 proteini ile

etkileşimini kolaylaştırır. Bunun sonucunda NMDAR aracılı sinyalizasyon yolları (nNOS) kesintisiz ve kontrolsüz şekilde devam ederek hücreyi eksitotoksisiteye bağlı apoptoza, yani nöronal hücre kaybına götürür. NMDA/PSD-95 etkileşimi de hücrel sinyalizasyonu uyararak A β toksisitesini arttırmaktadır. Bu da AH'nın temelini oluşturur [100]. Ancak AH'nda postsinaptik nöronlarda biriken A β plakları, gerek kapladıkları yüzey alanı, gerekse etkiledikleri sinyal yolları ile PSD-95 proteinin β tabakalı sekonder yapısını bozarak hem nöronal sinyalizasyon hem de morfolojiyi olumsuz yönde etkilemektedir [101]. PSD-95 proteinindeki bu azalma özellikle NMDAR'nin membran stabilizasyonunu da azaltmaktadır. Bu durum AH gibi NMDAR'nin aracılık ettiği Ca²⁺ eksitotoksisitenin azalmasına aracılık etse de, nöronal hücrelerde öğrenme ve hafıza oluşumundan sorumlu moleküler yolları da olumsuz etkilemektedir [102, 103]. Bu yolların başında CREB ve C/EBP (CCAAT enhancer binding protein) transkripsiyon faktörleri aracılı regüle edilen yollar gelmektedir [104].

AH'da CREB proteininin fosforilasyon düzeylerinde değişiklikler meydana gelmektedir. Artmış β sekretaz (BACE1) aktivitesi ile birlikte cAMP düzeylerinde belirgin ölçüde azalma gözlenirken [105], mitojen aktive protein kinaz (MAPK), CaMK II ve IV düzeylerindeki azalma sonucunda, fosforile CREB düzeyinde de düşüş meydana gelir [102]. Bu da hastaların öğrenme ve hafıza fonksiyonlarındaki değişiklikleri açıklar niteliktedir. AMPAR'inden hücre içine Ca²⁺ akışı, CaMK II enzimi tarafından kontrol edilmektedir. AH'nda, azalmış CaMK II enzim düzeyine bağlı olarak AMPAR'nin fosforilasyonu gerçekleşmemektedir. Bunun sonucunda da LTP'nin korunması engellenmektedir [106].

2.2.5. Nörovasküler disfonksiyon hipotezi

Bu hipotez temel olarak, beyin mikroçevresinin homeostazı ve metabolizması, substrat dağıtımı ve atıkların kan yoluyla drenajındaki değişikliklerin değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır. Bu aşamada nöronlar, astrositler ve vasküler hücreler, beyin yapısının ve fonksiyonunun bütünlüğünü destekleyen hassas bir fonksiyonel birim oluşturmaktadır [107-109]. Serebrovasküler fonksiyondaki değişikliklerin, hem serebrovasküler patolojilerin hem de AH dahil olmak üzere diğer nörodejeneratif hastalıkların patogenizinde rol aldığı

gösterilmiştir [110]. 1994 yılında, beyin mikrovasküleritesinin, AH'da hasar gördüğü gösterilmiştir [111]. A β , serebral arterlerin daralmasını uyarmaktadır. AH fare modellerinde, A β birikiminden önce neokortikal mikrosirkülasyonun bozulduğu bildirilmiştir. Alzheimer hastalarındaki beyin görüntüleme çalışmalarında, nörovasküler disfonksiyonun, nörodejenerasyonun başlamasından önce gerçekleştiği gösterilmiştir [112, 113]. Anormal anjiyogenez ve serebrovasküler sistemin yaşlanması, A β 'nin kan-beyin bariyeri (KBB) boyunca tamamen uzaklaştırılamamasına nörovasküleritenin oluşamamasına ve damar dejenerasyonuna aracılık etmektedir [114]. Sonuç olarak nörovasküler fonksiyon kaybı, beyin hipoperfüzyonuna, beyin hipoksisine ve nörovasküler inflamasyona aracılık etmektedir. Buna ek olarak, KBB bütünlüğünün bozulması sonucu, nöronal disfonksiyon ve nöron kaybı ile AH patogenezi ilerleyici hale geçmektedir.

2.2.6. Nöroinflamasyon hipotezi

MSS'nde inflamatuvar yanıtın oluşmasında glial hücreler sorumlu olup, mikroglia ve astrositlerin AH'nın patogenezinde de görev aldığı bilinmektedir [115-117]. Mikroglia hücreleri beyin dokusunda özelleşmiş makrofajlar olup beyinde bulunan hücrelerin %10-15'lik kısmını oluşturmaktadır. Bu oranın AH olan bireylerde arttığı ve NFY'ların bulunduğu bölgelerde 2-5 kat daha fazla kümelendiği gözlenmiştir [118].

A β ve sitokin ile indüklenmiş mikroglial ve astroglial aktivasyonun AH'na sinerjistik etki göstererek patogenezi daha da kötüye götürmektedir. Tüm-genom sekans analizleri (GWAS) sonucunda, AH'nın patogenezinde, mikroglia hücrelerinde kodlanan TREM2, CR1, SHIP1, BIN1, CD33, PICALM, CLU ve MS4A genlerinin rol aldığı gösterilmiştir [119, 120]. Bu genlerden özellikle TREM2'nin R47H varyantının, AH riskini artırmaktadır [121]. TREM2 proteini, mikroglialar üzerinde ifadelenen bir protein olup fagositoz, inflamatuvar sinyalin oluşmasında ve mikroglial sağkalımın düzenlenmesinde görev almaktadır. AH'da ise, A β oligomerlerine bağlanarak fagositoz yoluyla hücreden uzaklaştırılmasına aracılık etmektedir [121, 122]. Başlangıçta bir koruma mekanizması şeklinde gerçekleşen bu hipotez, A β plaklarının fagositozu ile aktive olan NLRP3 inflamazom kompleksinin kaspaz-1'i aktive etmesiyle inflamatuvar yanıtın başlamasını

uyarmaktadır [123]. Aktif kaspaz-1, IL-1 β 'nin öncülünden proinflamatuvar etki gösteren aktif formuna dönüşmesine aracılık etmektedir [124]. Diğer yandan, aktif inflamazom kompleksi apoptoz-ilişkili speck-benzeri CARD bölmesi içeren protein (ASC) ailesini uyarır. Uyarılan ASC'ler, ekstraselüler yerleşmiş A β plaklarına çapraz bağlanarak oligomerizasyonu ve buna bağlı agregasyon sürecini başlatmaktadır [125].

Aktive edilmiş mikrogial hücreler tau-aracılı patolojiye de doğrudan katkı sağlamaktadır. Fare modellerinde yapılan çalışmada TREM2 geni delesyonu yapıldığında tau aracılı nörodejenerasyonun ve astrogliozisin inhibe edildiği gösterilmiştir [126, 127].

Bir diğer mekanizma olarak ise, AH olan bireylerde A β 'nin, mikrogial hücrelerde bulunan CD36-TLR4-TLR6 reseptör kompleksi ve NLRP3 inflamazom kompleksine bağlanarak pro-inflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β , TGF- β , IL-12, IL-18) salgılanmasını ve hücrelerin apoptoza yönelenerek nöronal dejenerasyona aracılık ettiğini göstermiştir [128].

İnflamatuvar hipotez ile ilişkili olarak bağırsak-beyin eksen hipotezi ortaya atılmıştır. Bu hipotezde, bağırsakta bulunan flora bakterilerinden üretilen metabolitlerin, bağışıklık sistemini aktive etmesine bağlı olarak mikrogial aktivasyonu uyarması esasına dayanmaktadır [129]. Fare modellerinde ve AH'na sahip bireylerde yapılan çalışmalarda bireysel farklılıklara bağlı flora değişkenlikleri ve bağırsak-beyin arasındaki direk ilişkinin aydınlatılamamış olması bu hipotezi kısıtlayan etkenler arasında sayılmaktadır [130-132]. Fakat, APP/PS1DE9 transgenik fare modelinde, yüksek doz antibiyotik kokteyli verilmiş gruplarda A β 42 çözünür formlarının arttığı, plak oluşumun azaldığı ve ayrıca aktive astro-mikrogliozisin baskılandığı gösterilmiştir [133].

2.2.7. Mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres hipotezi

2004 yılında, Swerdlow ve Khan ilk olarak mitokondriyal disfonksiyon hipotezini ortaya koymuş ve mitokondriyal fonksiyonun APP ifadesini ve işlenmesini ve A β plaklarının birikiminde etkili olabileceğini belirtmişlerdir. Oksidatif stres, AH

patogenezi başta makromolekül peroksidasyonu, A β metal iyon redoks potansiyeli ve mitokondriyal disfonksiyon olmak üzere 3 ana mekanizma üzerinden etkilemektedir [134-136]

Oksidatif stres, redoks düzenleyicilerinin ve moleküller arasındaki etkileşimin azalmasına neden olan, pro-oksidan ve antioksidan dengenin bozulması olarak tanımlanmakta ve çoğunlukla süperoksit de dahil olmak üzere artan reaktif oksijen türevleri (ROS) ve/veya reaktif nitrojen türevlerinden (RNS) kaynaklanmaktadır. Radikal anyonlar (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikalleri ($HO^\cdot$), nitrik oksit (NO) ve peroksinitritler (ONOO) olarak sınıflandırılmaktadır [137]. Sağlıklı hücrelerde ROS, mitokondri, ER, peroksizomlar, NADPH oksidazlar ve monoamin oksidazlar dahil olmak üzere birçok kaynaktan üretilmektedir [138, 139].

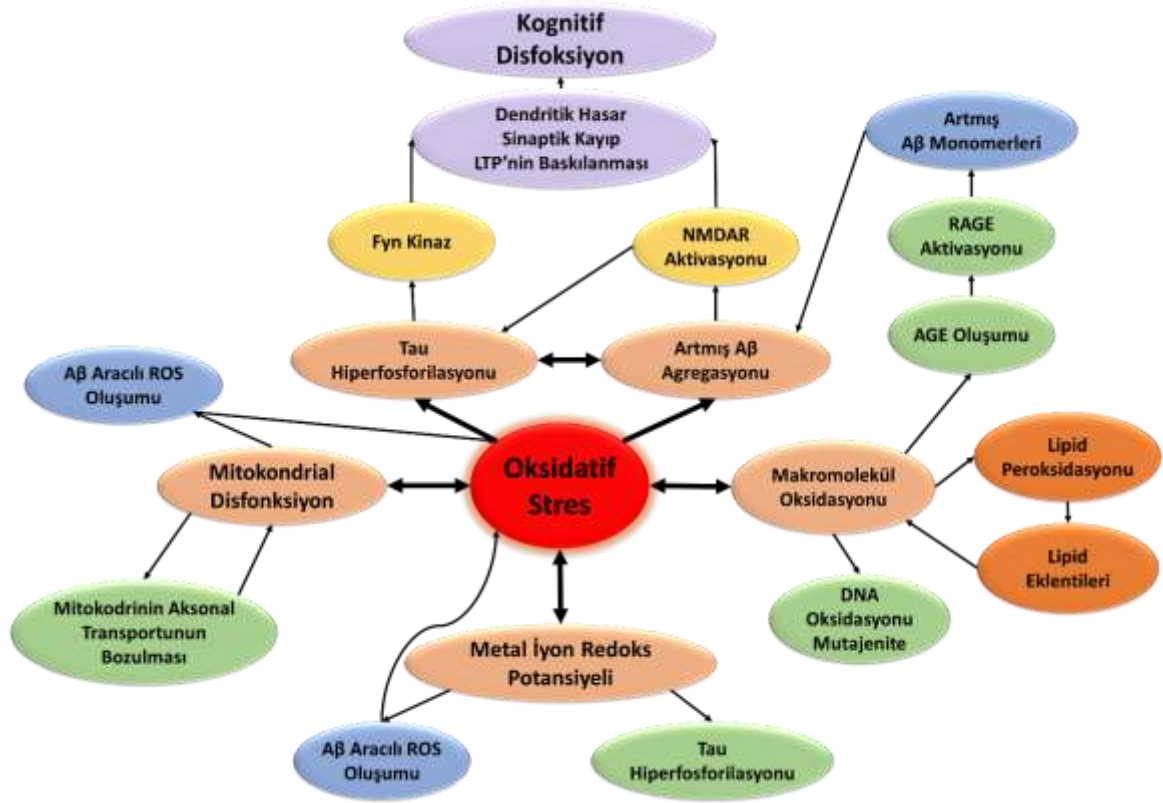
Fizyolojik koşullarda mitokondriyal elektron transport zinciri (ETZ)'nde yer alan Kompleks 1 ve Kompleks 3 tarafından ROS üretimi meydana gelmektedir. Üretilen ROS, sitokrom c oksidaz aktivitesinin kontrolünde bir antioksidan koruma mekanizması ile denetlenmektedir [140]. Ancak, AD'na sahip bireylerde hipokampal sitokrom c oksidaz düzeylerinde ciddi bir azalmanın varlığı gösterilmiştir [141]. Bu azalmaya ek olarak insulin üretimi ve etkilediği yollarda da değişiklikler meydana gelerek nöronal mitokondri hasarının olduğu gözlenmiştir [142]. Oligomerik A β peptidlerinin mitokondri iç zarında birikmesi ile ETZ ana bileşenleri olan enzimler baskılanmakta ve bunun sonucunda antioksidan savunma mekanizması bloke edilmektedir [136, 143]. Bu mekanizmanın bloke edilmesi ile mitokondri membranında bulunan mitokondri-ilişkili ER membrane proteini (MAM) düzeylerinde artış meydana gelmektedir. MAM proteini, A β plaklarının mitokondriye girişini hızlandırmak üzere mitokondri dış zar translokaz proteini (TOM) ile etkileşerek A β peptidlerinin mitokondriye translokasyonunu sağlamaktadır [144]. Bunun sonucunda mitokondriyal fonksiyon kaybına bağlı membran potansiyelinde düşüş ve apoptotik yanıt başlamaktadır [136, 143]. Bu yollara ek olarak tau proteininin hiperfosforilasyonu ve mikrotübüllerin dağılmasıyla mitokondrilerin kinesin ve dynein motor proteinleri aracılığıyla gerçekleşen taşınımı da sekteye uğramaktadır [145]. Fonksiyonel ve fonksiyon kabına uğramış mitokondrilerin, anterograd ve retrograd taşınımının bozulması ile

disfonksiyonel mitokondriler, nöronlarda birikerek intranöronal oksidatif hasarın kümülatif şekilde artmasına neden olmaktadır [145, 146].

Lipid peroksidasyonu sonucunda nöronal poliansatüre nöronal lipidler okside olarak, biyokimyasal aktif son ürünler olan 4-hidroksi-2,3-nonenal (4-HNE), malondialdehit ve F2-izoprostanlar oluşmaktadır [147, 148]. Oluşan bu reaktif son ürünler, tau hiperfosforilasyonu ve hücre içi Ca^{2+} sinyalizasyonunu regüle ederek apoptotik yolların uyarılmasına aracılık etmektedir [149, 150]. Ayrıca hücre içi ROS düzeylerindeki artış, mitokondriyal DNA üzerinde hidroksilasyon, karbonilasyon ve nitrasyon gibi eklentilerinin oluşmasına ve bunun sonucunda epigenetik paternin değişerek mutajenik özelliklerin kazanılmasına neden olmaktadır [150-152]. Nükleotidlerde oksidatif stresin maruziyet süre ve şiddetine göre 8-Hidroksideoksiguanin (8-OHdG) eklentileri meydana gelmektedir. Bu mutajenik eklentiler AH'na sahip bireylerde temporal, parietal ve frontal loblarda A β ve p-tau birikimine aracılık ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [151, 153].

Lipid peroksidasyonuna benzer bir mekanizma ile özellikle proteinlere okside sakkaritlerin eklendiği glikasyon mekanizması, AH patogenezinde yaygın olarak görülmektedir [82, 134]. ETZ'de meydana gelen fonksiyon kaybı ile biyoenerjetik mekanizma bozularak aşırı miktarda oluşan ROS, glukoz ürünlerini okside etmektedir. Okside olan glukoz ürünleri reaktif özellikte olduklarından proteinlere bağlanarak fonksiyon kaybı başta olmak üzere ER stresi ve buna bağlı olarak katlanmamış protein cevabının oluşmasına aracılık etmektedir. Glikasyon işlemi sonucu oluşan ileri glikasyon son ürünleri (AGE) hücre içinde nörotoksin gibi davranarak nöroinflamasyonu uyarmaktadır. AGE eklentileri, kendilerine özgü reseptörler olan reseptör-AGE (RAGE)'lere bağlanarak nitrik oksit (NO), IL-1 β ve Tnf- α salgılanması ve bunu takiben nöronal dokuda hasar meydana gelmesine aracılık etmektedir. AH patogenezinin kritik elemanları olan A β ve tau proteinleri de artmış ROS durumunda glikasyona uğrayarak AGE-eklentileri oluşturmaktadır [135]. Bu eklentiler, önce mikrotübüllerin yeniden düzenlenimini (re-modelling) bozarak hücre iskeletinin bütünlüğünün kaybolmasına ve oluşan A β -AGE eklentileri ile de geri dönüşsüz agregatların hücreyi ölüme götürmesine aracılık etmektedir [154].

AH'da, oksidatif stres ve etkilediği tüm yollar Resim 2.3'te sunulmuştur.



Resim 2.3. AH patofizyolojisinde oksidatif stres, mitokondrial disfonksiyon, makromolekül oksidasyonu, hücre içi ROS oluşumu, metal iyon dengesinin bozularak Aβ plaklarının oluşumu, Tau hiperfosforilasyonu ve Aβ sentezine aracılık etmektedir. NMDAR ve fyn kinaz aktivasyonu ile dendritik ve sinaptik ve buna bağlı LTP'nin baskılanması ile kognitif disfonksiyon görülmektedir. (ROS: reaktif oksijen türevleri; Aβ: amiloid beta; AGE: ileri glikasyon son ürünleri, RAGE: reseptör AGE, NMDAR: N-metil-D-aspartat reseptörü, LTP: Uzun süreli potansiyelizasyon)

2.2.8 Glukoz hipometabolizması hipotezi

Glukoz metabolizma bozukluğu, AH'nın erken döneminde görülen patolojik bir durum olup, kognitif ve işlevsel fonksiyonlarda azalma meydana getirmektedir. *In vivo* ve *in vitro* modellerde yapılan çalışmalarda hipometabolizmaya bağlı olarak nöronal hücrelerde atrofinin meydana geldiği gözlenmiştir [155-157]. Meydana gelen artofi, AH'nın ilk evrelerinde bölgesel olarak gerçekleşip, 2- deoksi-2-florin-

18-floro-D-Glukoz ile işaretlenmiş pozitron emisyon tomografisi (^{18}F FDG-PET) ile teşhis edilebilmektedir [158]. İnsan beyni, total vücut ağırlığının yaklaşık %2'sini oluşturmalarına rağmen vücut total oksijen ihtiyacının %20'sine kadar ihtiyaç duymaktadır. Beyin hücrelerinin enerji ihtiyacı mitokondriyal trikarboksilik asit döngüsü (TCA) ve oksidatif fosforilasyona bağlı ATP üretiminden karşılanmaktadır [159-161]. Ancak AH'da glukoz metabolizmasında azalma meydana gelmekte ve bu azalma AH'nın patogenezi için daha da ileri evreye götürmektedir [162-164]. Yaşlı olgularda glukoz metabolizmasının %17-24 oranlarında azaldığı ve bunun sonucunda glukoz kullanımı ve ATP üretiminde aksaklıklar meydana gelmektedir [165]. Bozulmuş glukoz metabolizması, mitokondriyal disfonksiyona aracılık ederek oksidatif stres aracılı nöron hücrelerinin kaybına aracılık etmektedir [166, 167].

2.2.9. Metal iyon hipotezi

Metal iyonları, sağlıklı bireylerin MSS'nde enzimatik reaksiyonların ko-faktörü, mitokondriyal ve nöronal fonksiyonların düzenlenmesi gibi birçok fonksiyonda görev almaktadır [168]. Fizyolojik koşullar altında bakır (Cu^{2+}), çinko (Zn^{2+}) ve demir (Fe) gibi iyonlar beyin dokusunda çok az miktarda ve kontrol edilebilir düzeylerde bulunmaktadır. Öte yandan AH'da, bu biyometallerin homeostazında dengesizlik olduğu ve A β plakların agregasyon süreçlerine katkıda bulunduğu gözlenmiştir. AH'da serum Cu^{2+} düzeylerinin arttığı, Zn^{2+} düzeylerinin kanda artarken; serobrospinal sıvıda azaldığı gösterilmiştir. Diğer önemli biyometal olan ve başta mitokondri ETZ'de rolü olan Fe iyonlarının yaşa-bağlı AH olgularında arttığı gözlenmiştir.

AH'da, artmış olan ROS düzeylerine bağlı olarak okside olmuş A β peptidlerinin N-terminalinde, $\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$ 'ın bağlanmasına olanak sağlayan cepler oluşturmaktadır [169]. Bu ceplere bağlanan $\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$ A β peptidlerinin agregasyon sürecini hızlandırarak daha stabil agregatların oluşmasına aracılık etmektedir [170]. Oluşan bu stabil agregatların, sinaptik aralıktan klerensi sağlanamadığından inflamatuvar yanıtın başlaması kaçınılmaz hale gelmektedir [171].

2.2.10. Lenfatik sistem hipotezi

Lenfatik sistem ve kan damarları vücuttaki sıvı dengesinin korunması ve sağlanmasında ana düzenleyiciler olarak tanımlanmaktadır [172-174]. İnsan beyin dokusunu saran üç katmanlı meninksler yaygın bir şekilde lenfatik damarlara sahiptir. Beyin tarafından üretilen proteinler, metabolitler ve diğer atıklar interstisiyel sıvı aracılığıyla serobrospinal sıvıya ulaşır [175]. Klasik yaklaşımda gerçekleşen transvasküler uzaklaştırma işleminde metabolik artıklar ve diğer moleküller beyinden drene edilmek üzere kapiller duvardan taşınarak kan beyin bariyerini geçmektedir [175, 176]. Öte yandan, bu yaklaşıma ek olarak perivasküler uzaklaştırma kavramı öne sürülmüştür. Bu yaklaşımda para-arterital boşluklar veya paravenöz aralıklardan serobrospinal sıvının giriş veya çıkışına bağlı olarak atıkların uzaklaştırıldığı gösterilmiştir [176-179]. Bu yaklaşımın kilit yapılarının ise astrositlerde ifadelenen ve serobrospinal-interstisiyel sıvı değişimimine olanak sağlayan akuaporin-4 kanallarının olduğu belirlenmiştir [178, 179].

Yaşlanma sürecinde atıkların trans/perivasküler uzaklaştırılması sırasındaki aksaklıklar, A β agregatlarının beyinde birikmesine neden olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, akuaporin-4 kanallarının eksikliği A β plaklarının birikimini artırmakta ve lenfatik ağın hasarlanmasına bağlı olarak meninkslerde A β plakları birikmektedir [180, 181].

2.3. Alzheimer Hastalığına Semptomatik Tedavi Yaklaşımı

AH'nın semptomatik tedavisinde Amerikan Besin ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmış dört ilaç bulunmaktadır. Bu ilaçların üçü kolinesteraz inhibitörleri (donezepil, rivastigmin ve galantamin) ve diğeri de yarışmasız NMDAR inhibitörü olan Memantin'dir [182]. Günümüzde kognitif fonksiyon kaybının geri döndürülmesi ve nörodejenerasyonun baskılanarak AH'nın tedavisinde kullanılacak 20 adetin üzerinde bileşik, klinik faz 3 çalışmalarına kadar gelmiş fakat geri dönüşsüz nöronal kaybın ve hastalığın kontrolsüz ilerleyişinde gerileme sağlayamadıkları için sonlandırılmıştır [183].

AH patogeneğinde Menyertin bazal çekirdeği ve diğer septal çekirdeklerde yer alan kolinerjik nöronların kaybına bağlı kolinerjik disfonksiyon yaygın olarak görölmektedir. Bu kayıp sonucunda erken evrede dikkat ve hafıza kaybı görölerek AH ilerlemektedir. Kolinesteraz inhibitörleri (Donezepil, rivastigmin, galantamin) hafif-orta şiddetli AH tedavisinde sinaptik boşlukta asetilkolin seviyelerini artırarak kolinerjik iletimin artmasına aracılık etmektedir. Özellikle hafif-orta şiddetli olgularda etkili olan kolinesteraz inhibitörleri uzun süreli kullanıma bağlı kolinerjik yan etkilerinin artması ve uzun süreli AH olgularında hastalık belirtilerinde gerileme meydana getirmemesi ve ayrıca erken dönem hafif şiddetli olgularda kognitif fonksiyonları daha da geriletmesi gibi sebepler nedeniyle kısıtlı kullanıma sahiptirler [184].

Memantin, yarışmasız NMDAR düzenleyicisi olup glutamat-aracılı eksitotoksisiteyi azaltarak nörodejenerasyonu baskılamaktadır. Özellikle orta-ağır şiddetli olgularda kognitif fonksiyonları artırması, yaşamsal faaliyetlerdeki iyileşmeyi hızlandırması ve nöropsikiyatrik semptomlara katkı sağlaması nedeniyle Memantin şiddetli olgularda sıkça tercih edilmektedir.

2.4. Alzheimer Hastalığını Modifiye Edici Tedavi Yaklaşımı

Hastalık modifiye edici ajanlar temel olarak hastalığın yavaşlatılması, durdurulması veya geriletilmesi üzerine kurgulanmış ajanlar olup ilaçların %60'ını oluşturmaktadır. Bu bağlamda anti-inflamatuar (NSAİİ, steroidler), antioksidan (selenyum, E vitamini), anti-iskemik (statin, aspirin), kolinerjik (lesitin), besinler (Omega-3, B vitaminleri, folik asit), monoklonal antikorlar (bapineuzumab, solanezumab) denenmiş fakat klinik faz çalışmalarından geçememiştir. Modifiye edici ajanlar ile yapılan çalışmaların başarı oranı %0.4'den ileriye gidememiştir [185]. Başarı oranının düşük olması; 1) AH'nın geç evresinde olan bireylerin seçilmesi, 2) yanlış ve/veya seçici olmayan terapötik hedeflerin seçilmesi, 3) yanlış doz ve/veya dozların uygulanması, 4) içleme/dışlama kriterlerinin yaygınlık göstererek bireyler arası farklılıkların (genetik, etnik, tıbbi öykü, komorbid patolojiler) fazla olması, 5) çalışma tasarımındaki hatalar gibi nedenler ile açıklanmaktadır [186, 187].

2019 yılında klinik faz III çalışmalarında yer alan ajanların çok az bir kısmının A β ve tau agregatlarını hedef aldığı Huang ve ark. (2020) tarafından yapılan derlemede gösterilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Klinik Faz 3 çalışmalarında A β ve tau'yu hedef alan ajanlar

Ajan	Etki Mekanizması	Hedef / Amaç	Durumu
Albumin 1 immunglobulin	Plazma değişimi	A β klerensi	Tamamlandı
ALZT-OP1a + ALZT- OP1b	Mast hücre stabilizatörü, anti- inflamatuvar	Nöroinflamasyon	Yürütlükte, kabul başlamamış
ANAVEX2-73	Anti-tau, Anti-A β	Anti-tau, Anti-A β ve antiinflamatuvar	Kabul edilmiş
Crenezumab	Monoklonal oligomerik A β antikoru	A β klerensi	Tamamlandı
E2609 Elenbecestat	BACE inhibitörü	A β üretiminin azaltılması	Yürütlükte, kabul başlamamış
Gantenerumab	Monoklonal A β antikoru	A β klerensi	Kabul edilmiş
Gantenerumab ve Solanezumab	Monoklonal A β antikoru	A β klerensi, A β üretiminin azaltılması	Yürütlükte, kabul başlamamış
Solanezumab	Monoklonal A β antikoru	A β klerensi, A β üretiminin azaltılması	Yürütlükte, kabul başlamamış
GV-971 sodium oligomannurate	A β agregat inhibitörü	A β agregat oluşumunun engellenmesi	Tamamlandı

Huang ve ark. (2020) tarafından yapılan meta-analiz ile birlikte, AH'nın patogeneğinde görev alan tek bir yolağı (A β , tau) hedef almanın klinik çalışmalarda başarısız olma olasılığını yükselteceğini göstermiştir. Bu nedenle AH'da, birden fazla yolağı hedefleyen, hastalığın patogenine katkı sağlayan komorbid faktörleri elimine eden ve hastalığın klinik seyrini değiştirecek ajanların gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Günümüzde araştırmacılar, doğrudan A β peptidleri hedef almayan veya klinikte farklı hastalıkların tedavisinde kullanılan ajanlar yeniden konumlandırarak, AH'da klinik faz çalışmalarına başlamışlardır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. AH'da klinik Faz 3 çalışmalarında yer alan ve Aβ dışı hedeflere özgü ajanlar

Ajan	Mekanizma	Hedef / Amaç	Durumu
AC-1204	Ketozisin uyarılması	Metabolik, kognitif fonk. Artış	Tamamlandı
Levetiracetam	SV2A düzenleyici	Nöroprotektif	Uygulama başladı
Aripiprazol	D2 ve 5-HT1A agonisti	Kognitif fonk. artış	Sonlandırıldı
AVP-786	Sigma-1 reseptör agonist, NMDAR antagonist	Ajitasyonun baskılanması	Uygulama başladı
AXS-05	Sigma-1 reseptör agonist, NMDAR antagonist, Dopamin-norepinefrin geri alım inh.	Ajitasyonun baskılanması	Uygulama başladı
Azeliragon	Anti-inflamatuvar, RAGE antagonist	Nöroinflamasyonun baskılanması	Sonlandırıldı
Brexipiprazol	5-HT1A ve D2 agonist, 5-HT2A antagonist	Ajitasyonun baskılanması	Tamamlandı
Hindistan Cevizi Yağı	ADP-ribolizasyon 1 protein inh.	Anti-Aβ, antiinflamatuvar, antioksidan, nöroprotektif	Sonlandırıldı
COR388	Bakteriyel proteaz inh.	Nöroinflamasyonun baskılanması	Uygulama başladı
Esitalopram	Serotonin geri alım inh.	Ajitasyonun baskılanması	Uygulama başladı
Gabapentin Enakarbil	Glutamat reseptörler	Nöroprotektif, kognitif fonk. artış	Uygulama başladı
Ginkgo biloba	Anti-oksidan, anti-Aβ	Antioksidan, Anti-Aβ	Uygulama başladı
Guanfasin	α-2 ve 5HT2B agonisti	Kognitif fonk. artış	Uygulama başladı

Çizelge 4.2.(devam) AH'da klinik Faz 3 çalışmalarında yer alan ve Aβ dışı hedeflere özgü ajanlar

Ajan	Mekanizma	Hedef / Amaç	Durumu
Idalopirdin	5-HT6 antagonisti	Kognitif fonk. artış	Tamamlandı
Intepirdin	5-HT6 antagonisti	Kognitif fonk. artış	Sonlandırıldı
Insulin	Metabolik yolak	Glukoz kullanımı, Kognitif fonk. artış	Tamamlandı
Lumateperon	5-HT2A antagonisti	Kognitif fonk. artış	Sonlandırıldı
Losartan, amlodipin	ATII reseptör blokörü, Ca ²⁺ kanal blokörü	Antiinflamatuvar, metabolik control, kognitif fonk. artış	Uygulama başladı
Masitinib	Selektif Tirozin kinaz inhibitörü	Nöroinflamasyonun baskılanması	Yürülükte, uygulama başlamadı
Metilfenidat	Dopamin geri alım inhibitörü	Apatinin (Davranış) baskılanması	Uygulama başladı
Mirtazapin	Alfa-1 antagonsit	Ajitasyonun(Davranış) baskılanması	Uygulama başladı
Suvorexan	Oreksin reseptör antagonisti	Uykunun düzenlenmesi	Tamamlandı
EVP-6124	Selektif α7 nikotinik reseptör parsiyel agonisti	Kolinerjik sistem aracılı kognitif fonk. artış	Sonlandırıldı
Nabilon	CB1, CB2 agonisti	Ajitasyonun baskılanması	Tamamlandı
Nilvadipin	Ca ²⁺ kanal blokörü	Anti-Aβ, antiinflamatuvar, nöroprotektif	Tamamlandı
Nuedexta	NMDAR antagonisti Sigma-1 reseptör agonisti, SSRI	Kognitif fonk. artış, nöroprotektif	-
Pioglitazon	PPAR-γ agonisti	Nöroinflamasyonun baskılanması, nöroprotektif, kognitif fonk. artış	Sonlandırıldı
Troriluzol	Glutamat düzenlenmsi	Nöroprotektif	Uygulama başladı
TRx0237 (LMTX)	Tau stabilizatörü, Agregat inhibitörü	Anti-Tau	Tamamlandı
Kolekalsiferol	Vitamin D reseptör agonisti	Metabolik düzenlenim, kognitif fonk. artış	Tamamlandı
Zolpidem, Zoplikon	GABA-A reseptörleri	Uykunun Düzenlenmesi	Uygulama başladı

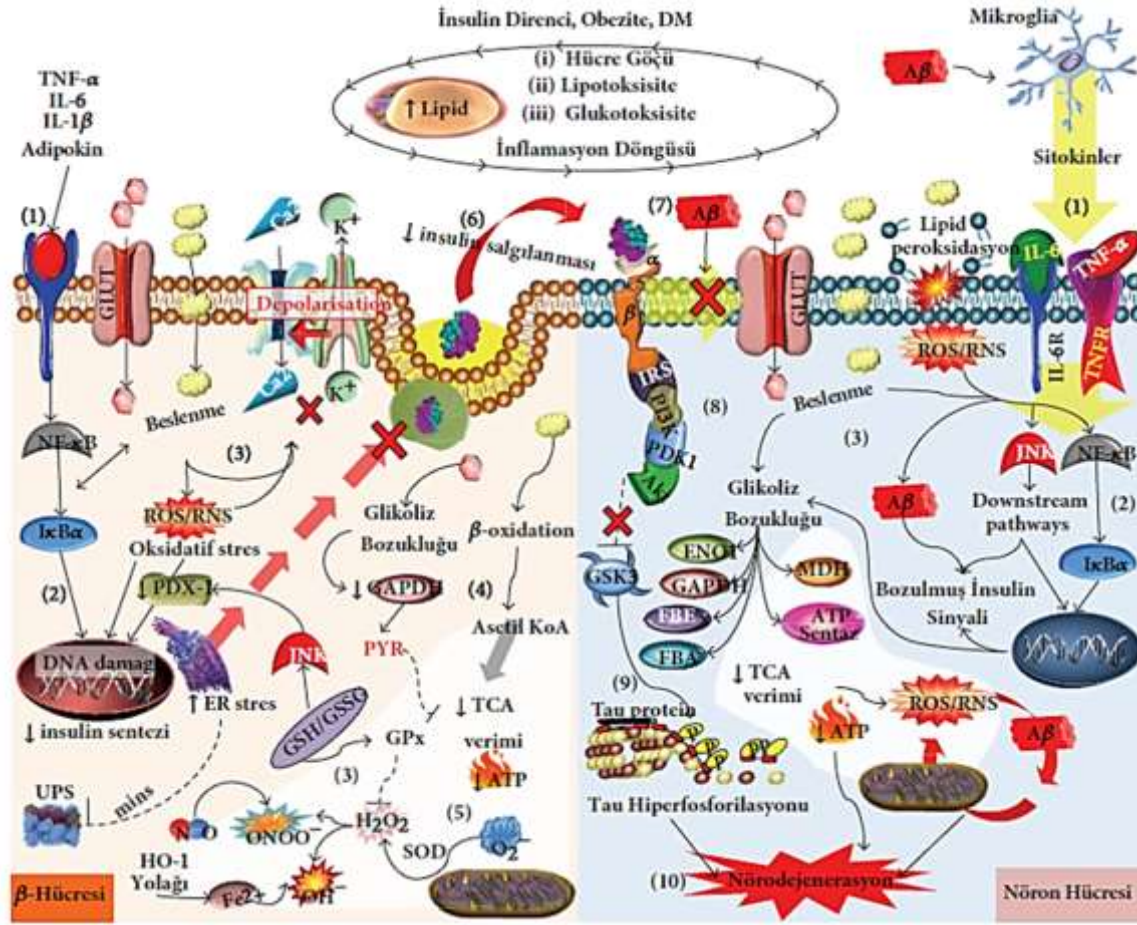
2.5. Alzheimer hastalığı (AH) ve Diabetes Mellitus (DM) ilişkisi

Diabetes mellitus (DM) sistemik metabolik bir hastalık olup kronik hiperglisemi, hiperlipidemi, kronik inflamasyon, oksidatif stres ve insulin direnci (Tip 2) veya yoksunluğu (Tip 1) ile karakterize edilmektedir [188, 189]. İnsulin eksikliği/veya yoksunluğunun eşlik ettiği Tip 1 Diyabet (T1DM) otoimmün bir hastalık olup, pankreatik β hücrelerinin harabiyeti sonucu oluşmaktadır [190, 191]. Tip 2 diyabette (T2DM) ise insulinin hücrelere alınımı (insulin direnci) veya salgılanmasında sorun yaşanmaktadır [192]. Her iki patolojik durum sonucunda kandaki glukoz seviyelerinin yükselmesine bağlı olarak makro ve mikrovasküler komplikasyonlar meydana gelmektedir [193]. Diyabetik komplikasyonlardan biri olan kognitif fonksiyon kaybı hastaların yaşam kalitesini anlamlı ölçüde azaltmaktadır [194-196]. Kognitif fonksiyonlarda meydana gelen azalma, oksidatif stres [197], ileri glikasyon sonürünlerinin oluşumu [198] ve mitokondriyal disfonksiyon ile ilişkilendirilmektedir [199]. Ayrıca, beyinde bozulmuş insulin sinyal yolları, glukoz homeostazındaki dengesizlik [200] ve mikrovasküler değişiklikler [201] diyabet aracılı kognitif fonksiyonun ilerleyici bir şekilde kaybına aracılık etmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda araştırmacılar, T2DM komplikasyonları ile AH patogenezindeki yolların biyokimyasal, moleküler ve histopatolojik yönden benzerlikler gösterdiğini ortaya koymuşlardır [202-206]. İnsulin reseptör sinyal yolları A β üretiminde görev alarak AH oluşumunda doğrudan etkili olabileceği bildirilmiştir [207]. Bu nedenle AH, Tip 3 DM (T3DM) ve/veya beyine özgül diyabet olarak adlandırılmıştır [208].

T2DM'un, AH'nın erken evresinden başlayarak etkilediği ve hastalığın patogenezinin ilerlemesine aracılık ettiği yollar tam olarak aydınlatılamamıştır. Günümüzde, 1) insulin direncine bağlı olarak glukoz metabolizmasında görev alan Akt proteininin fosforilasyonu baskılanarak, GSK3 β -aracılı tau fosforilasyonunun artırılması [204]; 2) hiperinsulinemi durumunda insulini parçalayan enzim (IDE) için insulin ve A β 'nin yarışması sonucu A β 'nin birikimi [209, 210]; 3) ER stresine bağlı olarak yanlış katlanmış proteinlerin birikimi [211]; 4) Oksidatif stres ve inflamasyon [154, 212, 213]; 5) Lipid metabolizmasının bozulması sonucunda oluşan peroksidasyon ürünleri olan 4-HNE düzeylerinin artması [212, 213]; 6) Glukoz

metabolizmasının oksidatif son ürünleri olan AGE düzeylerinin artması, AH ve T2DM komplikasyonlarının temel ortak yolakları olarak tanımlanmıştır [214].

Moleküler olarak DM ve AH arasındaki ilişki Resim 2.4'te özetlenmiştir. DM, obezite kronik inflamasyon ile karakterize patolojiler olup tüm doku ve organları etkilemektedir. İnflamatuvar sitokinler reseptörlerine bağlanarak (1) nüklear faktör kappa B ($\text{NF-}\kappa\text{B}/\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) yolağını uyararak proinflamatuvar yanıtın başlamasına aracılık etmektedir (2). Besin dengesizliğine bağlı olarak inflamatuvar yolakların yanı sıra DNA hasarı oluşur ve redoks modülasyonun ortadan kalkması ile glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon (GSH) ve okside GSH (GSSG) düzeyleri azalarak oksidatif stres uyarılmaktadır (3). Benzer şekilde pankreatik β -hücreleri besin dengesizliğine bağlı olarak glikoliz sekteye uğrayarak gliseraldehit-3fosfat dehidrogenaz (GAPDH) aktivitesi azalıp indirgenmiş piruvatın oksidasyonu başlar, ATP üretiminde azalma meydana gelir (4). Metabolik disfonksiyona bağlı olarak süperoksit ve takiben hidrojen peroksit oluşumu uyarılır, nitrik oksit varlığında ise peroksinitritler oluşarak nitrozatif stres gerçekleşir. Elektron transport zincirinde (ETZ) fonksiyon kaybına bağlı olarak ATP sentezi azalmaya devam eder (5). Bu süreçler endoplazmik retikulum (ER) stresi ile birleşerek insulin salgılanması baskılanır (6). Yüksek oranda dolaşan glukoz, lipid ve kronik inflamasyon amiloid beta ($\text{A}\beta$) agregatlarının oluşumunu uyarır ve insulin direncine bağlı olarak nöronal hücrelere glukoz transportu azalır (7), glikojen sentaz 3 beta (GSK 3 β) aktivitesi artırılır (8). Artan GSK 3 β ile birlikte tau hiperfosforilasyonu uyarılır (9). Diğer yandan ROS/RNS ve $\text{A}\beta$ aracılığıyla TCA döngüsünde görev alan alfa enolaz (ENO1), malat dehidrogenaz (MDH), ATP sentaz ve GAPDH enzimleri baskılanarak ATP sentezi azaltılır ve fosforile tau aracılı apoptoz uyarılmaktadır (10) [215] .



Resim 2.4. DM ve AH patogenezi ile ilişkilendirilen mekanizmalar [215].

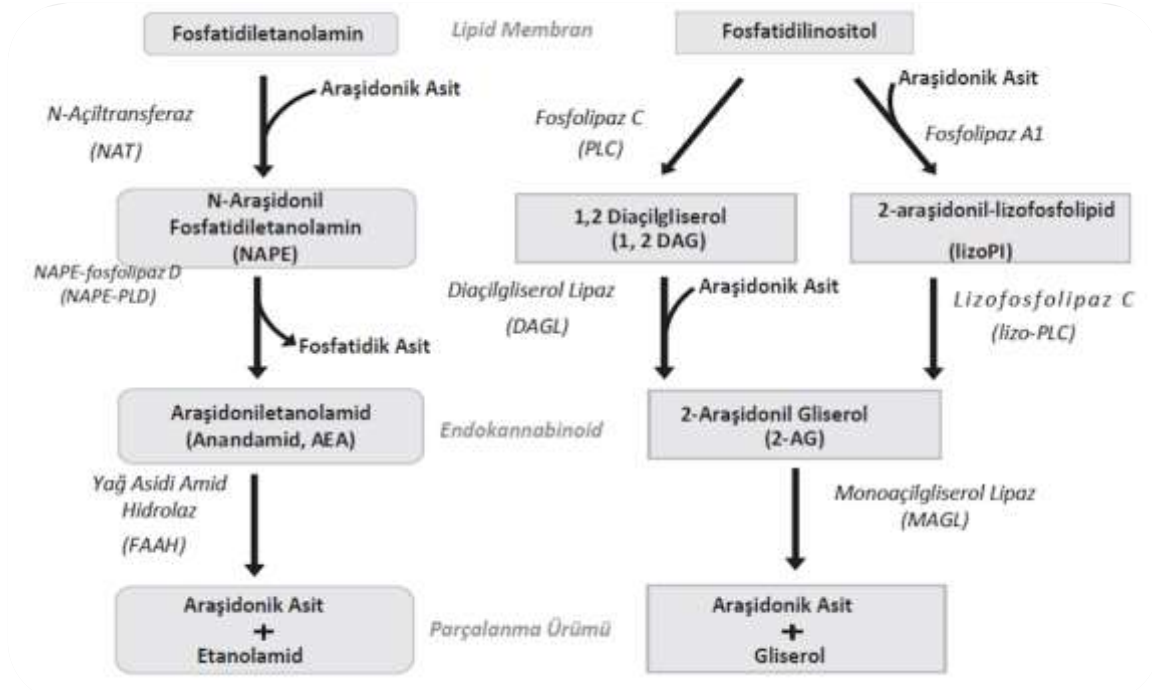
2.6. Endokannabinoid Sistem

Cannabis sativa, eski çağlarda ve geleneksel Çin tıbbında iyileştirici olarak adlandırılmış ve astım, malaria, gut, nevrojji, konvüzyonların hafifletilmesinde kullanılmıştır [216, 217]. 20. yüzyıldan itibaren ise içerisindeki bileşenler aydınlatılarak kannabinoidler olarak adlandırılmıştır. *Cannabis sativa* bileşiminde, 500'den fazla farklı fitokimyasal bileşik içeren ve bu bileşenlerin 85'ten fazlasını kannabinoidlerin oluşturduğu bir bitkidir [218]. Bitkisel kannabinoidler içerisinde psikoaktif Δ^9 -tetrahidrokannabinol (THC) ve non-psikotik kannabidiol (CBD) en yaygın bulunan türevler olup, hücrelerde kendilerine özgül reseptörlere bağlandığının gösterilmesiyle, endojen kannabinoidlerin (endokannabinoid) varlığı da aydınlatılmıştır [219-221]. 2005 yılında, multiple sklerozda görülen ağrı ve spastisitenin giderilmesinde THC ve CBD içeren Nabiximol preparatının onaylanması ile kannabinoid profilili ilaç araştırmaları hız kazanmıştır [222].

Endokannabinoidler, endokannabinoid sistem adı verilen bir sistem dahilinde sentezlenerek, metabolize olan ve kendine özgül reseptörlere bağlanarak etki göstermektedir [223]. Klasik nörotransmitterlerden farklı olarak endokannabinoidler, gelen uyarana bağlı olarak postsinaptik olarak sentezlenip hızlı bir şekilde salgılanarak presinaptik olarak etkilerini oluşturmaktadır. Sinaptik aralıkta gerçekleşen bu olaya retrograd salgılanma adı verilmektedir [224]. Retrograd salgılanma sonucunda endokannabinoidler, presinaptik yerleşim gösteren kannabinoid reseptörlerine (CBR) bağlanarak eksitator veya inhibitör sinapslardaki hızlı ve/veya uzun süreli nörotransmitter salgılanmasını baskılamaktadırlar. Diğer nörotransmitterlerden farklı olarak endokannabinoidler, bir uyarın varlığında membran prekürsörlerinden hareketle sentezlenip veziküller içerisinde depolanmadan direk etki göstermektedir [225].

Endokannabinoid sistem, hücre ölümü-sağkalımı, immün yanıtın oluşması, nöronal hücrelerin olgunlaşması, nöronal iletim, metabolik ve üreme gibi birçok fonksiyonun düzenlenmesinde görev almaktadır [225]. Endokannabinoid sistem elemanları, vücutta ve özellikle MSS'de yaygın dağılım gösteren fosfolipid-türevi nöronal düzenleyicilerdir.

Endokannabinoid ailesinin, etanolamin ve araşadinoik asidin bir türevi olan anandamid (araşidoniletanolamin, AEA) ve AEA'nin gliserol esteri olan 2-araşidonigliserol (2-AG) olmak üzere iki ana bileşeni bulunmaktadır. AEA ve 2-AG presinaptik membranda yer alan fosfolipidlerin enzimatik kesimi sonucunda oluşmaktadır. AEA, N-açıl-fosfatidil-etanolaminin (NAPE), fosfolipaz D (PLD) ile hidolize edilmesi ile; 2-AG ise fosfatidilinositol 4,5-bifosfatın(PIP₂), fosfolipaz C (PLC) veya PLD ile hidrolize edilerek diaçilgliserol (DAG) oluşumu sırasında meydana gelmektedir. Oluşan DAG, DAG lipaz aracılığı ile 2-AG'ye dönüştürülmektedir (Resim 2.5) [226].

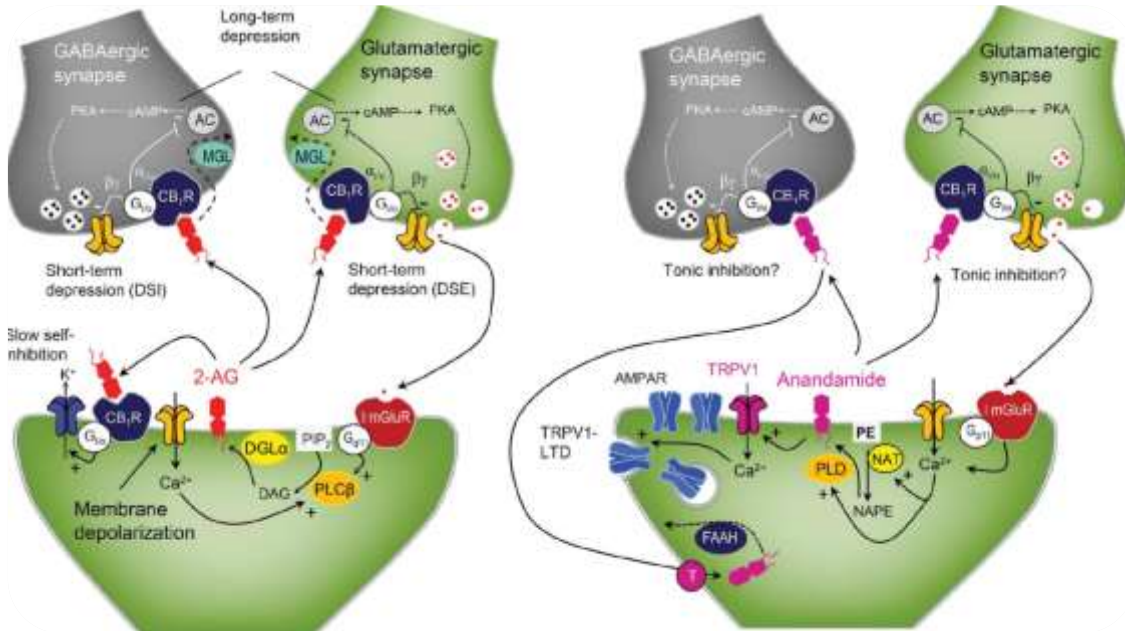


Resim 2.5. Endokannabinoidlerin sentez ve hidroliz şeması [227]

Endokannabinoidler, endotelial hücreler, adipositler, glial hücreler ve makrofajlar gibi birçok hücre tarafından üretilabilmektedir. 2-AG, çoğunlukla beyin dokusunda lokalize olmakta ve CB₁ ve CB₂ reseptörlerinin tam agonisti olarak etki göstermektedir. AEA ise CB₁ reseptörünün parsiyel agonisti gibi davranmaktadır. Bu reseptörler dışında kannabinomimetikler, peroksizom proliferatör aktive edilmiş alfa reseptörleri (PPAR-α), transient reseptör potansiyeli vanniloid-1 (TRPV1) kanallarını ve GPR55, GPR119 gibi yetim (orphan) endokannabinoid reseptör ailesinin yeni üyelerini de aktive etmektedir [228]. CB₁ reseptörleri G-proteini kenetli reseptör ailesinden (GPCR) olup başta serebellum, korteks, hipokampus, ve bazal ganglia olmak üzere beyinde yaygın olarak ifadelenmektedir [225]. Kalp, vaz deferans, mesane ve incebağırsak gibi periferel organlarda da CB₁ reseptörlerinin ifadelendiği gösterilmiştir. Öte yandan, yaygın olarak periferel yerleşim gösteren kannabinoid reseptörlerine ise CB₂ reseptörleri adı verilmiştir [229-231]. CB₂ reseptörleri periferel sistemde yaygın olarak dağılım göstermesi ve özellikle bağışıklık sistemindeki rolleri ile önem kazanmıştır. Yapılan çalışmalar ile birlikte, CB₂ reseptörlerinin MSS'de de özellikle inflamasyon aracılı yollarda da görev aldığı belirlenmiştir [229, 230]. MSS'de mikrogialar ve astrositler üzerinde ifadelenen CB₂ reseptörlerinin, yalnızca inflamasyona bağlı uyarılmış hücrelerde düzeylerinin arttığı belirlenmiştir [225, 229-232].

CBR'ler, hücre sağkalımı, proliferasyon, epigenetik düzenlenim, migrasyon, farklılaşma ve olgunlaşma gibi birçok süreçte görev almaktadır. CBR'ler bu etkilerini $G_{i/o}$ protein kenetli reseptöler olması ile hücre içinde, a) adenilat siklaz ve siklik MAP kinaz inhibisyon (PKA); b) hücre dışı sinyal ile regüle edilen kinaz (ERK1) ve ERK2 aktivasyonu; c) p-38 MAPK ve Jun-N-terminal kinaz aktivasyonu; d) fosfatidil inositol 3-kinaz-Akt-mTOR (PI3K/Akt/ mTOR) aktivasyonu yaparak hücre homeostazında görev almaktadır [233]. Ayrıca çoğunlukla CB1R aracılığıyla uyarılabilir hücrelerde membran potansiyelinin düzenlenmesinde Ca^{2+} ve K^+ kanallarının geçirgenliğini doğrudan kontrol etmektedir [234, 235].

Post sinaptik hücrede, Ca^{2+} girişine bağlı olarak AEA ve 2-AG sentezi gerçekleşir. Sentezlenen endokannabinoidler presinaptik nöronda CB1R'leri aktive eder. Aktive olmuş CB1R, GABAergic nöronlarda depolarizasyon kaynaklı baskılanmış inhibisyonu (DSI) engelleyerek kısa süreli depresyona (STD) aracılık etmektedir [236, 237]. Öte yandan glutamerjik nöronlarda depolarizasyon kaynaklı baskılanmış eksitasyonu (DSE) engelleyerek kısa/uzun süreli depresyonu (LTD) uyarmaktadır. Ayrıca AEA, postsinaptik TRPV1 reseptörleri üzerinden eksitator nöronlarda LTD oluşumuna aracılık etmektedir [238] (Resim 2.6).



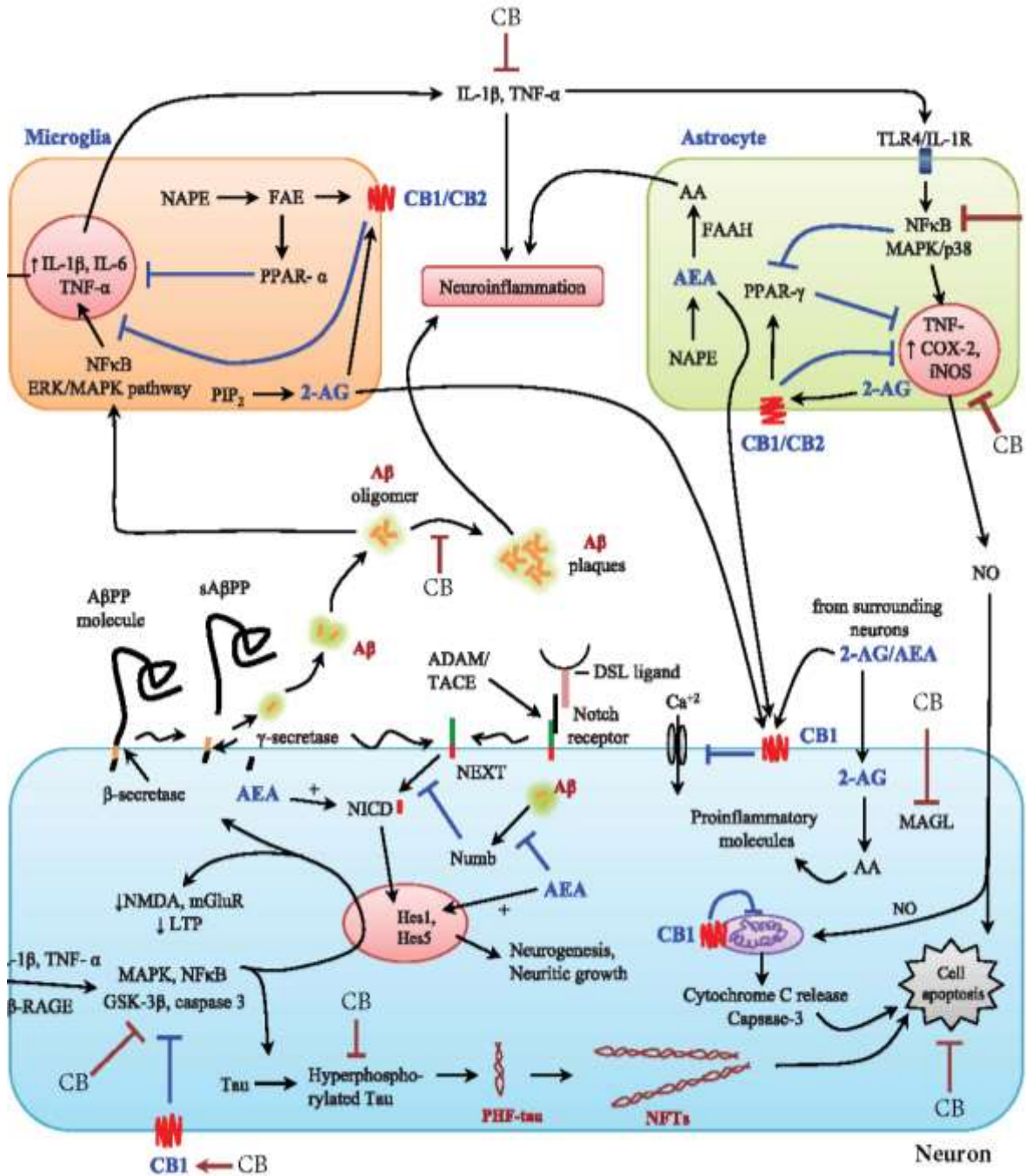
Resim 2.6. Endokannabinoid sistemin sinaptik iletimdeki rolü [238]

2.7. Alzheimer Hastalığı (AH) ve Endokannabinoid Sistem (EKS) İlişkisi

AH'da aşırı miktarda oluşan A β peptidler, öncelikle çözünür oligomerlere ve ardından çözünemeyen ekstraselüler senil plaklara dönüşmektedir. Çözünür A β oligomerleri, fibriller A β peptidlere benzer şekilde nörotoksik etkilerden sorumludur [239-242]. A β plakları nörotoksik etkilerini meydana getirirken nöroinflamatuvar süreçleri de uyarmaktadır [243, 244]. Beyinde nöroinflasyondan sorumlu olan glial hücrelerin uyarılmasıyla inflamatuvar mediyatörler ve nörotoksik serbest radikaller salgılanmaktadır [245, 246]. Aktive olan mikrogial hücreler A β agregatlarının etrafını sararak bir yandan fagositoz ile agregatların uzaklaştırılmasını sağlarken, diğer yandan inflamatuvar sürece katkıda bulunur [247]. Fagosit edilemeyen A β peptidler, Src ve Syk tirozin kinazları uyarmaktadır [248]. Uyarılan bu kinazlar, MAPK ve nükleer faktör κ B (NF κ B) yollarını aktive ederek inflamatuvar yanıt ve ROS oluşum süreçlerini başlatmaktadır [245]. Benzer şekilde A β peptidler, doğrudan MAPK yolağı ve ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz (ERK) yollarını da uyarabilmektedir [249]. Bu şekilde birçok yolağın aktive olması sonucunda A β aracılı inflamatuvar süreçlerin belirteci olan IL-1 β ve Tnf- α salgılanarak AH'da görülen kronik inflamasyon gerçekleşir [250]. Glial hücrelerden salgılanan IL-1 β , astrosit ve nöronlarda MAPK ve NF κ B yollarını aktive ederek nöroinflamasyonun şiddetini ve tau fosforilasyonunu artırmaktadır [245, 250]. Ayrıca A β oligomerleri, uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enziminin üretimini artırarak astrositlerden nitrik oksit (NO) ve Tnf- α salgılanmasını uyarmaktadır [251]. Diğer yandan, hücrel bağışıklık sisteminin aktivasyonu ve patojenlerin tanınmasında görev alan toll-benzeri reseptör 4 (TLR-4) aktivasyonu da benzer yolları kullanarak sinaptik plastisitenin baskılanmasına aracılık etmektedir [252, 253]. Hücrel stres yollarının başında gelen p38-MAPK yolağı, NMDA ve metabotropik (mGLU) glutamat reseptörlerinin aşırı çalışmasına bağlı olarak LTP inhibe edilmesinde görev almaktadır [254, 255]. MAPK yolağının diğer bir uyarıcı ise ileri glikasyon son ürünü reseptörleri olan RAGE yolağıdır. RAGE reseptörlerine A β plakları bağlanması ile MAPK yolağı uyarılarak tau fosforilasyonunda artış ve LTP'de azalma meydana gelmektedir [245].

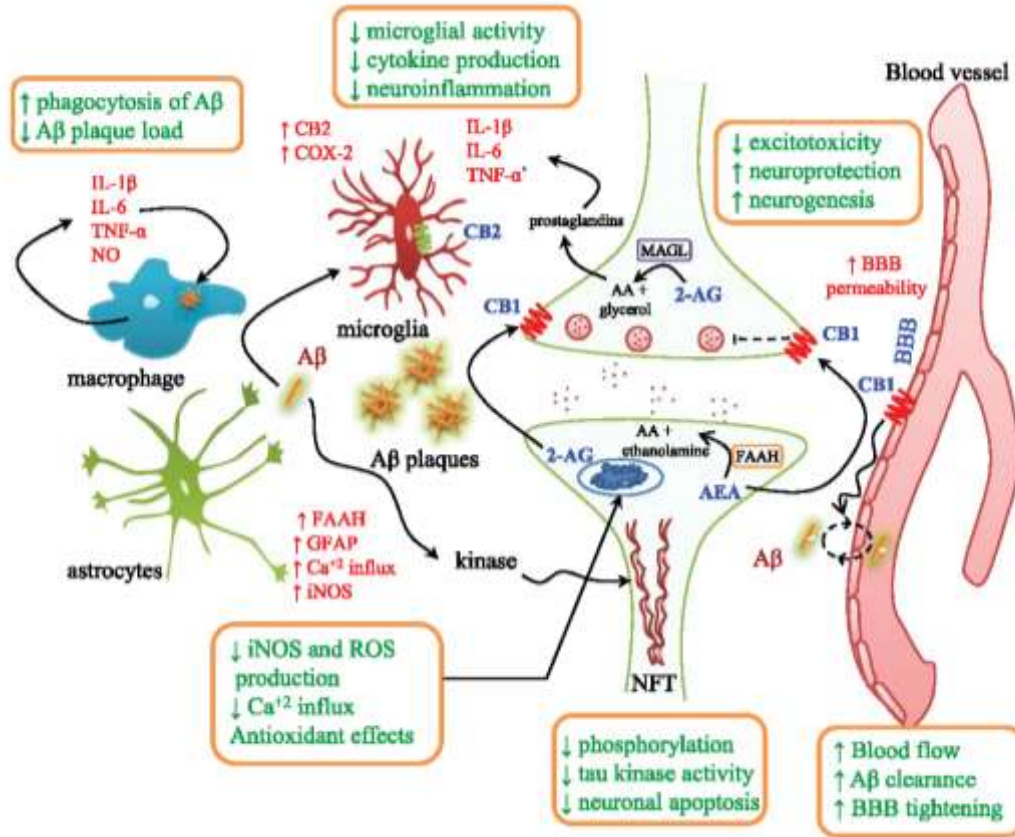
AH'da görülen, inflamasyon ve stres koşulları altında glial hücrelerden (mikroglia, astrosit) endokannabinoidlerin sentezi uyarılır ve endokannabinoidler CB1R/CB2

ve PPAR reseptörleri üzerinden iNOS, COX-2 ve proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını baskılamaktadır [256]. Ayrıca AEA, Notch-1 sinyalizasyonunu uyararak nörogenez, nörit oluşumu ve nöronal ağın oluşumuna aracılık etmektedir. Mitokodrial CB1 reseptörlerinin uyarılması ile mitokodrial apoptotik belirteçlerin salgılanması inhibe edilerek, ROS oluşumuna bağlı hücre içine Ca^{2+} girişi engellenmiş olur. Bu şekilde endokannabinoidler, antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkileri ile AH progresyonunu baskılayabilmektedir [19].



Resim 2.7. Endokannabinoid sistem ve AH ilişkisinin moleküler mekanizması [19]

Endokannabinoid sistemde CB2R aktivasyonu ile AH'da mikroglial aktivasyona bağlı olarak artan proinflatuvar sitokinlerin seviyeleri baskılanmaktadır. CB1R üzerinden ise A β 'nın MSS'den uzaklaştırılması, tau hiperfosforilasyonu ve mitokondriyal disfonksiyon baskılanarak protektif etki gözlenmektedir [19] (Resim 2.8)



Resim 2.8. Endokannabinoidlerin AH patogenezindeki protektif rolü[19]

AH ile kannabinoid sistem arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılamamış olsa da son yıllarda yapılan çalışmalar AH'nın tedavisinde alternatif yaklaşımlar getirilmesine olanak sağlamıştır.

In vitro koşullara kannabidiol, glutamat nörotoksitesine karşı, kannabinoid reseptörlerinden bağımsız olarak nöroprotektif ve antioksidan etkiler oluşturmaktadır [257, 258]. PC12 nöronal hücrelerde kannabidiol, A β uygulanmasından sonra sağkalım oranını artırarak, ROS üretimini ve lipid peoxidasyonu düşürmektedir. Öte yandan kannabidiol, amiloid- β 'nın indüklediği

tau hiperfosforilasyonunu ve ifadelenmesini, ayrıca inflamatuvar belirteçleri inhibe ederek A β aracılı nöroinflamatuvar yanıtı azaltır [259]. AH gibi nörodejeneratif hastalıkları kontrol etmek için yapılan araştırmalarda kannabidiol'ün nöroprotektif potansiyeli pozitif sonuçlar [260, 261].

Kannabidiol'ün antioksidan etkisinin mekanizmasını aydınlatmaya yönelik yeni çalışmalarda, kannabidiol'ün oksidatif stresi kontrol edebilmek ve homeostazı sağlamak için endojen antioksidan savunmayı arttırdığını gösterilmiştir. Kannabidiol, bir transkripsiyon faktörü olan nükleer NF-E2 ilişkili faktör-2 (Nrf2)'nin tetiklediği sinyal yollarını indükleyerek SOD sentezini artırmakta ve p38 ve NFkB düzeyini azaltarak nöroprotektif etki göstermektedir [17, 262, 263].

Nöroprotektif etkileri en çok çalışılan kannabinomimetik olan AEA, mitokondriyal oksidatif fonksiyonların düzenlenmesinde aktif rol almaktadır [17]. 2-AG ise CB1R reseptörlerini aktive ederek STAT3 aracılığı ile serebral iskemiye karşı koruyucu özellik göstermektedir [264]. Antioksidan özellikleri olan CBD ve benzerlerinin A β aracılı nörodejenerasyona karşı korumadıkları gösterilmiştir [265]. CB1R/CB2R tam agonisti olan WIN 55,212-2, sitriatal doku ve beyin sinaptozomlarında oksidatif mitokondriyal disfonksiyonu azaltırken, elektron transport zincir kompleksini de inhibe etmektedir [266]. Benzer şekilde CB1R/CB2R tam agonisti olan CP 55-940, eksitotoksisite karşısında kısa süreli mitokondriyal disfonksiyonu geri çevirmekte ve oksidatif belirteçleri düzeltmektedir [17], FAAH inhibitörü olan URB597, retinal ganglion hücrelerini korumaktadır [267].

Mevcut bu literatür bulgularına rağmen, kannabinomimetiklerin redoks stres aracılı inflamatuvar nörodejenerasyona karşı etki ve etki mekanizmaları henüz bilinmemektedir. Son yıllardaki gelişmelere rağmen, geniş bir kimyasal grubun üyesi olan endojen ve sentetik kannabinomimetiklerin etki ve etki mekanizmalarının araştırılmasına yönelik çalışmalarda genellikle benzer yollar üzerine odaklanılmış, buna karşın birçok mekanizma ile ilişkili olan redoks strese bağlı dejeneratif yolların araştırılması ve bu yolların hedeflenerek patolojinin önlenmesine yönelik araştırmalar yetersiz kalmıştır.

Bu doktora tez projesi kapsamında, farklı kannabinoid grubundan bileşikler ile oksidatif/nitrozatif stresin aracılık ettiği inflamatuvar nörodejenerasyon modelinde, kannabinomimetiklerin reseptör bağımlı- ve bağımsız nöroprotektif etki mekanizmalarının araştırılması, redoks yollar ve sinyal proteinleri ile etkileşimin kannabinoid-aracılı nöroproteksiyondaki rolünün test edilmesi amaçlanmıştır. Buna ek olarak, DM ve AH arasındaki ilişkiyi değerlendirmek üzere primer hipokampal nöron hücre kültürlerinde oksidatif/nitrozatif stres, nöroinflamasyon ve mitokondriyal disfonksiyonun eşlik ettiği glukolipotoksisite ve A β aracılı *in vitro* DM-AH oluşturulması ve karakterizasyonu ile model çalışması gerçekleştirilmiştir.

Oluşturulan DM-AH modelinde, 1) endokannabinoid grubu bileşikler olan anandamid (AEA) ve 2-araşidonilgliserol (2-AG), sentetik kannabinoid reseptör agonistleri WIN 55,212-2 ve CP 55,940, ve endokannabinoid sistem modülatörü olan URB-597 bileşiğinin potansiyel nöroprotektif etki ve etki mekanizmalarının araştırılması, 2) endokannabinoid sistem-redoks modülasyon-nöroinflamasyon ekseninde DM-AH'nı modifiye edecek terapötik bir yaklaşım sağlanması, 3) inflamatuvar nörodejenerasyonda kannabinoid sistemin rolünün aydınlatılması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Makine ve Teçhizatlar

Deneyisel aşamalarda, sınıf II biyolojik güvenlik kabini (Nuve, Türkiye), CO₂ inkübatör (Sanyo, Japonya), Modulus™ Microplate Multimode Reader (Turner BioSystems, ABD), mikrolaka okuyucu (PowerWave XS, Biotek, ABD), RTCA iCELLigence System (ACEA Biosciences, ABD), sıvı azot tankı (Cytogenics, İngiltere), -86°C ve -20°C derin dondurucu (Sanyo, Japonya), soğutmalı mikrosantrifüj (Micro 200R, Hettich, Almanya), soğutmalı santrifüj (Rotina 420R, Hettich, Almanya), ortam sterilizatörü (Virobuster Steribase 300 plus, Almanya) Inverted Microscope Leica DM6000/ Leica DFC420 kamera (ABD), mikrolaka yıkayıcı (ELX50, Biotek, ABD), BioShaker (Biosan MultiBio 3D, Letonya), combi-spin vortex (Biosan, Letonya), kuru blok ısıtıcı (Biosan, Letonya), Western blot-Trans Blot sistemi (Biorad, ABD), güç kaynağı (Biorad, ABD), GBOX Chemi XRQ Chemiluminescence and Fluorescence Imaging System (Syngene, İngiltere) cihazları kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Kit, Kimyasal ve Sarf Malzemeler

Deneyisel aşamalarda Beta Amyloid Peptide 1-42 (A β 1-42, mouse, rat) (Anaspec, Belçika); Hibernate A, Neurobasal A, B-27™ Supplement (50X), Glutamax (100x), At Serumu (HS, Yeni Zelanda menşei) ve Fötal Sığır Serum (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD); Papain ve deoksiribonukleaz 1 (DNAz 1) (Worthington Biochemical Corporation, ABD); N21-MAX Media Supplement (50X) (R&D Systems Inc., Kanada). Penisilin/streptomisin (100x), gentamisin sülfat (10 mg/ml) ve amfoterisin B (100X) (Biowest, Fransa); Poly-D-lizin hidrobromit (mol wt 70,000-150,000), sitozin β -D-arabinofuranozid, D-mannitol ($\geq 98\%$), dimetil sülfoksit (DMSO) ve 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma Aldrich, ABD); Anandamide (AEA), 2-arachidonylglycerol (2-AG), WIN 55,212-2 mesylate, URB597, CP 55,940 (Tocris, İngiltere); Rat Advanced Glycation End Products (AGE) ELISA kit, Rat 4-Hydroxynonenal (HNE) ELISA kit, Rat Super Oxidase Dimutase (SOD) ELISA kit, Rat Catalase (CAT) ELISA kit, Rat Glutathione Peroxidase (GPx) ELISA kit ve Rat Glutathione Reductase (GRx)

ELISA kit Bioassay Technology Laboratory (Çin) firmasından ithal edilmiştir. Rat inducible nitric oxide synthase (iNOS) ELISA KIT ve Rat 3-nitrotyrosine (3-NT) ELISA Kit Cusabio Technology LLC (ABD) firmasından; Rat IL-1 beta ELISA Kit ve Rat TNF alpha ELISA Kit ise Boster Bio (ABD) firmasından ithal edilmiştir. D-(+)-Glukoz, MP Biomedicals (İsveç); 2',7'-Diklorodihidrofluorescein diasetat (DCFH-DA) Cayman Chemicals (ABD) firmasından ithal edilmiştir. RIPA Tamponu (10X) Cell Signaling Technology Inc. (ABD); Pierce BCA Protein Assay Kit Thermo Fisher Scientific (ABD) firmasından ithal edilmiştir. Kullanılan diğer tüm plastik sarf malzemeleri belirtilmediği takdirde Corning (ABD) firması veya alt firması olan Axygen Inc. (ABD) firmasından ithal edilmiştir.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Hipokampus dokusu izolasyonu ve primer hipokampal nöron kültürü

Çalışmamızda 18-19 günlük gebe Wistar albino cinsi dişi sıçanlar, Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu onayı alınarak ve Laboratuvar Hayvanları Bakım ve Kullanımı Temel İlkeleri esas alınarak kullanılmıştır (Etik Kurul Onay No: G.Ü. 16.081). Sıçanlar, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (GÜDAM), fetüslerin alınacağı güne kadar serbest yem, serbest su ile beslenerek ve sıçanların sirkadyen ritmine (12 saat aydınlık: 12 saat karanlık) uygun olacak şekilde barındırılmışlardır. Hipokampal hücreler, embriyonik yaşı 18-19 olan (E18-E19) Wistar albino sıçan fetüslerinden izole edilmiştir. Kısaca, gebe Wistar albino sıçanlara intramusküler ketamin (45 mg/kg) ve ksilazin (5 mg/kg) enjeksiyonu ile anestezi altında batin bölgesine açılan insizyon ile ovaryektomi yapılarak E18-E19 fetal sıçanlar alınmıştır. Elde edilen E18-E19 sıçanlar servikal dislokasyon ile feda edilerek kafatasları açılmış ve beyin dokusu açığa çıkarılmıştır (Resim 3.1).



Resim 3.1. Hipokampus dokusunun elde edilmesi amacıyla, gebe sıçana açılan insizyon ile ovaryektomi yapılması ve alınan E18-E19 sıçanların hafif anestezi altında servikal dislokasyon sonucu beyin dokusunun izolasyonu

E18-E19 fetal sıçanların beyin hemisferleri sagittal insizyon ile iki yana ayrılarak hipokampus dokuları görünür hale getirilmiş, işlem sırasında 1X fosfat salin tamponu (PBS) ile yıkama yapılarak hipokampusların kandan temizlenmesi sağlanmıştır. Hipokampuslar C şeklinde opak görünüşleri sayesinde çevre dokulardan ayrılarak ekstrakte edilmiştir. İzole edilen hipokampus dokuları, Hibernate A ve B27 ile desteklenmiş PBS içeren falkonlara aktarılarak, alışmanın devam edeceği yer olan laminar kabin içine getirilmiştir [268]. Falkondaki hipokampus dokularına pastör pipeti yardımıyla hafifçe pipetaj yapılarak daha küçük parçalara ayrılması sağlanmıştır. Materyal PBS ile 500 rpm'de 10'ar dk süresince 3 kere yıkanmıştır. Kontaminasyon riskini önlemek için yıkama amacıyla kullanılan PBS'e de %0,5 P/S, %0,5 gentamisin ve %0,05 amfoterisin B eklenmiştir. Yıkama işleminin ardından PBS ortamdan uzaklaştırılmış ve daha sonra falkonlara yaklaşık 6-8 ml papain (2 mg/mL, Hibernate A) enzim solüsyonu eklenmiştir. Papain enzim solüsyonu eklendikten sonra, 15 ml'lik falkonlar etüv içinde dik duracak şekilde, 30 °C'de 30 dakika (dk) süresince inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda 40-60 µl DNAz 1 (2 ünite/uL) ortama eklenerek, 30 °C'de 12 dk daha bekletilmiştir [269]. Süre sonunda falkon tüpler etüvden alınmış ve pastör pipeti yardımıyla nazikçe pipetaj yapılarak enzimatik parçalanma hızlandırılmıştır.

Elde edilen süspansiyon, Hibernate A ile ıslatılmış hücre süzgeci (40 μ m) kullanılarak filtre edilmiş ve 50 ml'lik falkonlara aktarılmıştır [270]. Ardından, 1800 rpm'de 10 dk daha santrifüj uygulanıp, pelletin görülmesi üzerine süpernatant aspire edilerek uzaklaştırılmış ve %15 HI-HS, %5 HI-FBS, %2 B27, 0.5 mM Glutamax, %1 N21-Max, %0.5 Penisilin/streptomisin, %0.05 Gentamisin ve %0.5 Amfoterisin B desteği içeren Neurobasal A besiyeri (Çoğalma besiyeri) kullanılarak hücreler süspande edilmiştir. Bir gün önceden 10 μ g Poli-D-Lizin (PDL) ile kaplanmış olan petri kültür kaplarına çoğalma besiyeri eklenip, süspande edilmiş olan hücreler 37 °C'de %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir [271]. İnkübasyondan 6-8 saat sonra hücreler mikroskop altında incelenerek yapışmaların olduğu görülmüş, bunun üzerine çoğalma besiyerinin %50-60'ı uzaklaştırılarak, %3 HI-HS, %2 B27, 0.5 mM Glutamax, %1 N21-Max, %0.5 P/S, %0.05 Gentamisin ve %0.5 Amfoterisin B desteği içeren Neurobasal A besiyeri (Farklılaşma besiyeri) eklenmiştir [272]. Bu aşamada hücrelerin tamamının yüzeye yapışmadığı, yüzen hücrelerin olduğu görülmesi durumunda, ortamdaki alınen materyal falkonlara aktararak, santrifüj uygulanmış ve elde edilen pellet, farklılaşma besiyeri ile tekrar süspande edilerek petrilere aktarılmıştır. Bu aşamadan sonraki ilk besiyeri değişimi, primer hipokampal hücreler ekildikten 2 gün sonra gerçekleştirilmiştir. Nöron dışı glial hücrelerin büyümesini inhibe etmek amacıyla, kültürün 2. günü 1-5 μ mol/L AraC kültür ortamına eklenerek, arabinofuranozil sitozin C (AraC) nin 48 saat kültür ortamında kalması sağlanmıştır. 48 saat sonunda besiyeri yarı oranında değiştirilmiştir [273]. Bu aşamadan itibaren, mikroskopta hücre farklılaşması incelenerek stabil kültür elde edildikten (ortalama 7-15 gün) sonra moleküler çalışmalara başlanmıştır [274].

3.3.2. Deneyisel gluko-lipotoksisite ve Alzheimer hastalığı (AH) modelinin oluşturulması

Hiperglisemi modelinin oluşturulması sırasında primer hipokampal hücreler %70-80 doygunluğa ulaştıktan sonra, D-Glukoz'un (2.5 M; 1X PBS) farklı konsantrasyonları (25, 50, 75, 100 ve 150 mM) farklılaşma besiyerine ilave edilerek 24 veya 48 saat süreyle inkübe edilmiştir [275, 276]. Farklılaşma besiyeri (5 mM; D-Glukoz) normo-glisemik (NG) ortam, 25 mM D-Glukoz içeren besiyeri düşük-glisemik (LG) ortam olarak adlandırılırken; 150 mM D-Glukoz içeren

besiyeri hiper-glisemik (HG) ortam olarak tanımlanmıştır. Yüksek glukoz konsantrasyonuna bağlı hiperosmolar etkinin deneylerimize olan interferansından kaçınmak için 25 mmol/L mannitol, LG ortamına eklenmiştir. Primer hipokampal hücrelerde lipotoksik konsantrasyonun belirlenmesi için BSA ve palmitik asit (PAM) değişen oranlarda (PAM/BSA; 0.25:1, 0.5:1, 1:1, 2:1, BSA ile son konsantrasyon 0.150 mM olacak şekilde %1 FBS içerisinde çözülerek) tek başına 24 ve 48 saat süreyle uygulanmıştır [277]. Optimal glukotoksisite (HG) ve lipotoksisite (PAM) koşulları için gerekli süre ve konsantrasyonun belirlenmesi RTCA iCELLigence sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücrelerde glukolipotoksisite oluşturmak için besiyerine eklenmesi gereken GLU+PAM/BSA konsantrasyonu belirlenen süre ve konsantrasyon kullanılarak gerçekleştirilmiştir [277-281]. AH veya Hiperglisemik Alzheimer hastalığı (HG-AH) modeli için hücreler artan konsantrasyonlarda $A\beta_{1-42}$ (10 nM-4 μ M) veya HG ortamda 24 saat ve aynı koşullarda ortama $A\beta_{1-42}$ ilave edilerek 24 saat daha inkübe edilerek oluşturulmuştur. Endo- ve sentetik- kannabinoidler (%10 DMSO ile hazırlanmış 5 mM stok çözelti) 24 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda (1 nM- 25 μ M) besiyerinde seyreltilerek primer hücrelere uygulanarak olası sitotoksik etkileri incelenmiştir. Kannabinomimetiklerin, HG+ $A\beta_{1-42}$ modelindeki potansiyel terapötik/rejeneratif etkilerini değerlendirmek için ise hücreler kannabinomimetikler ile 6 saat ile koşullandırıldıktan sonra ortama HG, 24 saat süreyle ilave edilip ardından bu ortama $A\beta_{1-42}$, 24 saat süreyle eklenerek analizler gerçekleştirilmiştir.

3.3.3. Hücre canlılığı analizi

Konvansiyonel (4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (MTT) yöntemi, MTT boyasının mitokondriyal redüktazlar tarafından parçalanarak mor renkli formazan kristallerini oluşturması esasına dayandığından mitokondriyal metabolik aktivite hakkında da bilgi vermektedir. Kısaca, PDL ile kaplanmış 96'lık kültür kabına 3×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekilen hücrelere kannabinomimetikler ve nörotoksik ajanlar (GLU, PAM, $A\beta_{1-42}$) belirtilen konsantrasyonlarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, kültür ortamı uzaklaştırılarak taze besiyerinde hazırlanmış 10 μ L MTT çözeltisi (5 mg/ml; 1X PBS) ilave edilerek 4 saat 37 °C'de bekletilmiş ve süre sonunda formazan kristallerinin oluşup oluşmadığı inverted-mikroskop yardımıyla kontrol edilmiş (yaklaşık 4-6 saatte

kristal oluşumu gözlenmiştir) ve ardından besiyeri uzaklaştırılarak oluşan formazan kristalleri 100 µL DMSO'da çözündürülerek 570 nm'de mikropilaka okuyucuda absorban değerleri ölçülmüştür (Bio-Tek ELX800, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT). Okunan değerler kontrol gruplarının yüzde ifadesi olarak karşılaştırılmıştır. Sham kontrol gruplarına ajanların çözöldüğü DMSO veya PBS çözeltilerinin düşük konsantrasyonları (~%0.025) verilmiştir [282, 283].

İkinci yöntem olarak nötral kırmızı alım yöntemi (NR) kullanılmıştır. Nötral kırmızı boyama yöntemi kantitatif olarak canlı hücrelerin sayılmasına olanak sağlayan bir yöntem olup özellikle primer hücreler gibi metabolizması yavaş ve MTT, WST gibi mitokondriyal aktivitenin hakim olduğu, uzun sürede yanıt veren hücrelerde kullanılan bir prosedürdür [284]. Vital (canlı) boya sınıfında olan nötral red canlı hücreler tarafından alınarak lizozomal matrikse bağlanmaktadır. Bu şekilde membran bütünlüğü, lizozomal aktivite gibi konularda da bilgi edinilmesine olanak vermektedir. Kısaca, PDL ile kaplanmış 96'lık kültür kabına 3×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekilen hücreler toksik veya kannabinomimetikler ile belirlenen süre ve konsantrasyonda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücrelere, her bir kuyucuğa 40 µg/mL gelecek şekilde nötral kırmızı (4 mg/1 mL) stok çözeltisinden ilave edilerek 3-4 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Ardından hücreler soğuk PBS ile 3 defa yıkandıktan sonra, hücreler içerisindeki nötral kırmızı boyasını açığa çıkarmak için %50 etanol, %49 distile su ve % 1 glasiyal asetik asit içeren destain çözeltisi ile muamele edilmiştir. Elde edilen kırmızı-pembe renkli çözeltinin absoransı 540 nm'de mikropilaka okuyucuda ölçülmüştür (Bio-Tek ELX800, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT). Okunan değerler, sadece besiyeri ve nötral kırmızısı içeren gruplardan çıkarılarak, kontrol gruplarının yüzde ifadesi olarak karşılaştırılmıştır [284, 285].

3.3.4. Eş zamanlı hücre analizörü ile hücre impedansının ölçülmesi (RTCA iCELLigence)

Proliferasyon, sitotoksikite ve hücre adezyon profili gibi parametreler hakkında bilgi veren ve hücrelerin elektriksel alanına bağlı olarak oluşan direncin ölçülmesi esasına dayanan mikroelettronik biosensör iCELLigence eş zamanlı hücre analiz sistemi ile GLU ve PAM toksisitesi değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu değerlendirme,

tabanında mikroeletrod sistemi bulunan özel 8 kuyucuklu kültür kaplarına (E-Plate) ekilen hücrelerin adezyon, çoğalma profillerine göre birim alana düşen hücre veya yayılım profiline göre oluşan direncin ölçülmesi temelinde gerçekleştirilmiştir [286]. Kısaca, primer hipokampal hücreler poli-D-lizin (10 µg/mL) ile kaplanmış E-plate kültür kaplarına ekildikten sonra yaklaşık 8 saat 37 °C ve %5 CO₂'li ortamda inkübe edilerek yapışmaları sağlanmıştır. Ardından, E-plate kültür kapları RTCA iCelligence sistemine alınarak 37 °C ve %5 CO₂'li ortamda adaptasyon sürecine geçilerek 15 dakikalık periyotlarda ölçümler alınmıştır. Adaptasyon-alışma sürecinden sonra hücreler glukoz (25-150 mM) ile muamele edilerek yaklaşık 92 saat veya PAM/BSA (0.075-0.150 mM) ile 24 saat boyunca 15 dakika aralıklarla ölçüm yapılmıştır. Yapılan ölçümler adezyon ve/veya proliferasyon profilleri hakkında bağıl impedans değerleri olarak kaydedilmiştir [287, 288]. Düşük proliferatif özelliği olan farklılaşmış nöronların proliferasyon profilinden ziyade adezyon veya nöronal bağlantı profilleri hakkında bilgi edinilmektedir.

3.3.5. Glukotoksisite modeli oluşturulmuş primer hipokampal nöron hücrelerine oligomerik Aβ1-42 plaklarının uygulanması

Liyofilize haldeki amiloid beta vialı 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek rekonstitue (eşitleme) laminar kabin altında 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) çözeltisi yardımıyla 1 mM olacak şekilde çözündürülmüştür. Ardından şeffaf homojen bir çözelti elde edilene kadar vorteks işlemine tabi tutulmuş ve 18-24 saat (1 gece) vialin ağzı açık olacak şekilde laminar kabin altında, karanlık ortamda HFIP uçurulması sağlanmıştır. Bu şekilde monomer hale geçerek biofilm görüntüsü alan peptid -20 °C'de saklanmıştır. Ardından kullanılacağı zaman 5 mM konsantrasyonda olacak şekilde DMSO ile çözündürülerek alikuatlanmış ve bu şekilde monomerik yapıda peptid elde edilmiştir. Elde edilen bu monomerik peptidler kullanılacakları zaman -20 °C'den çıkarılarak çözündürülmüş ve 500 nM-8 µM konsantrasyonlarda besiyerinde seyreltilerek 24 saat 4 °C'de bekletilerek oligomerik agregatlar oluşturması sağlanmıştır.

3.3.6. Primer hipokampal nöron hücrelerinde hücre içi reaktif oksijen türevleri (ROS) düzeylerinin belirlenmesi

In vitro koşullarda oluşturulan diyabetik Alzheimer hastalığı modelinde (DM-AH) kannabinomimetiklerin hücre içi ROS düzeylerinde meydana gelen değişim 2',7'-diklorofluoresin diasetat (DCFH-DA) floresan probu kullanılarak değerlendirilmiştir. Kısaca, PDL ile kaplanmış 96'lık kültür kabına 3×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekilen hücrelere kannabinomimetikler ve nörotoksik ajanlar ile belirtilen konsantrasyonlarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücreler, 1X PBS ile yıkanarak taze besiyerinde her bir kuyucuğa 20 μ M DCFH-DA ilave edilerek 37°C'de 15-30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda PBS ile iki defa yıkama işlemini takiben DCF floresan ışması 488 nm eksitasyon ve 530 nm emisyonunda 15 dakikalık periyotlar içerisinde pozitif kontrol (H_2O_2 ; 1 mM, 15 dakika) grubu ışma verene kadar mikropilaya okuyucuda ölçülmüştür. Ölçülen değerler pozitif kontrol grubuna göre yüzde değişim olarak ifade edilmiştir. Deneyler 5-6 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir [289-291].

3.3.7. Thioflavin T (ThT) boyama yöntemi ile oligomerik amiloid-beta agregatlarının gösterilmesi

In vitro koşullarda oluşturulan diyabetik Alzheimer hastalığı modelinde (DM-AH) patogenezinde görülen A β agregatlarının, çekirdek (nüklear) veya çekirdek dışı (non-nüklear) yerleşiminin kannabinomimetikler varlığında meydana getirdiği değişim ThT yöntemi ile değerlendirilmiştir. Kısaca, primer hipokampal hücreler, kuyucuk başına 1×10^6 hücre olacak şekilde 6'lık kültür kaplarına ekilip belirlenen süre ve konsantrasyonlarda ajanlar ile muamele edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücreler 1X PBS ile 3 defa yıkanıp, %4 paraformaldehit (PBS içinde) çözeltisi ile oda sıcaklığında 15-20 dakika fiksasyon işlemine alınmıştır. Fikse olan hücreler 1X PBS ile 3 defa yıkandıktan sonra 1X PBS içerisinde hazırlanmış 10 μ M Hoechst 33342 (mavi-çekirdek boyası) ile 5 dakika oda sıcaklığında ve 1X PBS ile yıkama işleminden sonra 10 μ M ThT çözeltisi ile oda sıcaklığında 15-20 dakika muamele edilerek boyama işlemi yapılmıştır. 1X PBS ile 3 defa yıkama işlemi sonucunda floresan ışma veren hücreler Leica DM6000/ Leica DFC420 kamera sistemi ile en az 4 farklı alandan görüntü alınmıştır. Alınan görüntülerdeki

iki boyanın ışıma yoğunlukları Image J 1.50i (NIH, ABD) programı kullanılarak piksel analizi yapıp istatistiksel değerlendirme yapılmıştır [292-294].

3.3.8. Primer hipokampal nöron hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli ölçümü ($\Delta\Psi_m$)

In vitro koşullarda oluşturulan DM-AH patogenezinde görülen mitokondriyal fonksiyon kaybının değerlendirilmesi ve kannabinomimetiklerin bu potansiyelde meydana getirdiği değişimi incelemek üzere JC-1 mitokondriyal probu kullanılarak floresan boyama işlemi yapılmıştır. Kısaca, hücreler, 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde PDL (10 μg /mL) ile kaplanmış 24'lük kültür kaplarına ekildikten sonra kannabinomimetikler ve nörotoksik ajanlar ile inkübasyon işlemleri uygulanmıştır. Ardından, 1X PBS çözeltisi ile 2 defa yıkama işlemi yapıldıktan sonra besiyerinde seyreltilerek hazırlanmış 10 μM JC-1 (1 mM, DMSO) ile 20-30 dakika 37 °C'de karanlıkta inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonucunda hücreler 2 defa PBS ile yıkandıktan sonra floresan mikroskopta incelenmiştir. Leica DM6000/ Leica DFC420 kamera sistemiyle alınan görüntüler Leica LAS AF7000 software sistemi ile 485 nm eksitasyon, 525/ 590 nm emisyonunda incelenmiştir. Mitokondri membran potansiyelinin az olduğu apoptotik hücrelerde monomerik formda kalan JC-1 yeşil floresan verirken, sağlıklı hücreler j-agregatları oluşturarak kırmızı floresan vermektedir. Kırmızı/yeşil (agregat/monomer) floresan boyanma oranına bakılarak mitokondri membran potansiyelindeki değişim değerlendirilmiştir. Kırmızı ve yeşil renklerin piksel yoğunluğu Image J 1.50i programı kullanılarak ölçülerek istatistiksel değerlendirme yapılmıştır. Deneyler 4 tekrarlı olarak ve her kuyudan en az 6 görüntü alınarak gerçekleştirilmiştir [295, 296].

3.3.9. Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) ve Western Blot (WB) analizleri için hücrelerden protein izolasyonu

In vitro tedavi protokolleri uygulandıktan sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücreler 1X PBS ile 3 defa yıkandıktan sonra, hücreler total protein izolasyonu için RIPA tamponu (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, %0.1 SDS, %0.25 Na-deoksikolat, %2 Triton-X 100, 1 mM PMSF, and 2 μM leupeptin) veya çekirdek parçalayıcı çekirdek lizis tamponu (20 mM HEPES , pH 8.0, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM

NaCl, 1 mM DDT, 0.2 mM EDTA, 0.25 M Gliserol, proteinaz inhibitör kokteyli) ile buz üzerinde muamele edilmiştir. 15- 20 dakika +4 °C'de inkübe edilen hücreler petri kaplarından kazınarak, 1.5 mL'lik steril tüplere alınmıştır. Hücre pelleti problu sonikatör yardımıyla +4 °C'de parçalandıktan sonra, +4 °C, 12,000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası protein lizatını içeren süpernatant steril 1.5 mL'lik tüplere alınmıştır [297]. Protein miktar tayini, bikinkoninik asitin (BCA) proteinlerle etkileşerek renk vermesi esasına dayanan ve bu rengin 562 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldüğü BCA protein miktar tayini kiti kullanılarak uygulanmıştır. Okunan absorbans değerleri, BSA standartları kullanılarak oluşturulmuş kalibrasyon eğrisine göre µg/mL cinsinden hesaplanmıştır.

3.3.10. İntrensik antioksidan enzim aktivitesi (SOD, CAT, GPx ve GRx), oksidatif-nitrozatif stres ileri son ürünleri (AGE, HNE, 3-NT) ve inflamatuvar belirteçlerin (iNOS, IL-1β ve TNF-α) düzeylerinin ELISA yöntemi ile belirlenmesi

Hücrelerden izole edilen protein ve süpernatantlardan kit protokolleri esas alınarak analizler gerçekleştirilmiştir. Kısaca, proteinler (SOD, CAT, GPx, GRx, AGE, HNE, 3-NT, iNOS) veya süpernatantlardan (IL-1β, TNF-α) 50-100 µL örnekler alınarak, kit içerisinde yer alan emdirilmiş 96 kuyucuklu kültür kaplarında 2 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda, kuyucuklar 3 defa yıkama çözeltisi ile yıkanıp, biotin konjuge özgül antikorlar ile 1 saat 37 °C'de muamele edilmiştir. Tekrar yıkama işleminden sonra bağlanmamış birincil antikor uzaklaştırılıp, avidin-konjuge-HRP sekonder antikor ile 1 saat 37 °C'de inkübe edilerek, yıkama işlemi sonrasında kromojen substrat ve ardından durdurma çözeltisi ile muamele edilmiştir. Renk verme/değişimi esasına dayanan bu yöntemde, renk değişimi 450 nm 'de mikropilaka okuyucu yardımıyla absorbans verileri olarak ölçülmüştür (PowerWave XS2; BioTek Instruments Inc., ABD). Okunan absorbans değerleri, kit içerisinde yer alan standartlar kullanılarak oluşturulan absorbans-miktar kalibrasyon eğrisine göre hesaplanarak protein miktarlarına göre normalize edilmiştir. Enzim aktivitesi testleri için farklı zamanlarda (0, 15, 30 dakika) kinetik ölçüm yapılmıştır. Elde edilen değerler yüzde (%) değişim olarak sunulmuştur. Tüm ELISA analizleri en az iki tekrarlı çalışılmıştır.

3.3.11. Western Blot analizi

Toplam protein konsantrasyonları belirlenmiş olan protein lizatlarından, eşit miktarda (25-30 µg) olacak şekilde protein karışımı alınarak, 5X Laemmli yükleme tamponu (%10 SDS, 20% Gliserol, %0.01 Bromofenol mavisi, 0.3125M Tris HCl pH:6.8) 4:1 oranında karıştırılarak, 5 dakika süresince 95°C'de proteinlerin denatürasyonu sağlanmış ve yükleninceye kadar +4 °C' de bekletilmiştir. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel (SDS-PAGE) elektroforez sistemiyle (Biorad), yükleme jeli (%4) ve büyük molekül ağırlıklı proteinler için %8-10 lük; küçük ve orta büyüklükteki antikorlar için %10-12lik SDS-PAGE ayırma jeli kullanılarak dikey elektroforez uygulanmıştır. Her bir kuyucuğa denatüre edilmiş protein örnekleri ve bir kuyucuğa boyalı peroksidaz işaretli protein moleküler ağırlık belirteci yüklenerek elektroforez işlemi önce 100 V'da 15 dakika ve ardından ayırma jelinde 120 V'da 1.5-2 saat +4 °C'de buz üzerinde yürütme işlemi uygulanmıştır.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra, metanol ile aktive edilmiş 0.2 µm poliviniliden florur (PVDF) membrana transferin gerçekleştirilmesi için poliakrilamid jel ile membran yüzeyleri arasında boşluk kalmayacak şekilde karşı karşıya getirilerek, filtre kâğıtlarıyla sarılmış bir şekilde transfer düzeneğine yerleştirilmiştir. Islak transfer sistemi kullanılarak 300 mA sabit akımında küçük molekül ağırlıklı proteinler için 1-1.5 saat, büyük molekül ağırlıklı proteinler için 2.5-3 saat 4 °C'de buz üzerinde transfer işlemi uygulanmıştır. Transfer etkinliğini değerlendirmek üzere membranlar %1 asetik asit içeren %0.1 Ponceau S çözeltisi ile muamele edilmiştir. Boyanın uzaklaştırılması için %0,1 Tween-20 eklenmiş tris-tamponlu tuz çözeltisi (1X TBST) ile yıkama yapılmıştır. Yıkama işlemi sonrası birincil antikorların özgül olmayan bağlanmasını engellemek için membranlar, 1X TBST içerisinde hazırlanmış %3 BSA çözeltisi ile 1 saat oda sıcaklığında bloklama işleminine tabi tutulmuştur. Bloklama işlemi sonunda membranlar %3 BSA içeren 1X TBST içerisinde seyreltilmiş anti-tavşan p-Nrf2 (1:300), anti-tavşan p-CREB (1:1000), anti-tavşan p-GSK3β (1:1000), tavşan β-Aktin antikorları ile 4 °C'de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda membranlar, 3 defa 5 dakika boyunca 1X TBST çözeltisinde yıkanmıştır. Yıkama işlemini takiben membranlar, %3 BSA içeren 1X TBST içerisinde seyreltilmiş HRP konjuge anti-tavşan IGG (1:2000) sekonder antikor ile oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. kübasyon

sonunda membranlar, 3 defa 5 dakika boyunca 1X TBST çözeltisinde yıkandıktan sonra kemilüminesan ışımaya veren kromojen substrat ile muamele edilmiştir. Elde edilen kemilüminesans ışımaya SYNGENE Marka GBOX Chemi XRQ görüntüleme sisteminde fotoğraflanarak bant görüntüleri kaydedilmiştir. Elde edilen bant görüntülerinin dansitometrik piksel analizi Image J 1.50i (NIH, ABD) programı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar β -Aktin bantlarına göre normalize edilerek verilmiştir. Western blot analizi her bir antikor için en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir [282, 295]

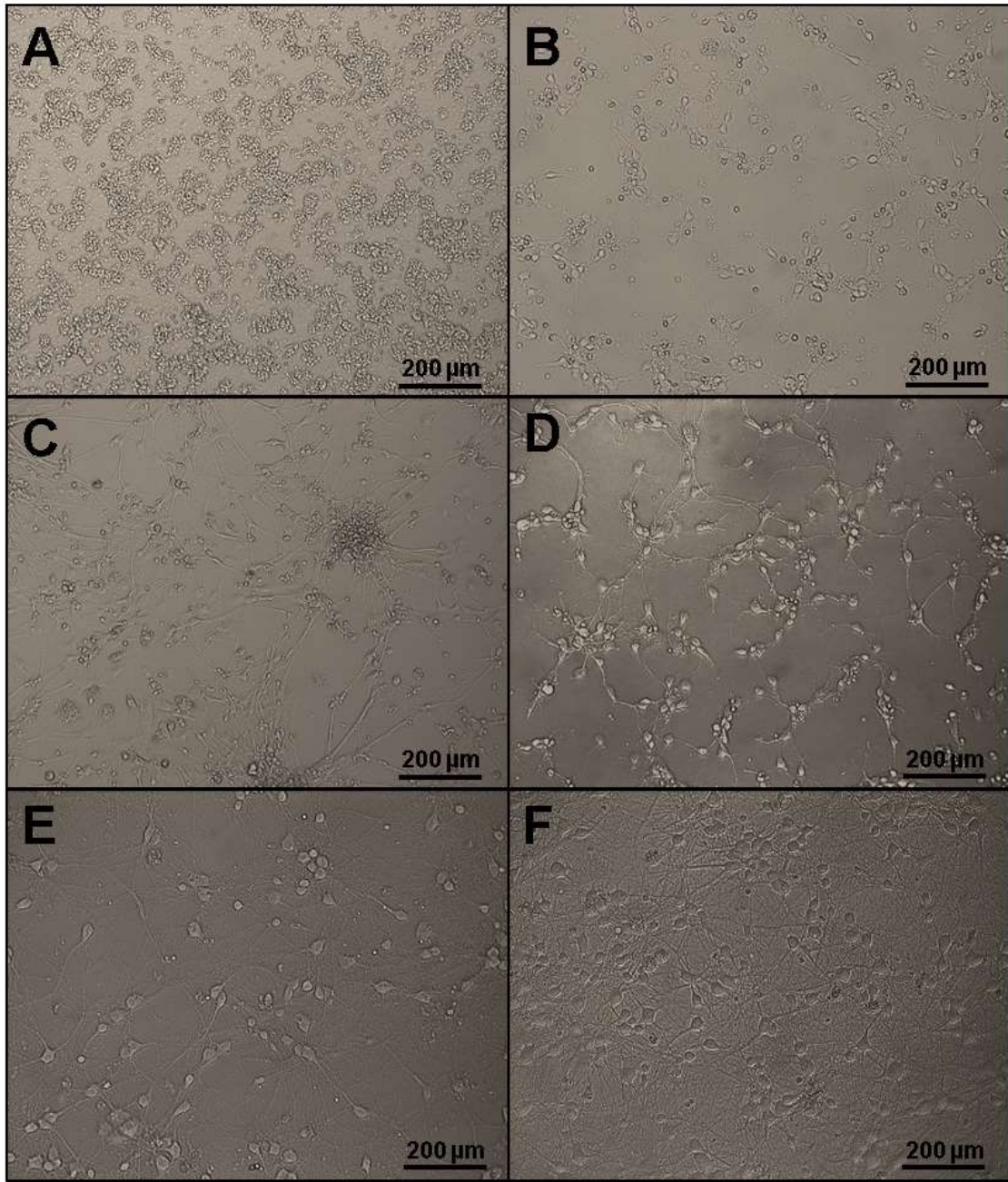
3.3.12. İstatistiksel analiz

Elde edilen bulgular GraphPad Prism 7 programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Normal dağılım gösteren parametrik veriler için tek yönlü varyans analizi (ANOVA), normal dağılıma uymayan veriler için Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ istatistiksel olarak anlamlı sayılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Hipokampus Dokusu İzolasyonu ve Primer Hipokampal Nöron Kültürü

Primer hipokampal hücreler hipokampus dokusundan izole edildikten sonra PDL (10 µg/mL) kaplı kültür kaplarına ekilmiştir. İzolasyon sonucunda kültür kaplarına çoğalma besiyeri (%15 HI-HS, %5 HI-FBS, %2 B27, 0.5 mM Glutamax, %1 N21-Max, %0.5 Penisilin/streptomisin, %0.05 Gentamisin ve %0.5 Amfoterisin B desteği içeren Neurobasal A besiyeri) içerisinde ekilen hücrelerin yuvarlak, yüzen ve fazla sayıda olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1A). 6-8 saat sonra hücrelerin besiyerinin farklılaşma besiyeri (%15 HI-HS, %5 HI-FBS, %2 B27, 0.5 mM Glutamax, %1 N21-Max, %0.5 Penisilin/streptomisin, %0.05 Gentamisin ve %0.5 Amfoterisin B desteği içeren Neurobasal A besiyeri) ile değiştirilip, 37 °C, %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. 2. günde hücrelerin yuvarlak yapıdan uzaklaşarak, petri yüzeyine yapıştığı ve aksonal uzantıların oluşmaya başladığı belirlenmiştir (Şekil 4.1B). 3 günde ise, aksonal uzantıların arttığı ve hücreler arası sinapsların artarak, nöronal ağ oluşumu başlamıştır (Şekil 4.1C). 3. günde ortama glial hücrelerin proliferasyonunu baskılayan AraC (5-10 µM, 2 gün) ilave edilmesiyle, 5. günde nöronal morfoloji yakalanmış, nöronlar arasındaki sinaptik bağlantılar belirgin hale gelmiştir (Şekil 4.1.1D). 7-9. günlerde ise nöronal farklılaşma tamamlanmış (Şekil 4.1E) ve nöronal ağın %80-90 doygunluğa ulaşması 15. günde tamamlanmıştır (Şekil 4.1F)

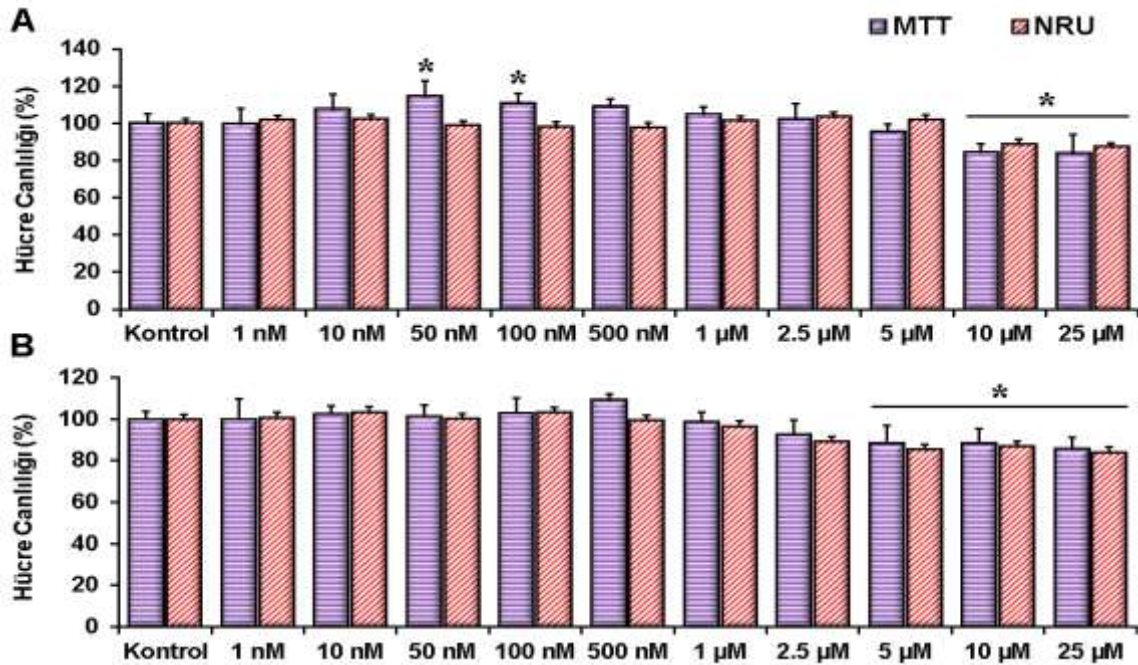


Resim 4.1. Primer hipokampal nöron hücrelerin farklılaşma süreci; 0. saat (A), 2. gün (B), 3 gün (C), 5. gün (D), 8. gün (E), 15. gün (F). (Ölçek: 200 µm)

4.2. Primer hipokampal nöron hücre kültürlerinde endokannabinoidler ve sentetik kannabinomimetiklerin sitotoksisite analizleri

Endokannabinoidlerin (AEA, 2-AG), sentetik kannabinomimetiklerin (WIN 55,212-2, CP 55-940) ve FAAH enzim inhibisyonu ile endokannabinoid sistemin düzenleyicisi URB-597 bileşiğinin primer hipokampal hücrelerin

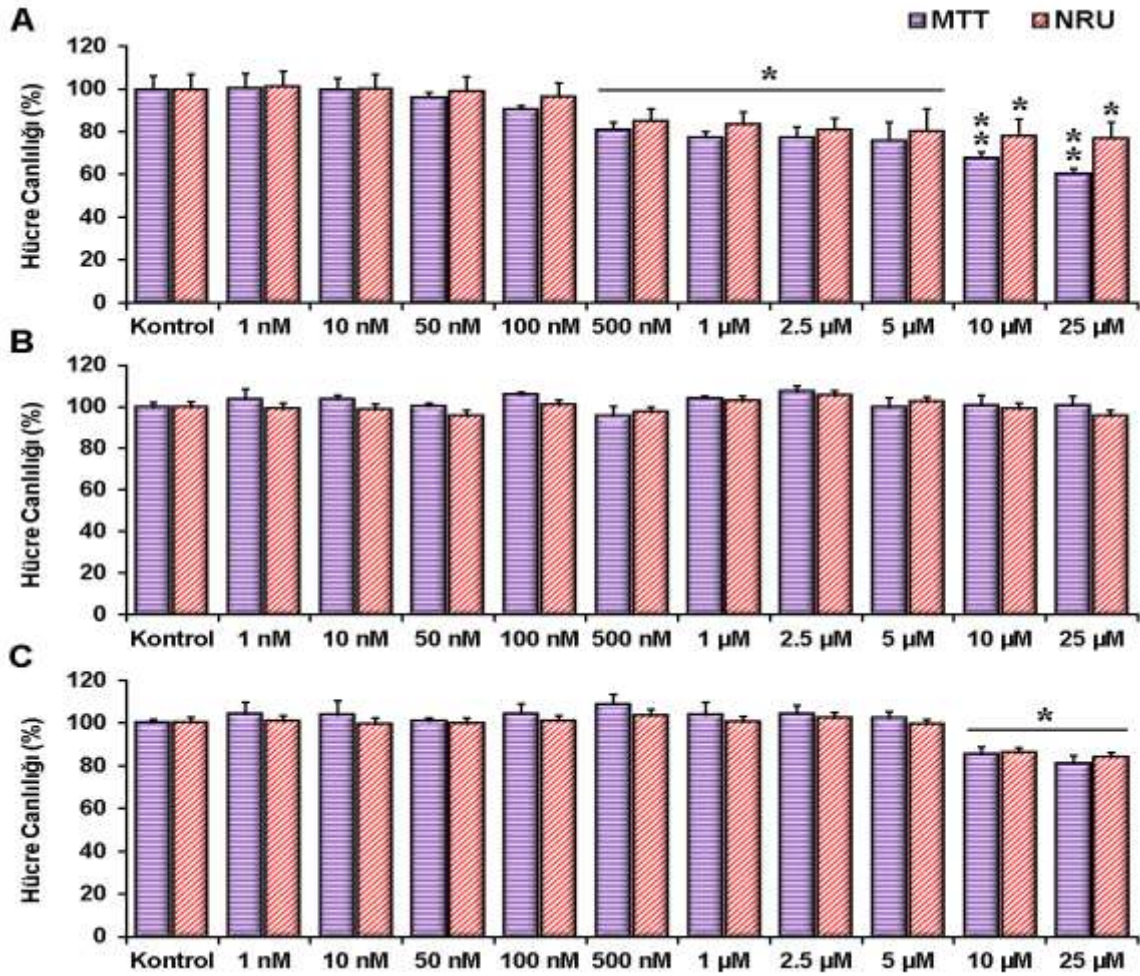
canlılığı/proliferasyonu üzerine olan etkisi MTT ve NRU analizi ile değerlendirilmiştir. AEA'nın 24 saat süreyle primer hipokampal nöron kültürlerine uygulanması sonucunda, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda hücre canlılığında %12-17 aralığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenirken ($p<0,05$), 10 ve 25 μ M konsantrasyonlarda %12-16 aralığında değişen azalma meydana gelmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.2A). Benzer şekilde düşük konsantrasyonlarda 2-AG uygulanması, hücre canlılığı/toksitesitesi üzerinde anlamlı bir değişiklik meydana getirmemesine rağmen ($p>0,05$), 5 μ M üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığında %12-16 arasında istatistiksel azalma gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.2B).



Şekil 4.1. Primer hipokampal nöron hücrelerine artan konsantrasyonlarda (1 nM- 25 μ M) AEA (A) veya 2-AG (B) uygulanmasının hücre canlılığı (MTT, NRU) üzerine olan etkisi. NRU: Nötral kırmızısı alımı; AEA: Anandamid; 2-AG: 2-araşidonigliserol. Kontrol: % 0.02 DMSO çözeltisi uygulanmış hücreler (n=6). * $p<0,05$, kontrol grubuna göre (Tek-yönlü ANOVA *post hoc* Tukey testi)

FAAH enzim inhibitörü olan URB-597'nin primer hipokampal hücrelere 24 saat süreyle uygulanması ile yapılan NRU analizinde 500 nM ve üzere konsantrasyonlarda hücre canlılığında %15-23 arasında bir azalma gözlenirken ($p<0,05$), MTT analizinde konsantrasyona bağımlı olarak %19-40 arasında bir

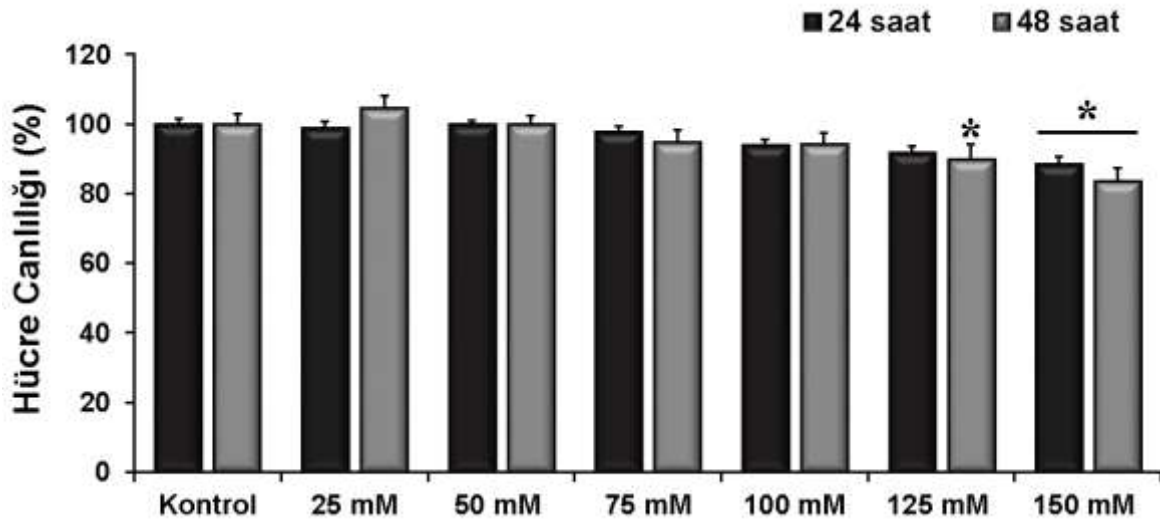
azalma gözlenmiştir. (500 nM- 5 μ M, $p<0,05$; 10 μ M<; $p<0,01$) (Şekil 4.2A). Öte yandan CP 55-940 uygulanması hücre canlılığı/toksisitesinde anlamlı bir değişiklik meydana getirmezken ($p>0,05$) (Şekil 4.2B), WIN 55,212-2 sadece 10 μ M ve üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana getirmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.2C)



Şekil 4.2. Primer hipokampal nöron hücrelerine artan konsantrasyonlarda (1 nM- 25 μ M) URB-597 (A) veya CP55-940 (B) veya WIN 55,212-2 (C) uygulanmasının hücre canlılığı (MTT, NRU) üzerine olan etkisi. NRU: Nötral kırmızı alımı; AEA: Anandamid; 2-AG: 2-araşidonigliserol Kontrol: % 0.02 DMSO çözeltisi uygulanmış hücreler. (n=6). * $p<0,05$, kontrol grubuna göre (Tek-yönlü ANOVA *post hoc* Tukey testi)

4.3. Primer Hipokampal Nöron Hücre Kültürlerinde Glukotoksisite Modelinin Oluşturulması ve Kannabinomimetiklerin Bu Modeldeki Etkileri

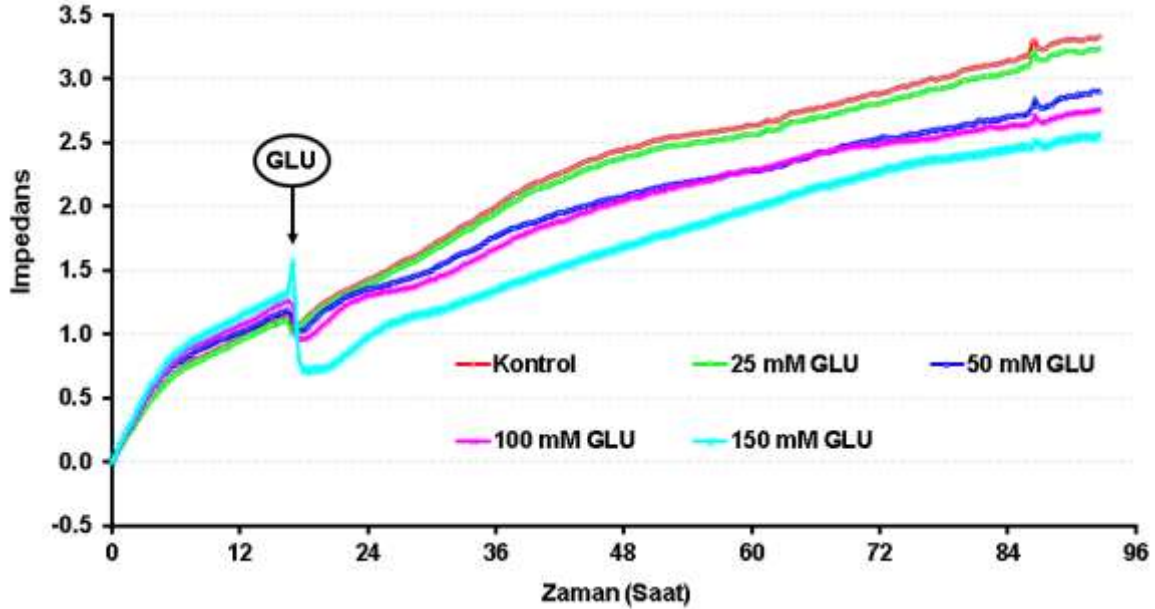
Primer hipokampal hücrelerde kronik hiperglisemiye bağlı glukotoksisite modeli oluşturulması sırasında hücrelere 24 ve 48 saat süreyle D-glukoz (GLU, 25-150 mM) uygulanmıştır. Buna göre, 25-100 mM konsantrasyon aralığında her iki sürede de hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmemiştir ($p>0,05$). Öte yandan, 24. saatte sadece 150 mM glukoz konsantrasyonunda hücre canlılığında azalma (%11) gözlenirken, 48. saatte 125 mM (%13) ve 150 mM (%19) konsantrasyonlarda gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Primer hipokampal nöron hücrelerine 24 veya 48 saat süreyle artan konsantrasyonlarda D-glukoz (25-150 mM) uygulanmasının hücre canlılığı/sağkalımı üzerine olan etkisi. Kontrol: % 0.1 PBS çözeltisi uygulanmış hücreler (n=6). * $p<0,05$, kontrol grubuna göre (Tek-yönlü ANOVA post hoc Dunnett's testi)

Glukotoksisitenin, primer hipokampal hücrelerin adezyon, farklılaşma ve proliferasyon profilleri üzerine olan etkileri eş zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA iCelligence) ile değerlendirildi. Hücrelerin E-plate sistemine konulup adaptasyon sürecini tamamladıktan sonra (~16 saat), artan konsantrasyonlarda glukoz uygulaması ile hücre adezyonu/proliferasyon belirteci olan impedans değerleri

kontrol ve 25 mM glukoz (LG) uygulanmış hücrelerde 24, 48 ve 72 saat boyunca artmaya devam ettiği gözlenmiştir. Öte yandan, artan GLU konsantrasyonuna bağlı olarak impedans değerlerindeki artışın kontrol grubuna kıyasla uygulanan süre boyunca azalarak devam ettiği belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Artan glukoz konsantrasyonuna (25-150 mM) bağlı olarak primer hipokampal nöron hücrelerinin adezyon/proliferasyon profillerinin zamana göre değişimi (n=3). Kontrol: %0.1 PBS uygulanmış hücreler. GLU: D-Glukoz

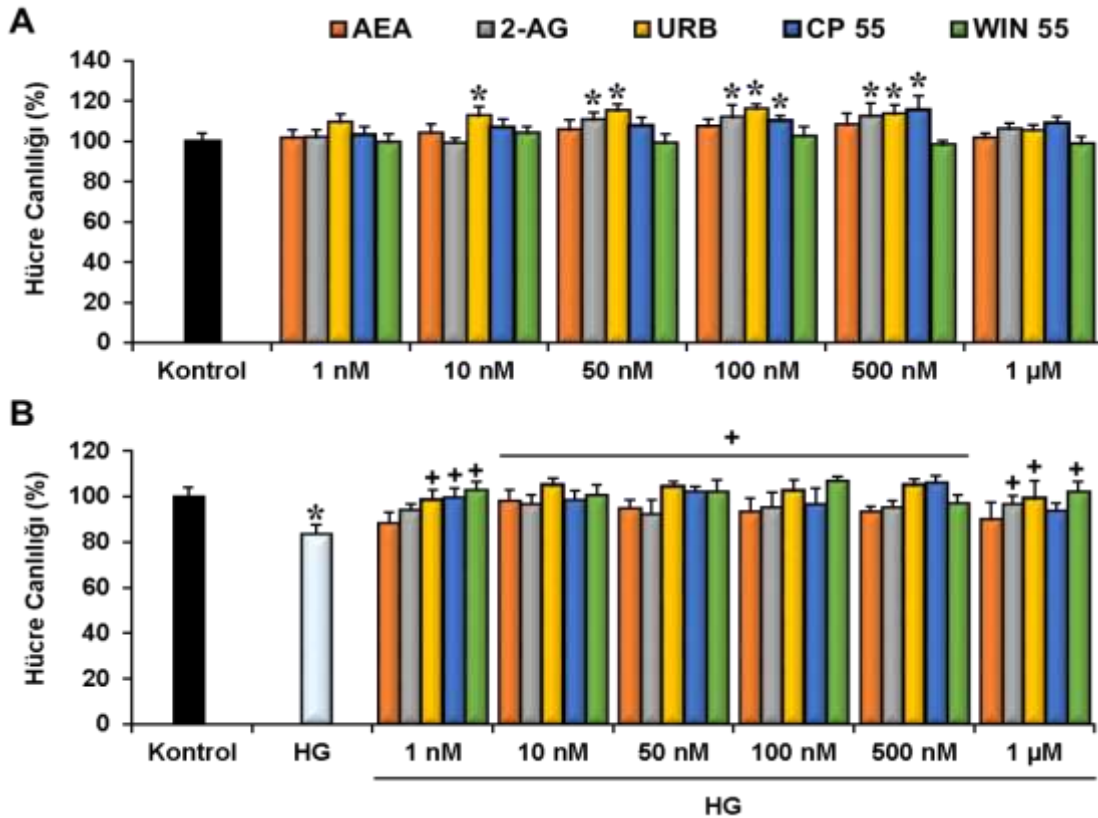
Glukoz aracılı toksisite sonuçlarımıza göre, 150 mM GLU'nun 48 saat süreyle uygulanması hiperglisemik glukotoksiste modeli (HG) olarak kabul edilmiştir

Endokannabinoidlerin (AEA, 2-AG), sentetik kannabinomimetiklerin (CP 55-940, WIN 55,212-2) ve endokannabinoid sistem düzenleyicisi, FAAH enzim inhibitörü URB-597, primer hipokampal nöron hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulandıktan sonra, 6. saatte ortama 150 mM glukoz (GLU) uygulanarak 48 saat daha inkübe edilmiş ve *in vitro* glukotoksiste tedavi protokolü oluşturulmuştur. Ardından MTT analizi ile sitotoksiste değerlendirilmiştir.

Kannabinomimetikler, 54 saat (6+48 saat) süreyle tek başına uygulanması sonucu toksisite analizi yapılmıştır. Buna göre, AEA veya WIN 55,212-2 bileşiklerinin tek başına (1 nM-1 µM) 54 saat süreyle uygulanmasıyla, hücre

canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir ($p>0,05$). Öte yandan URB-597 (10-500 nM), 2-AG (50-500 nM), CP-55,940 (100-500 nM) uygulanması ile primer hipokampal nöron hücrelerinin canlılığında artış gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.5A)

Glukotoksisite modelinde, 150 mM GLU (HG) uygulanması ile hücre canlılığı yaklaşık %20 oranında azaltmıştır ($p<0,05$, kontrol grubuna göre). Endokannabinoidlerin (AEA ve 2-AG), 10 nM-1 μ M glukoz toksisitesini geri çevirdiği belirlenmiştir ($p<0,05$, HG grubuna göre). Endokannabinoidlerden farklı olarak sentetik kannabinoid CP 55-940, 1-500 nM konsantrasyon aralığında protektif etki gösterirken, WIN 55,212-2 uygulanan tüm konsantrasyonlarda protektif etki göstermiştir ($p<0,05$). URB-597 uygulaması (10-500 nM), glukoz aracılı hücre canlılığında meydana gelen azalmayı geri çevirmiştir ($p<0,05$, HG grubuna göre) (Şekil 4.5B).

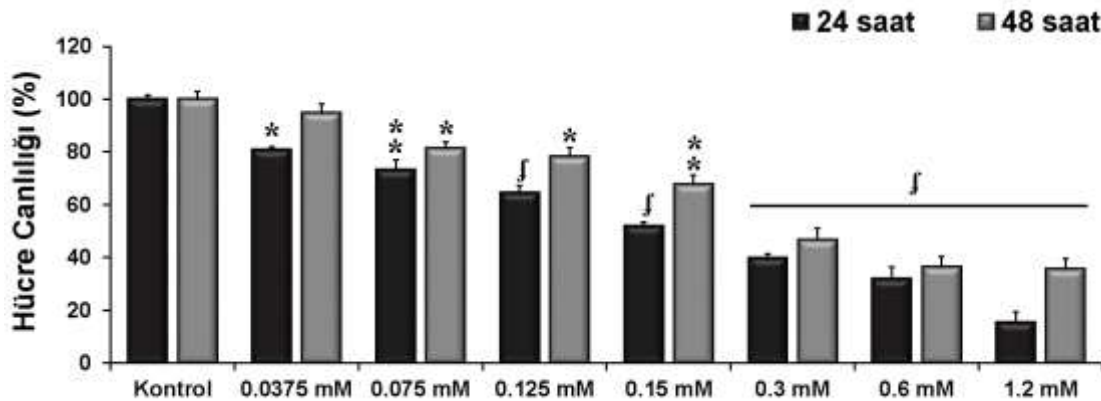


Şekil 4.5. Primer hipokampal nöron hücrelerine anandamid (AEA), 2-araşidonilgliserol (2-AG), URB-597, CP 55-940, WIN 55,212-2 (1 nM- 1 μ M) tek başına 54 saat (A) veya 6 saat inkübe edildikten sonra ortama 150 mM glukoz (HG) uygulanarak ilave 48 saat inkübasyon işlemleri sonucunda (B) hücre canlılığında meydana gelen değişim.

(n=6). *p < 0.05, kontrol grubuna göre; +p < 0.05, GLU grubuna göre (Tek-yönlü ANOVA *post hoc* Holm Sidak testi)

4.4. Primer Hipokampal Nöron Hücre Kültürlerinde Lipotoksisite Modelinin Oluşturulması ve Kannabinomimetiklerin Bu Modeldeki Etkileri

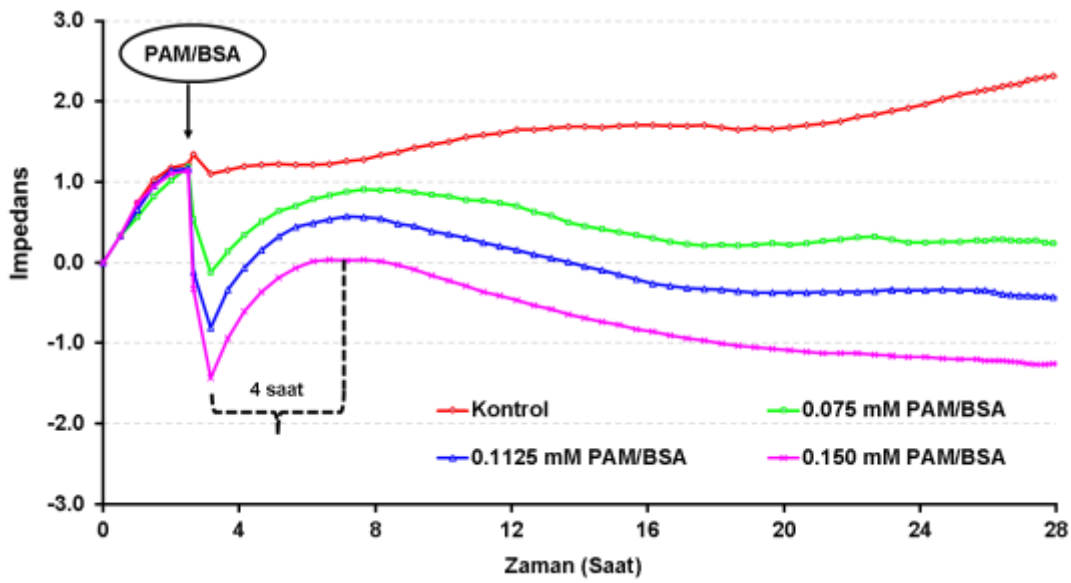
Primer hipokampal hücrelerde lipotoksisite modeli oluşturmak amacıyla palmitik asit (PAM) ve taşıyıcısı olarak BSA farklı oranlarda (PAM/BSA; 0.25:1, 0.5:1, 1:1, 2:1 BSA ile son konsantrasyon 0.150 mM olacak şekilde) 24 ve 48 saat süreyle hücrelere uygulanmış ve MTT deneyi ile canlılık analizi yapılmıştır. PAM/BSA'nın primer hipokampal nöron hücrelerinde 24 ve 48 saat konsantrasyonlarda uygulanması ile hücre canlılığı konsantrasyona bağımlı olarak azalmıştır. 24. saatte, 0.0375 mM konsantrasyondan itibaren canlılık istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalmış ($p < 0,05$ - $p < 0,001$) ve IC_{50} değeri 0.15 mM olarak belirlenmiştir ($p < 0,001$). Öte yandan, 48. saatteki canlılık 0.075 mM konsantrasyondan itibaren anlamlı şekilde azalırken, IC_{50} değeri 0.3 mM olarak hesaplanmıştır ($p < 0,001$). Her iki zaman aralığında 0.3 mM ve üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığı dramatik bir şekilde azalmıştır ($p < 0,001$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Primer hipokampal hücrelerde 24 ve 48 saat PAM/BSA uygulanmasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi. PAM: palmitik asit, BSA: sığır serum albumini. (n=6). *p < 0.05; **p < 0.01; §p < 0.001, 0.150 mM BSA verilmiş kontrol (Tek-yönlü ANOVA *post hoc* Dunnett's testi)

Lipotoksisitenin, primer hipokampal hücrelerin adezyon, farklılaşma ve proliferasyon profilleri üzerine olan etkileri eş zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA iCelligence) ile değerlendirildi. PAM/BSA uygulaması ile toksik etkinin başlangıcı

hakkında bilgiler elde edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, E-Plate kuyucuklarına ekilen hücreler adaptasyon sürecinden sonra kontrol grubuna taşıyıcı olarak 0.150 mM BSA uygulandığında adezyonu/proliferasyon profilinde artış gözlenmiştir. Ancak, PAM/BSA'nın artan konsantrasyonlarına bağlı olarak proliferasyon profilinin azaldığı ve primer hipokampal hücrelerde PAM/BSA uygulanmasını takiben hücrelerin verdiği yanıtın yaklaşık 4. saatten itibaren geri dönüşsüz hale gelerek zamana bağlı olarak impedansta azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7).

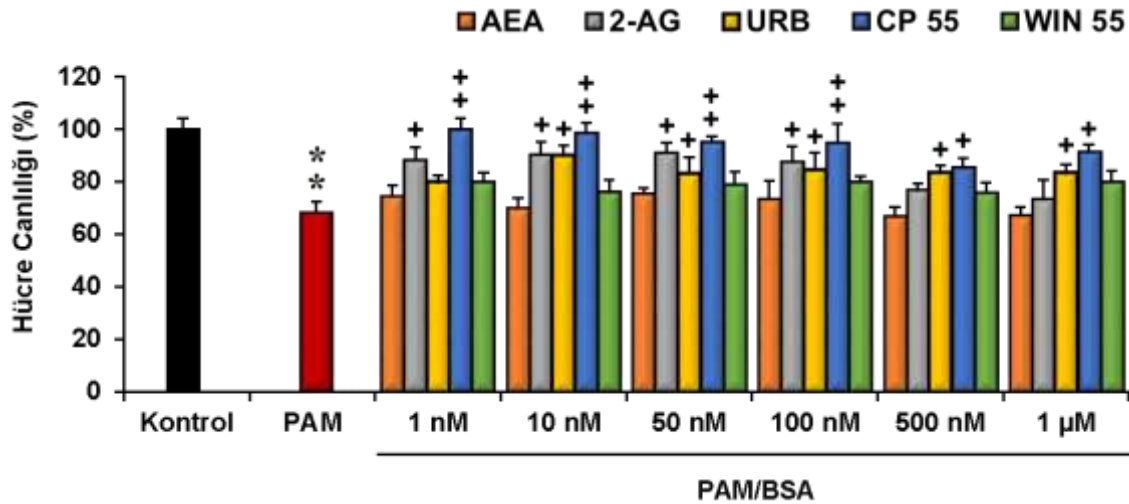


Şekil 4.7. Artan PAM konsantrasyonuna (0.075-0.150 mM) bağlı olarak primer hipokampal nöron hücrelerinin adezyon/proliferasyon profillerinin zamana göre değişimi (n=2). Kontrol: 0.150 mM BSA taşıyıcısı uygulanmış hücreler. PAM: Palmitik asit; BSA: Sığır serum albumini

PAM toksisitesi sonuçlarına göre, 0.15 mM (PAM/BSA) 4 saat süreyle uygulanması lipotoksosite modeli olarak kabul edilmiştir.

Endokannabinoidlerin (AEA, 2-AG), sentetik kannabinomimetiklerin (CP 55-940, WIN 55,212-2) ve endokannabinoid sistem düzenleyicisi, FAAH enzim inhibitörünün (URB-597), primer hipokampal nöron hücrelerine 50 saat (6+44 saat) farklı konsantrasyonlarda uygulandıktan sonra, ortama 0.15 mM PAM/BSA uygulanarak 4 saat daha inkübe edilmiş ve *in vitro* lipotoksosite tedavi protokolü oluşturulmuştur. Ardından MTT ile sitotoksosite analizi yapılmıştır.

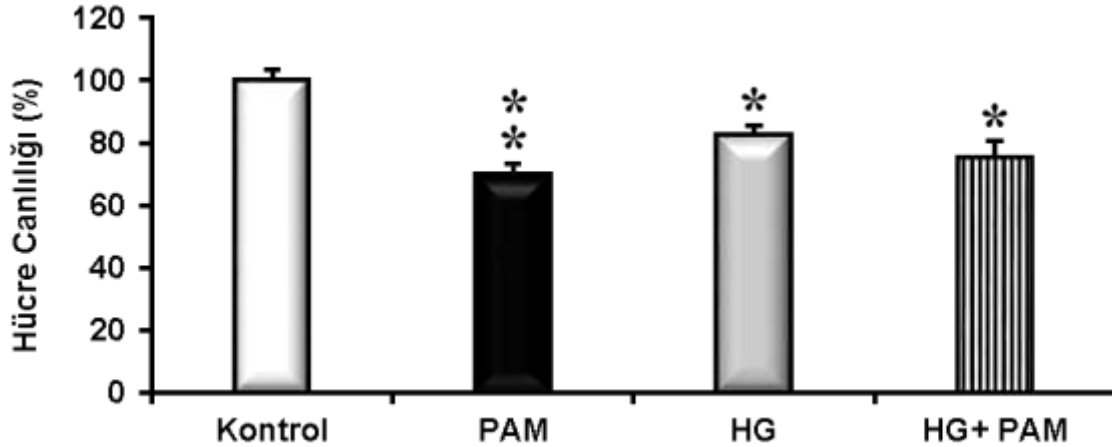
Kannabinomimetiklerin 1 nM- 1 μ M konsantrasyonları ile 54 saat süreyle inkübe edilen hipokampal nöronların toksisitesi Şekil 4.5A'da gösterilmiştir. Lipotoksosite modelinde, primer hipokampal nöron hücrelerine PAM/BSA (0.15 mM, 4 saat) uygulanması ile hücre canlılığı % 32 oranında azalmıştır ($p < 0,01$, 0.15 mM BSA uygulanmış kontrol grubuna göre). Meydana gelen bu azalma, endokannabinoid AEA tarafından geri döndürülemezken, 2-AG (1-100 nM) tarafından %17-20 oranlarında geri döndürülebilmıştır ($p < 0,05$, PAM/BSA grubuna göre). Benzer şekilde sentetik kannabinomimetik olan WIN 55,212-2, PAM aracılı hücre canlılığındaki azalmada istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik meydana getirmezken, CP 55-940 düşük konsantrasyonlarda (1 -100 nM) hücre canlılığını % 30-32 oranında arttırmıştır ($p < 0,01$, PAM/BSA grubuna göre). 500 nM ve 1 μ M konsantrasyonlarda ise bu artış, %17-23 arasında gerçekleşmiştir ($p < 0,05$, PAM/BSA grubuna göre). URB-597 bileşiği ise 10 nM-1 μ M konsantrasyon aralığında uygulandığı zaman, PAM/BSA aracılı toksisiteyi azaltarak hücre canlılığını %15-20 oranında arttırmıştır ($p < 0,05$, PAM/BSA grubuna göre) (Şekil 4.8)



Şekil 4.8. Primer hipokampal nöron hücreleri, anandamid (AEA), araşidonilgliserol (2-AG), URB-597, CP 55-940, WIN 55,212-2 (1 nM- 1 μ M) ile 50 saat (6+44 saat) inkübe edildikten sonra ortama 0.15 mM palmitik asit (PAM/BSA) uygulanarak ilave 4 saat inkübasyon işlemleri sonucunda hücre canlılığında meydana gelen değişim (n=6). ** $p < 0.01$, 0.15 mM BSA uygulanmış kontrol grubuna göre; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, 0.15 mM PAM/BSA (1:1) grubuna göre (Tek-yönlü ANOVA *post hoc* Holm Sidak testi)

4.5. Primer Hipokampal Nöron Hücre Kültürlerinde Glukolipotoksisite Modelinin Oluşturulması ve Kannabinomimetiklerin Bu Modeldeki Etkileri

Glukotoksisite ve lipotoksisite modeli bulgularına göre, çalışmamızda glukolipotoksisite modeli olarak, primer hipokampal hücreler öncelikle 44 saat 150 mM glukoz ile inkübe edildikten sonra, 44. saatte ortama 0.150 mM PAM/BSA (1:1) uygulanıp ilaveten 4 saat daha inkübe edilmiştir. Bu şekilde, hücrelerde toplamda 48 saat glukoz ve son 4 saat ise Glukoz+PAM/BSA'ya maruz kalmıştır. PAM/BSA (0.150 mM) tek başına primer hipokampal nöron hücrelerine 4 saat süreyle uygulanması hücre canlılığında %30 bir azalma meydana gelmektedir ($p < 0,01$, kontrol grubuna göre). Benzer şekilde glukozun (150 mM) tek başına uygulanması ile canlılık %18 azalırken ($p < 0,05$), son 4 saatte ortama glukoz varlığında 0.150 mM PAM/BSA ilave edildiğinde, canlılığın %25 oranında azaldığı gözlenmiştir ($p < 0,05$; kontrol grubuna göre) (Şekil 4.9).

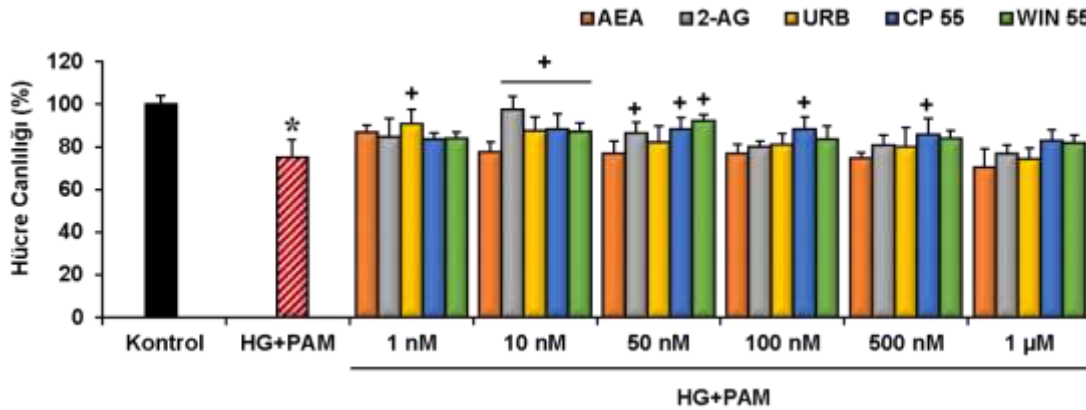


Şekil 4.9. Primer hipokampal nöron hücrelerine PAM/BSA (4 saat) veya GLU (48 saat) veya önce GLU (44 saat) ve ardından ortamda GLU varken PAM/BSA (4 saat) uygulanmasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi. PAM: palmitik asit/BSA, 0.150 mM; BSA: sığır serum albumini, 0.150 mM; GLU; D-glukoz, 150 mM (n=6). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, çözücü verilmiş kontrol grubuna göre (Tek-yönlü ANOVA *post hoc* Dunnett's testi)

Elde edilen glukolipotoksisite bulgularına göre, endokannabinoidlerin (AEA, 2-AG), sentetik kannabinomimetiklerin (CP 55-940, WIN 55,212-2) ve

endokannabinoid sistem düzenleyicisi, FAAH enzim inhibitörünün (URB-597), primer hipokampal nöron hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (1 nM-1 μ M) uygulandıktan sonra, 6. saatte ortama GLU uygulanarak 44 saat daha inkübe edilmiş ve 44. saatte ortama 0.15 mM PAM/BSA uygulanarak ilaveten 4 saat daha inkübasyon sağlanmıştır. Bu şekilde oluşturulan *in vitro* glukolipotoksiste tedavi protokolü sonucunda MTT analizi ile sitotoksiste değerlendirilmiştir.

GLU+PAM uygulanması ile hücre canlılığı kontrol grubuna göre %25-30 azalmaktadır ($p<0,05$). AEA'nın 1 nM-1 μ M konsantrasyonlarda uygulanması ile, GLU+PAM aracılı-meydana gelen hücre canlılığındaki azalmada istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik meydana gelmezken, diğer endokannabinoid olan 2-AG sadece 10 nM ve 50 nM konsantrasyonlarda uygulandığında hücre canlılığını sırasıyla %22 ve %13 oranında arttırmıştır ($p<0,05$). Sentetik kannabinoidlerden WIN 55,212-2, 2-AG ile benzer profil göstererek sadece 10 nM (%12) ve 50 nM (%17) konsantrasyonlarda, GLU+PAM toksisitesinde hücre canlılığında anlamlı bir artış meydana getirmiştir ($p<0,05$). CP 55-940 bileşiği, konsantrasyondan bağımsız (10-500 nM) olarak, GLU+PAM grubuna göre hücre canlılığını %13 oranında arttırmıştır ($p<0,05$). FAAH inhibitörü URB-597 bileşiği, 1 nM (%15) ve 10 nM (%12) konsantrasyonlarında hücre canlılığında artış meydana getirmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.10).



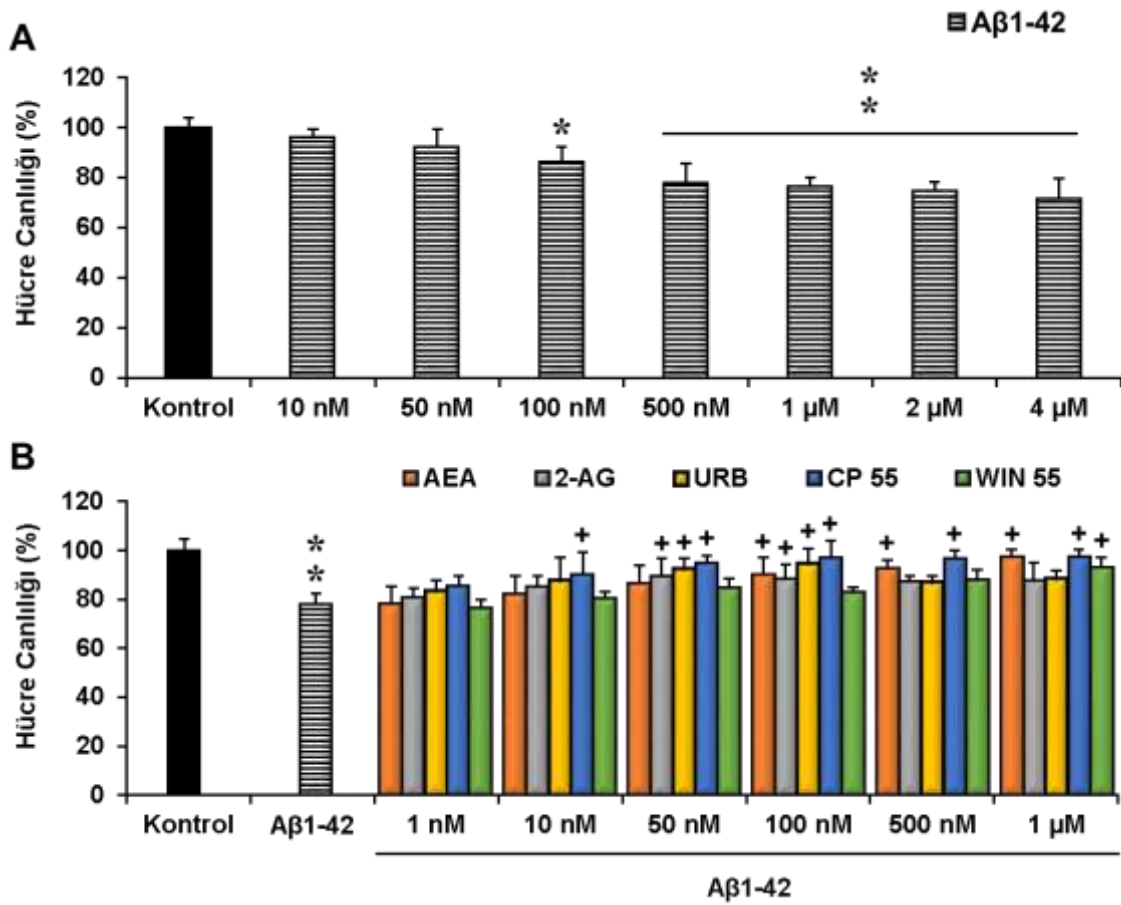
Şekil 4.10. Primer hipokampal hücreler anandamid (AEA), 2-Araşidonilgliserol (2-AG), URB-597, CP 55,940, WIN 55,212-2 (1 nM- 1 μ M) ile 6 saat inkübe edildikten sonra ortama 44 saat 150 mM glukoz (HG) uygulanıp ardından 0.15 mM palmitik asit (PAM/BSA) ilave edilerek 4 saat inkübasyon işlemleri sonucunda hücre canlılığında meydana gelen değişim (n=5-6). * $p<0,05$, kontrol grubuna göre; + $p < 0.05$, GLU+PAM/BSA (1:1) grubuna göre (Tek-yönlü ANOVA *post hoc* Holm Sidak testi)

4.6. Primer Hipokampal Nöron Hücre Kültürlerinde Oligomerik Amiloid Beta ($A\beta_{1-42}$) ile Alzheimer Hastalığı (AH) Modelinin Oluşturulması ve Kannabinomimetiklerin Bu Modeldeki Etkileri

$A\beta_{1-42}$ peptidleri, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) yöntemi kullanılarak oligomerik formda hazırlanan $A\beta_{1-42}$, plakları, primer hipokampal nöron hücrelerine değişen konsantrasyonlarda (10 nM- 4 μ M) konsantrasyonlarda 24 saat süreyle uygulanarak MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Buna göre $A\beta_{1-42}$ uygulanması ile 100 nM ve üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığı konsantrasyona bağımlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (100 nM; $p<0,05$, 500 nM ve 1-4 μ M; $p <0.01$, kontrol grubuna göre) (Şekil 4.11A).

Elde edilen $A\beta_{1-42}$ toksisitesi bulgularına göre, kannabinomimetiklerin primer hipokampal nöron hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (1 nM-1 μ M) 30 saat (6+24) süreyle uygulandıktan sonra ortama 500 nM oligomerik $A\beta_{1-42}$ peptitleri eklenerek 24 saat daha inkübe edilmiştir. Bu şekilde, *in vitro* Alzheimer hastalığı (AH) tedavi protokolü oluşturulmuştur.

Oluşturulan *in vitro* AH modelinde, $A\beta_{1-42}$ peptitlerinin (500 nM) uygulanması ile hücre canlılığı kontrol grubuna kıyasla % 25 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0,01$). Endokannabinoid türevlerinden AEA, 100 nM ve üzeri konsantrasyonlarda $A\beta_{1-42}$ aracılı toksisiteyi azaltarak hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırırken ($p<0,05$; $A\beta_{1-42}$ grubuna göre), 2-AG bileşiği sadece 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda benzer etkiyi göstermiştir ($p<0,05$; $A\beta_{1-42}$ grubuna göre). Sentetik kannabinomimetik olan CP 55-940 bileşiği, 10 nM ve üzeri konsantrasyonlarda, AEA bileşiğine benzer bir trend eğilimi göstererek hücre canlılığını konsantrasyon bağımlı olarak artırmaktadır ($p<0,05$; $A\beta_{1-42}$ grubuna göre). Öte yandan, diğer sentetik türevler olan WIN 55,212-2 sadece 1 μ M; URB-597 ise 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda hücre canlılığını istatistiksel olarak artırmıştır ($p<0,05$, $A\beta_{1-42}$ grubuna göre) (Şekil 4.11B).

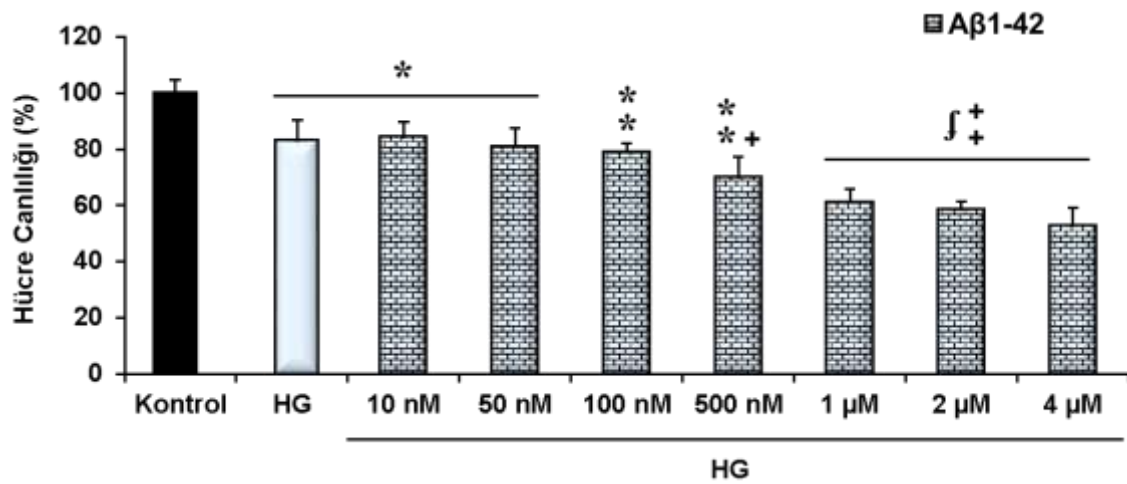


Şekil 4.11. Primer hipokampal hücreler artan konsantrasyonlarda (10 nM-4 μM) oligomerik Aβ₁₋₄₂ ile 24 saat (A) veya anandamid (AEA), 2-Araşidonilgliserol (2-AG), URB-597, CP 55-940, WIN 55,212-2 (1 nM-1 μM) ile 30 saat (6+24) inkübe edildikten sonra ortama 500 nM Aβ₁₋₄₂ uygulanıp, 24 saat daha inkübe edilmesi sonucunda hücre canlılığında meydana gelen değişim (n=6). *p < 0.05, **p < 0.01, kontrol grubuna göre; +p < 0.05, Aβ₁₋₄₂ grubuna göre (Tek-yönlü ANOVA)

4.7. Glukotoksisite Modeli Oluşturulmuş Primer Hipokampal Nöron Hücrelerine Oligomerik Aβ₁₋₄₂ Plaklarının Uygulanması: *in vitro* Diyabetik Alzheimer Hastalığı (DM-AH) Modeli

Glukotoksisite ve Aβ₁₋₄₂ ile Alzheimer hastalığı modelinin oluşturulması ile primer hipokampal nöron hücreleri, önce glukoz (150 mM, 24 saat) ve ardından ortamda glukoz varlığında Aβ₁₋₄₂ plaklarının farklı konsantrasyonları (10 nM- 4 μM, 24 saat) ile muamele edilerek hiperglisemik ortamda *in vitro* diyabetik Alzheimer hastalığı (DM-AH) modeli oluşturulmuştur. DM-AH modelinde, primer hipokampal nöron hücrelerine glukoz (150 mM, 48 saat) uygulanması ile hücre canlılığı % 20 oranında azalmıştır (p<0,05, kontrol grubuna göre). Hücrelere, önce glukoz (150

mM, 24 saat) ve ardından $A\beta_{1-42}$ plaklarının 10 ve 50 nM konsantrasyonlarda uygulanması ile hücre canlılığı kontrol grubuna göre %17-20 arasında bir azalma gösterirken ($p < 0,05$), 100 nM ve 500 nM konsantrasyonlarda canlılıktaki azalma %23-28 oranında gerçekleşmiştir ($p < 0,01$). Bu azalma oranı 1 μ M ve üzeri konsantrasyonlarda %40-48 aralığına kadar çıkmaktadır ($p < 0,001$). Sadece glukoz grubu ile kıyaslandığında, glukoz varlığında $A\beta_{1-42}$ plaklarının 500 nM ve üzeri konsantrasyonlarda sırasıyla %13 ($p < 0,05$), %23 ($p < 0,01$) ve % 28 ($p < 0,01$) oranında hücre canlılığında azalma gözlenmiştir (Şekil 4.12).



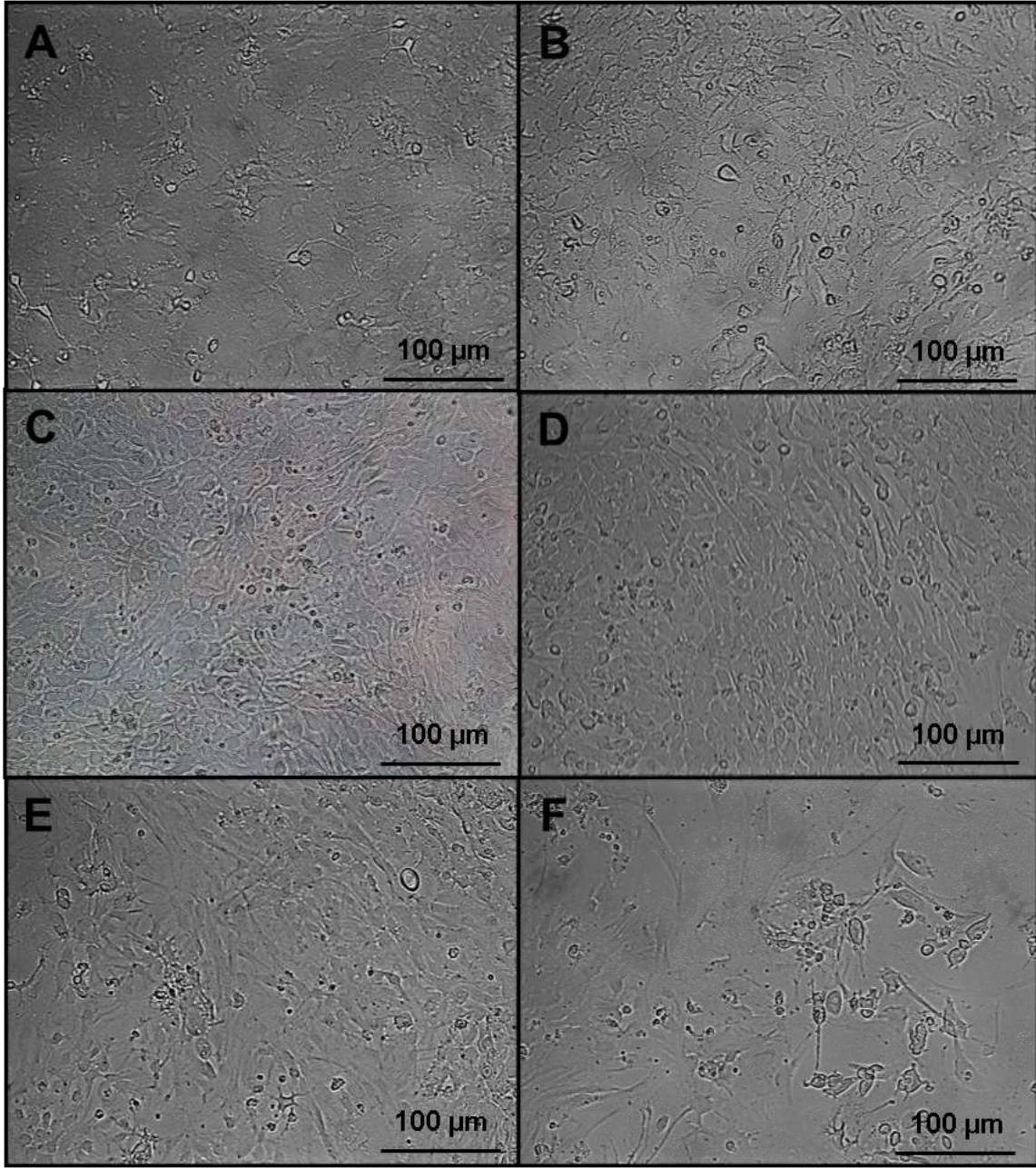
Şekil 4.12. Primer hipokampal hücreler 150 mM glukoz (GLU) ile 24 saat inkübe edildikten sonra, glukoz varlığında $A\beta_{1-42}$ plaklarının (10 nM- 8 μ M) 24 saat uygulanması sonucunda hücre canlılığında meydana gelen değişim (n=6). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, † $p < 0,001$, kontrol grubuna göre; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, GLU grubuna göre (Tek yönlü ANOVA *post hoc* Holm sidak test)

In vitro DM-AH modelinde, primer hipokampal nöron hücrelerinde morfolojik olarak meydana gelen değişim inverted-mikroskop ile değerlendirilmiştir.

Primer hipokampal nöron hücrelerine 25 mM glukozun 48 saat süreyle uygulanması sonucunda hücre yoğunluğu, aksonal uzantı ve sinaptik bağlantıların normal ve yüksek olduğu gözlenirken (Resim 4.2A), 150 mM glukoz uygulanması ile hücrelerin osmotik hasara bağlı olarak hücre morfolojisi değişerek hücre gövdesinde şişme (swelling) ve aksonal bağlantılarda azalma gözlenmiştir (Resim 4.2B).

Nöron hücrelerinin, 150 mM GLU (24 saat) ile inkübe edildikten sonra ortamda GLU varlığında A β ₁₋₄₂ plaklarının 500 nM konsantrasyonda 24 saat süreyle uygulanması sonucunda, hücre morfolojisi glukoz maruziyetine benzer şekilde olduğu gözlenmiştir. Ayrıca yuvarlaklaşmış hücre (ölü hücre) oranının arttığı belirlenmiştir (Resim 4.2C).

A β ₁₋₄₂ plaklarının konsantrasyonu artmasıyla birlikte nöronal hücreler yaygın dağılım yerine, kümeleşme eğilmi göstererek karakteristik nöron morfolojisinden uzaklaşıp içi hücre görünümü almıştır (Resim 4.2D). Ayrıca, ortamda glukoz varlığında A β ₁₋₄₂ plaklarının yüksek konsantrasyonlarda uygulanması ile hücre zarlarında (kabarcık) bleb görünümünün oluşarak, hücre debrisinde artış meydana getirdiği, aksonal uzantıların yüksek oranda kaybolarak hücreler arası nöronal ağın yok olduğu gözlenmiştir (Resim 4.2E-F).

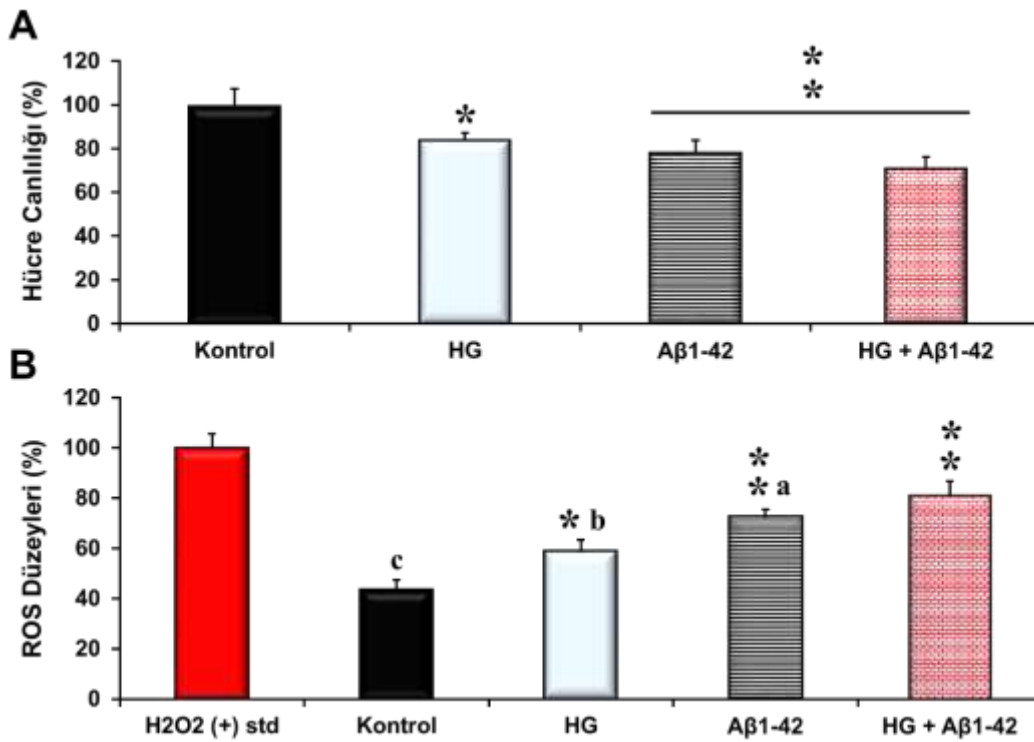


Resim 4.2. Primer hipokampal hücreler 25 mM (A) veya 150 mM (B) glukoz (GLU) ile 48 saat veya 150 mM GLU ile 24 saat inkübe edildikten sonra, GLU varlığında $A\beta_{1-42}$ plaklarının 500 nM (C), 1 μ M (D), 2 μ M (E), 4 μ M (F) 24 saat uygulanması sonucunda hücre morfolojilerinde meydana gelen değişim (Ölçek: 100 μ m)

DM-AH modeli, primer hipokampal nöron hücreleri, önce glukoz (150 mM, 24 saat) ve ardından ortamda glukoz varlığında $A\beta_{1-42}$ (500 nM, 24 saat) ile inkübasyon edilmesiyle oluşturulmuştur.

MTT analizi sonucuna göre, primer hipokampal hücrelere tek başına 150 mM glukozun (48 saat) ve 500 nM A β 1-42 plaklarının (24 saat) veya HG+A β 1-42 (24+24 saat) uygulanması ile hücre canlılığının kontrol grubuna kıyasla sırasıyla, %20 ($p < 0,05$), %25 ($p < 0,01$) ve %30 ($p < 0,01$) oranında azaldığı gözlemiştir (Şekil 4.13A).

Oluşturulan DM-AH modelinde, HG veya A β 1-42 plaklarının tek başına kontrol grubuna (%43) uygulanması ile hücre içi ROS düzeylerinde sırasıyla %15 ($p < 0,05$) ve %28 ($p < 0,01$) oranında artış gözlenirken, bu artış HG+A β 1-42 uygulanması ile %37 ($p < 0,01$) kadar çıkmaktadır. Öte yandan, H₂O₂ (200 μ M, 15 dakika) pozitif kontrol grubu (%100) ile kıyaslandığında, HG+A β 1-42 (%93) grubunun hücre içi ROS düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.13B).



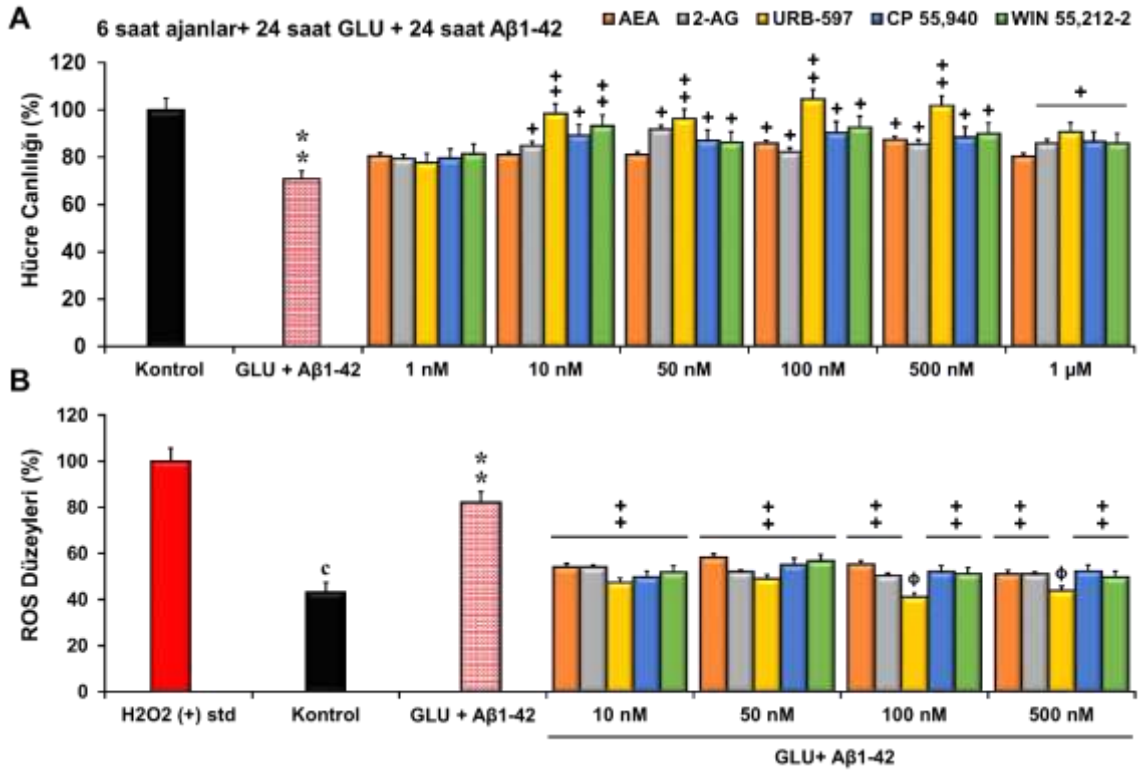
Şekil 4.13. Primer hipokampal nöron hücrelerine 150 mM glukozun (48 saat) ve 500 nM A β 1-42 plaklarının (24 saat) veya HG+ A β 1-42 (24+24 saat) uygulanması ile hücre canlılığı (A) ve hücre içi ROS düzeylerinde (B) meydana gelen değişim. GLU; D-glukoz, 150 mM ($n=5$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, çözücü verilmiş kontrol grubuna göre; ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$, H₂O₂ pozitif standart grubuna göre (Tek-yönlü ANOVA *post hoc* Dunnett's testi)

4.8. *In vitro* Diyabetik Alzheimer Hastalığı (DM-AH) Modelinde Kannabinomimetiklerin Toksisite Analizleri

In vitro DM-AH modelinde, endokannabinoidler ve sentetik kannabinomimetiklerin 1 nM-1 μ M konsantrasyonlarda 6 saat süreyle uygulandıktan sonra, önce glukoz (150 mM, 24 saat) ve ardından ortamda glukoz varlığında A β 1-42 (500 nM, 24 saat) ile inkübe edilerek *in vitro* DM-AH tedavi protokolü oluşturulmuştur.

Canlılıkta meydana gelen değişim incelendiğinde, GLU+A β 1-42 uygulanması ile hücre canlılığında meydana gelen azalma, endokannabinoid türevlerinden AEA (100 ve 500 nM) ve 2-AG (10 nM-1 μ M) tarafından %13-16 oranında geri döndürülebilirken ($p<0,05$), URB-597 (10-500 nM) uygulanmasıyla bu oran %25-30 aralığına kadar çıkmaktadır ($p<0,01$). Endokannabinoid 2-AG'ye benzer şekilde CP 55-940 ve WIN 55, 212-2 (10- 1 μ M) bileşikler, GLU+A β 1-42 aracılı toksisite %16-20 oranında geri döndürülebilmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.14).

Hücre içi reaktif oksijen türevlerinin düzeyleri incelendiğinde, GLU+A β 1-42 uygulanması ile pozitif kontrol (H_2O_2) grubuna yakın bir ROS oluşumu gözlenmiştir ($p>0,05$). GLU+A β 1-42 grubunda artmış olan ROS düzeyleri, endokannabinoidlerin (AEA, 2-AG) veya sentetik kannabinoidlerin (CP 55-940, WIN 55,212-2) uygulanması ile konsantrasyondan bağımsız olarak istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir ($p<0,01$). Öte yandan, GLU+A β 1-42 modeline URB-597 bileşiğinin 10 nM ve 50 nM konsantrasyonlarda uygulanması ile ROS düzeylerinde diğer kannabinomimetiklere benzer oranlarda azalma gözlenirken ($p<0,01$), 100 nM ve 500 nM konsantrasyonlarda bu azalma daha keskin hale gelmiştir ($p<0,001$) (Şekil 4.14B)

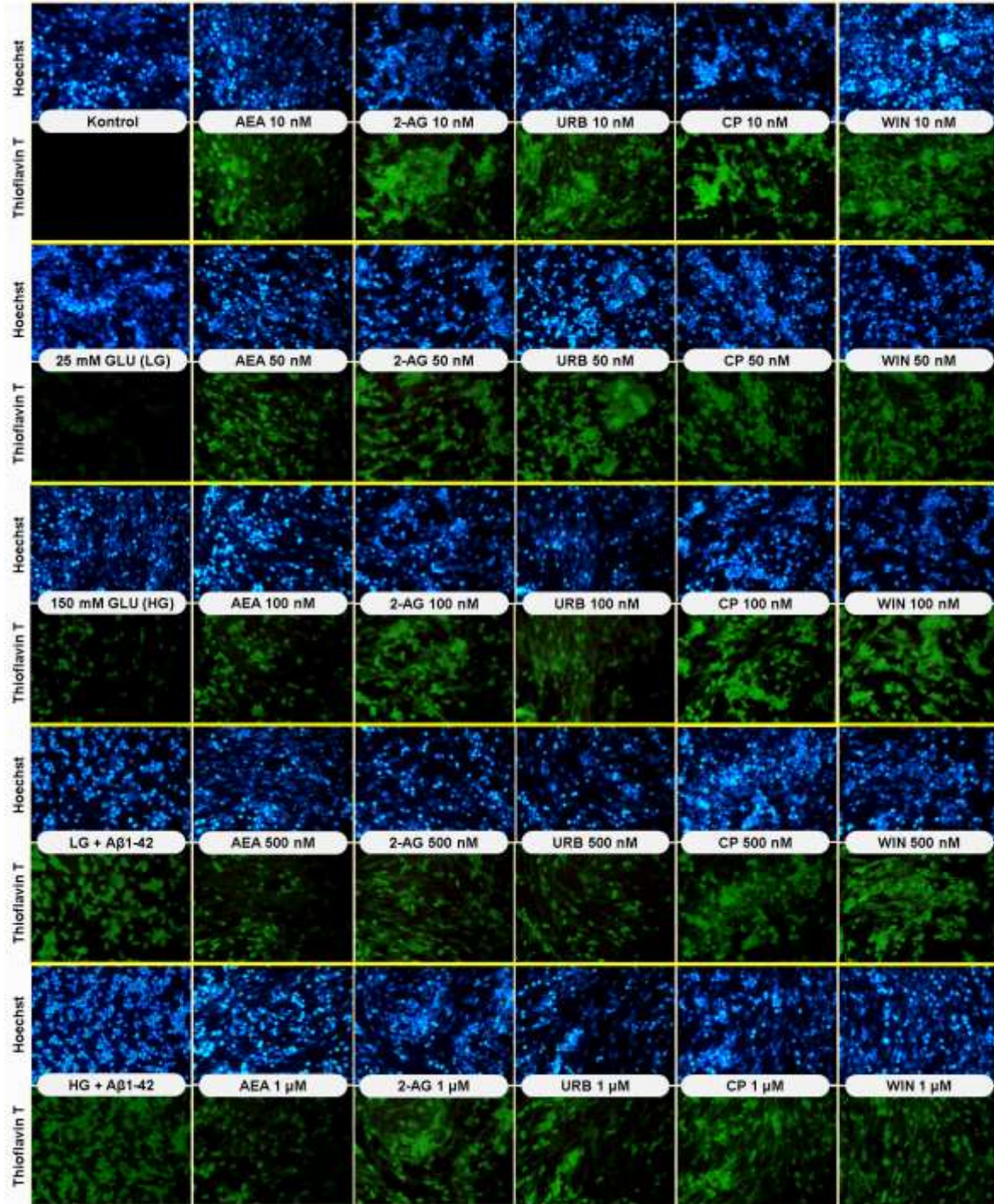


Şekil 4.14. Primer hipokampal nöron hücrelerine artan konsantrasyonlarda (1 nM- 1 μM, 6 saat) anandamid (AEA), 2-araşidonilgliserol (2-AG), URB-597, CP 55-940, WIN 55,212-2 bileşiklerinin HG (150 mM, 24 saat) + Aβ1-42 (500 nM, 24 saat) modeline uygulanması ile hücre canlılığı (A) ve hücre içi ROS düzeylerinde (B) meydana gelen değişim. GLU; D-glukoz, 150 mM (n=5-6). *p < 0.05, **p < 0.01, çözücü verilmiş kontrol grubuna göre; +p<0,05, ++p<0,01, HG+ Aβ1-42 grubuna göre; ^cp < 0.001, H₂O₂ pozitif standart grubuna göre (Tek-yönlü ANOVA *post hoc* Holm Sidak testi)

In vitro DM-AH modeline uygulanan tedavi protokolünden elde edilen toksisite bulgularına göre, protektif etki AEA < 2-AG ≤ CP 55940 ≤ WIN 55,212-2 < URB597 şeklinde sıralanabilir.

4.9. *In vitro* Diyabetik Alzheimer Hastalığı (DM-AH) Modelinde Kannabinomimetiklerin Amiloid Beta Düzeyleri Üzerine Olan Etkisi

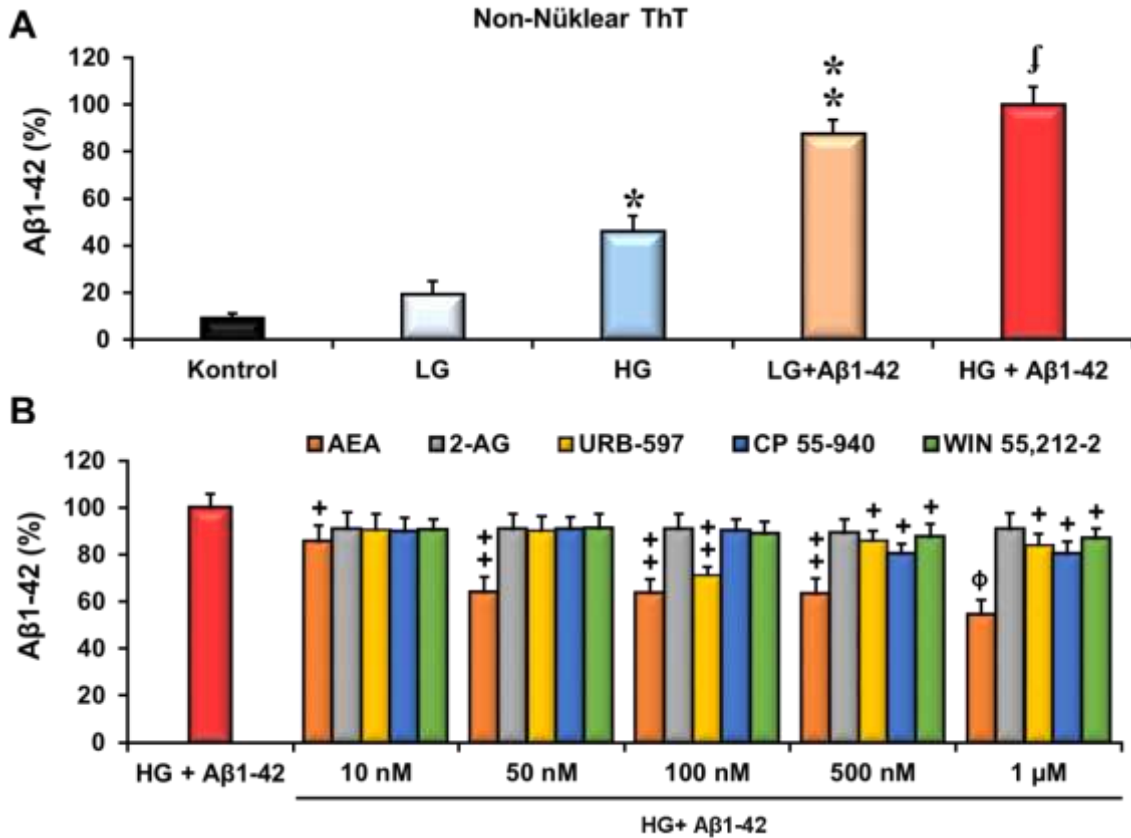
DM-AH modelinde, endokannabinoidlerin ve sentetik kannabinomimetiklerin Aβ1-42 düzeylerinde ve Aβ1-42 lokalizasyonunda meydana getirdikleri değişim Thioflavin T (agregat) ve Hoechst 33342 (çekirdek) ikili boyama yöntemi ile floresan mikroskop kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Resim 4.3).



Resim 4.3. DM-AH modelinde kannabinomimetiklerin farklı konsantrasyonlarda (10nM- 1μM) uygulanması sonucu Aβ1-42 plak seviyeleri ve hücre içi lokalizasyonu. (Yeşil: Aβ1-42,Thioflavin-T; mavi: çekirdek, Hoechst 33342) (Ölçek: 100 μm)

Elde edilen floresan mikroskop görüntülerinin kantitatif analizi Image J 1.5i programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hoechst boyası ile çakışan ThT nükleer tutulum, sadece ThT ile boyanan bölgeler non-nükleer tutulum olarak değerlendirilmiştir. Buna göre, primer hipokampal hücrelere artan

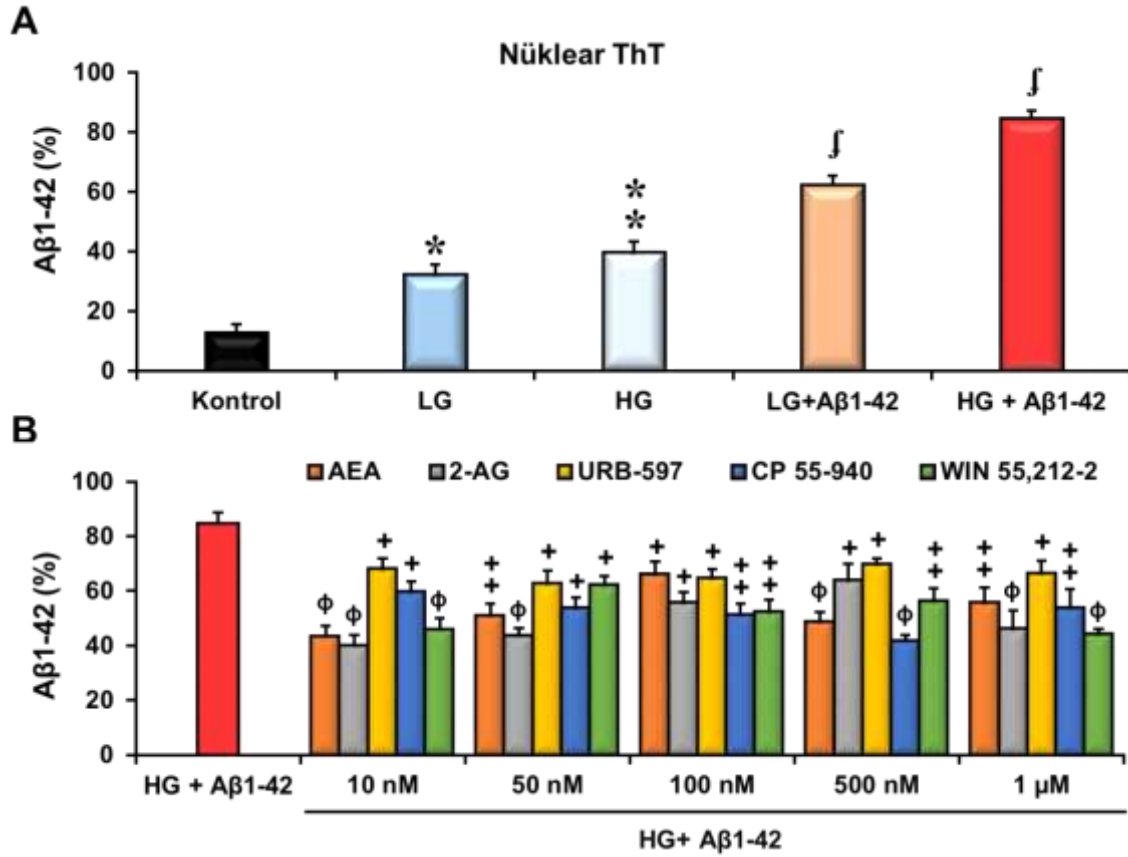
konsantrasyonlarda glukoz uygulanması ile çekirdek dışı agregat oluşumu artarken($p<0,05$), bu artış düşük glukoz (LG, 25 mM GLU) veya yüksek glukoz (HG, 150 mM GLU) içeren ortama oligomerik A β 1-42 ilave edilmesiyle istatistiksel olarak dramatik boyutlara ulaşmıştır ($p<0,05$; LG+ A β 1-42, $p<0,01$; HG+A β 1-42) (Şekil 4.15A). HG+A β 1-42 varlığında, endokannabinoid türevlerinden sadece AEA, uygulanması ile konsantrasyona bağımlı olarak tüm konsantrasyonlarda non nüklear ThT tutulumu azalmaktadır ($p<0,05$ - $p<0,001$). Sentetik kannabinomimetiklerden URB-597, 100 nM konsantrasyonda non-nüklear tutulumu ciddi şekilde azaltırken ($p<0,01$), 500 nM ve 1 μ M konsantrasyonlarda CP 55,940 ve WIN 55,212-2 gibi daha az fakat istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.15B).



Şekil 4.15. DM-AH modeli (A) ve bu modelde kannabinomimetiklerin (10nM-1 μ M) uygulanması (B) sonucu A β 1-42 plaklarının non-nüklear yerleşim yüzdeleri. LG: 25 mM glukoz; HG: 150 mM glukoz (n=4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $\ddagger p < 0.001$, çözücü verilmiş kontrol grubuna göre; + $p<0,05$, ++ $p<0,01$, $\phi p<0,001$, HG+ A β 1-42 grubuna göre;(Kruskal Wallis *post hoc* Dunn's testi)

DM-AH modelinde agregatların nüklear yerleşimi incelendiğinde, agregatların ortamda sadece glukoz varlığında nüklear yerleşimin arttığı (LG: 25 mM GLU, p

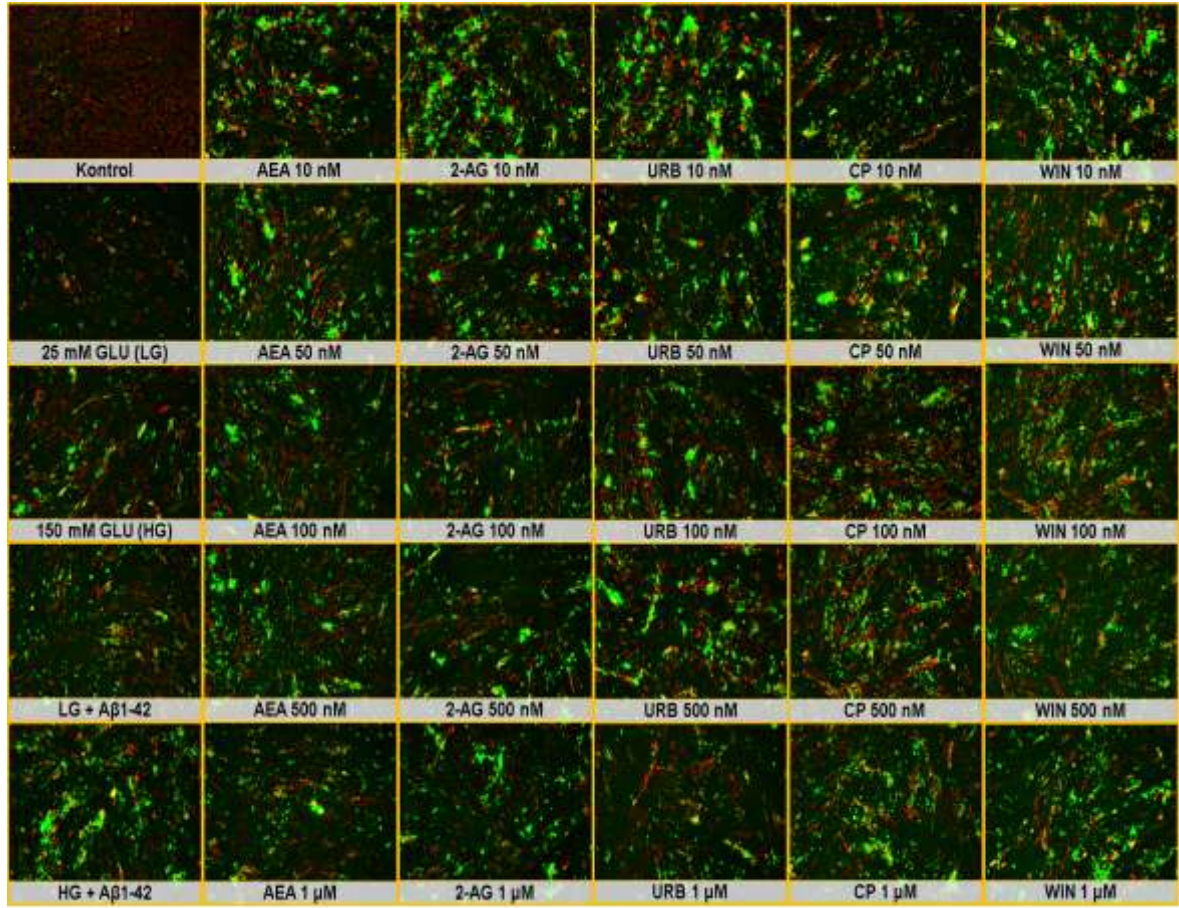
<0.05; HG: 150 mM GLU, $p < 0.01$) gözlenirken, oligomerik A β 1-42 plaklarının ilave edilmesiyle LG ve HG ortamda sırasıyla %62 ve %84 oranında tutulum gözlemiştir ($p < 0.001$) (Şekil 4.16A).



Şekil 4.16. DM-AH modeli (A) ve bu modelde kannabinomimetiklerin (10nM-1μM) uygulanması (B) sonucu Aβ1-42 plaklarının bağıl nükleer yerleşim yüzdeleri. LG: 25 mM glukoz; HG: 150 mM glukoz (n=4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $\ddagger p < 0.001$, çözücü verilmiş kontrol grubuna göre; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, $\phi p < 0.001$, HG+ Aβ1-42 grubuna göre (Kruskal Wallis *post hoc* Dunn's testi)

4.10. *In vitro* Diyabetik Alzheimer Hastalığı (DM-AH) Modelinde Kannabinomimetiklerin Mitokondri Membran Potansiyeline ($\Delta\Psi M$) Etkileri

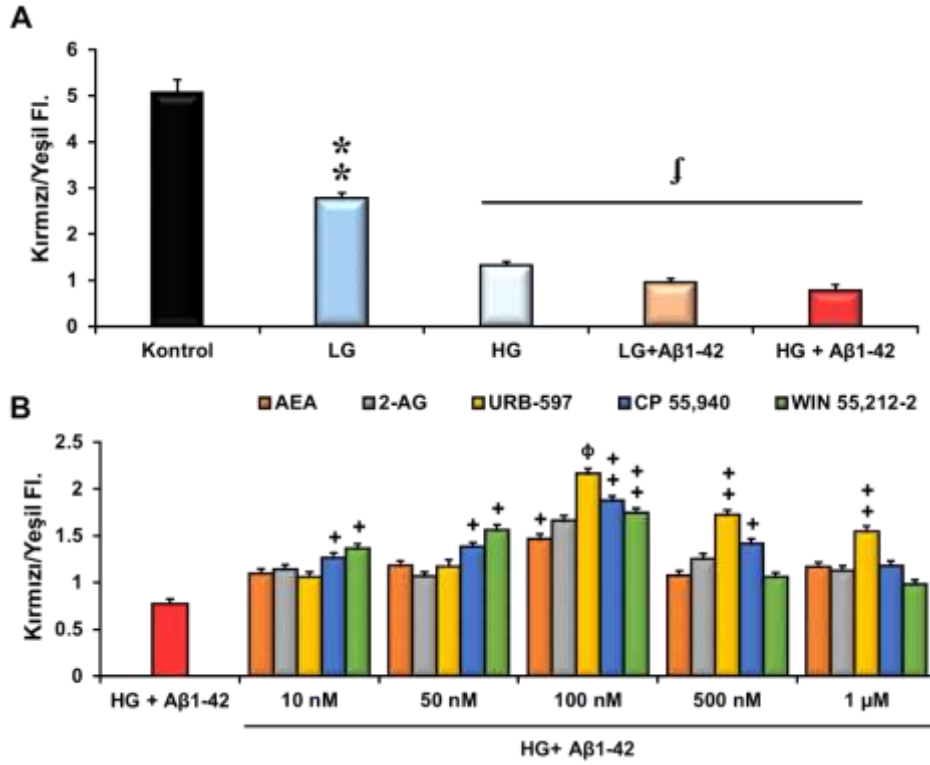
In vitro koşullarda oluşturulan DM-AH modelinde mitokondriyal fonksiyon kaybının değerlendirilmesi ve kannabinomimetiklerin bu potansiyelde meydana getirdiği değişimi incelemek üzere JC-1 mitokondriyal probu ile fluoressan boyama işlemi yapılmıştır (Resim 4.4).



Resim 4.4. DM-AH modelinde kannabinomimetiklerin farklı konsantrasyonlarda (10nM- 1μM) uygulanması sonucu mitokondri membran potansiyelinde meydana gelen değişim. (Kırmızı: JC-1 agregat, sağlıklı hücreler; Yeşil: JC-1 monomer, apoptotik/ nekrotik hücreler) (Ölçek: 100 μm)

Elde edilen floresan mikroskop görüntülerinin kantitatif analizi Image J 1.5i programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubunda mitokondriyal fonksiyonun aktif olmasına bağlı olarak JC-1 monomerlerini agregat haline getirerek kırmızı renkli floresan ışıma vermektedir. Nöron hücrelerine artan konsantrasyonlarda glukoz uygulanması ile mitokondri membran potansiyelinde düşüş gözlenmiştir (LG, $p<0,01$; HG, $p<0,001$). Aβ1-42 plaklarının uygulanmasıyla yeşil floresan (JC-1 monomer) oranı artarak, mitokondri membran potansiyelinde istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlenmiştir ($p<0,001$) (Şekil 4.17A). DM-AH modelinde, endokannabinoid türevlerinin uygulanması ile sadece 100 nM konsantrasyonda; CP 55,940 ve WIN 55,212-2 uygulanması ile 10-500 nM konsantrasyon aralığında membran potansiyelindeki düşüş geri çevrilebilmektedir. Öte yandan DM-AH modelinde azalmış olan mitokondri

membran potansiyeli, URB-597'in 100 nM, 500 nM ve 1 μ M konsantrasyonlarda uygulanmasıyla, sırasıyla ~ 3 ($p < 0,001$), 2 ($p < 0,01$) ve 2.12 kat ($p < 0,01$) artırdığı belirlenmiştir (Şekil 4.17B)



Şekil 4.17. DM-AH modeli (A) ve bu modelde kannabinomimetiklerin (10nM-1 μ M) uygulanması (B) sonucu mitokondri membran potansiyelinde meydana gelen değişim. LG: 25 mM glukoz; HG: 150 mM glukoz (n=4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $\phi p < 0.001$, çözücü verilmiş kontrol grubuna göre; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, $\phi p < 0,001$, HG+ A β 1-42 grubuna göre (Kruskal Wallis *post hoc* Dunn's testi)

4.11. *In vitro* Diyabetik Alzheimer Hastalığı (DM-AH) Modelinin Antioksidan (SOD, KAT, GPx, GRx), Oksidatif/Nitrozatif Stres (AGE, HNE, 3-NT) ve İnflamasyon (iNOS, IL- β , Tnf- α) Parametreler ile Karakterizasyonu

DM-AH modelinde, primer hipokampal hücrelere 25 mM GLU (LG), 150 mM GLU (HG), LG+ 500 nM A β 1-42 ve HG+ 500 nM A β 1-42 uygulanması sonucu antioksidan enzim aktiviteleri, oksidatif/nitrozatif stres son ürünleri ve inflamatuvar belirteçlerde meydana gelen değişim ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. Tüm kıyaslamalar kontrol grubuna (%100) göre gerçekleştirilmiştir.

ELISA analizleri sonucunda, normoglisemik ortamdaki primer hipokampal hücrelere LG uygulanması ile SOD, KAT, GPx ve GRx aktivitesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmezken ($p>0,05$), ortamdaki GLU konsantrasyonunun artması (HG) ile enzim aktivitelerinde anlamlı bir düşüş belirlenmiştir ($p<0,05$). LG ortamda A β 1-42 uygulanması ile sadece SOD ve GRx düzeylerinde anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($p<0,05$). HG+A β 1-42 grubunda ise SOD, KAT, GPx enzim aktivitelerinde ~%40 oranında azalma gerçekleşirken ($p<0,01$), GRx aktivesindeki azalma LG+A β 1-42 grubuna benzer şekilde ~%20 oranında gerçekleşmiştir (EK-1).

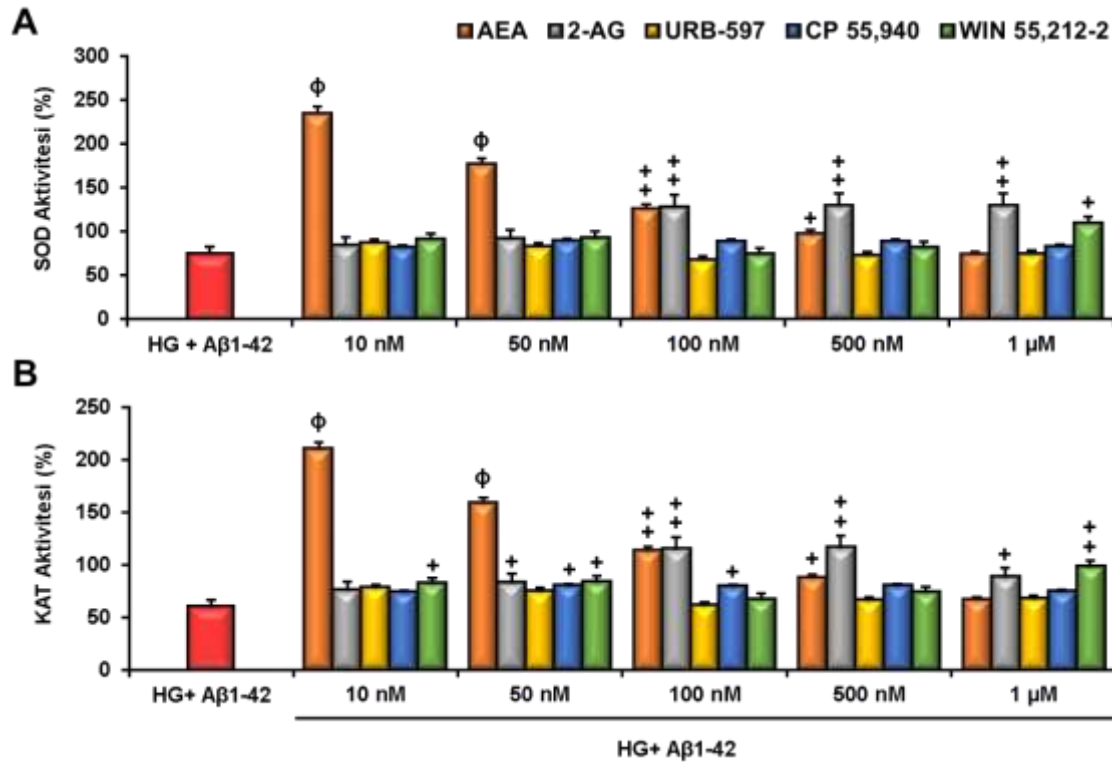
DM-AH modelinde oksidatif/nitrozatif stres son ürünlerinde meydana gelen değişim incelendiğinde, HG ortamda AGE, HNE, 3-NT düzeyleri sırasıyla %160 ($p<0,01$), %46 ($p<0,05$), %181 ($p<0,01$) oranında artmıştır. Öte yandan, LG+A β 1-42 ortamda HNE ve 3-NT düzeyleri artış trendine devam ederken ($p<0,01$), AGE düzeylerindeki artış daha az gerçekleşmektedir ($p<0,01$). HG+A β 1-42 uygulanması ile AGE, HNE ve 3-NT düzeyleri sırasıyla %372 ($p<0,001$), %210 ($p<0,01$), %355 ($p<0,001$) seviyelerine kadar yükselmiştir (EK-2).

DM-AH modelinde inflamatuvar belirteçler olan iNOS, IL- β ve Tnf- α düzeylerinin, LG ortamda kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir. Öte yandan HG ortamda IL- β ve Tnf- α düzeylerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$). LG+A β 1-42 uygulanması ile iNOS ($p<0,05$), IL- β ($p<0,01$) ve Tnf- α ($p<0,01$) düzeyleri artış trendine girmiştir. Bu artış, HG+A β 1-42 uygulanması ile dramatik boyutlara ulaşmıştır (iNOS, $p<0,01$; IL- β ve Tnf- α , $p<0,001$) (EK-3).

4.12. *İn Vitro* Diyabetik Alzheimer Hastalığı (DM-AH) Modelinde Kannabinomimetiklerin İntrinsik Antioksidan Enzim Aktiviteleri (SOD, KAT, GPx, GRx) Üzerine Olan Etkileri

Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GRx) enzimlerin bazal aktiviteleri (kontrol grubu) %100 olarak alındığında HG + A β 1-42 uygulanması ile SOD ve KAT aktivitesinde sırasıyla %25 ve %40 azalma meydana gelmiştir. AEA uygulanması ile, SOD ve KAT aktivitesi 10-500 nM konsantrasyonlarda anlamlı şekilde artırmaktadır ($p<0,001$ -

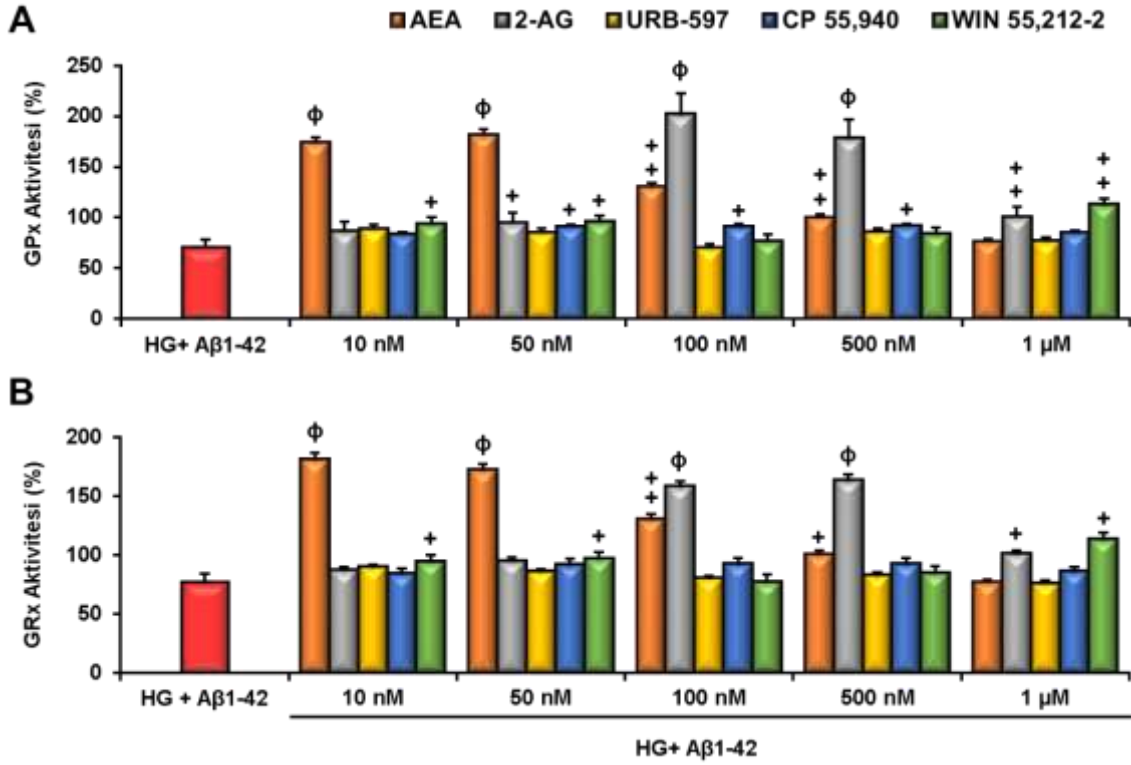
$p<0,05$). 2-AG ise SOD aktivitesini 100 nM; KAT aktivitesini 50 nM ve üzeri konsantrasyonlarda anlamlı şekilde artırmaktadır ($p<0,05$ - $p<0,01$). Sentetik kannabinomimetik WIN 55,212-2 sadece 1 μ M konsantrasyonda SOD aktivitesinde artış meydana getirirken ($p<0,05$), 10, 50, 500 nM ($p<0,05$) ve 1 μ M ($p<0,01$) konsantrasyonlarda KAT aktivitesini de artırmaktadır. CP 55,940 bileşiği ise sadece 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda KAT aktivitesinde artış meydana getirmiştir ($p<0,05$ - $p<0,01$) (Şekil 4.18)



Şekil 4.18. Artan konsantrasyonlarda (10 nM- 1 μ M, 6 saat) anandamid (AEA), 2-araşidonilgliserol (2-AG), URB-597, CP 55-940, WIN 55,212-2 bileşiklerinin DM-AH modeline uygulanması ile süperoksit dismutaz (SOD) (A) ve katalaz (KAT) (B) aktivitesinde meydana gelen değişim ($n=2$). + $p<0,05$, ++ $p<0,01$, $\Phi p<0,001$, HG+A β 1-42 grubuna göre (Kruskal Wallis *post hoc* Dunn's testi)

Kontrol grubunun GPx ve GRx aktiviteleri bazal aktivite (%100) olarak kabul edildiğinde, DM-AH modelinde aktivitesi azalmış olan GPx (%20) ve GRx (%40), AEA'nın 10-50 nM ($p<0,011$), 100-500 nM ($p<0,01$); 2-AG'nin 100-500 nM ($p<0,01$) ve 1 μ M ($p<0,01$ - $p<0,05$) konsantrasyonlarının uygulanması ile istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. CP 55,940, 50-500 nM konsantrasyonlarda sadece GPx aktivitesini artırırken($p<0,05$), WIN 55,212-2 10-

50 nM ($p<0,05$) ve 1 μ M ($p<0,01$ - $p<0,05$) konsantrasyonlarda uygulanmasıyla GPx ve GRx aktivitesini artırmıştır (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Artan konsantrasyonlarda (10 nM- 1 μ M, 6 saat) anandamid (AEA), 2-araşidonilgliserol (2-AG), URB-597, CP 55,940, WIN 55,212-2 bileşiklerinin DM-AH modeline uygulanması ile glutasyon peroksidaz (GPx) (A) ve Glutasyon redüktaz (GRx) (B) aktivitesinde meydana gelen değişim (n=2). + $p<0,05$, ++ $p<0,01$, φ $p<0,001$, HG +Aβ1-42 grubuna göre (Kruskal Wallis *post hoc* Dunn's testi)

4.13. *In vitro* Diyabetik Alzheimer Hastalığı (DM-AH) Modelinde Kannabinomimetiklerin Oksidatif/Nitrozatif Stres İleri Son Ürünleri (AGE, HNE, 3-NT) Üzerine Olan Etkileri

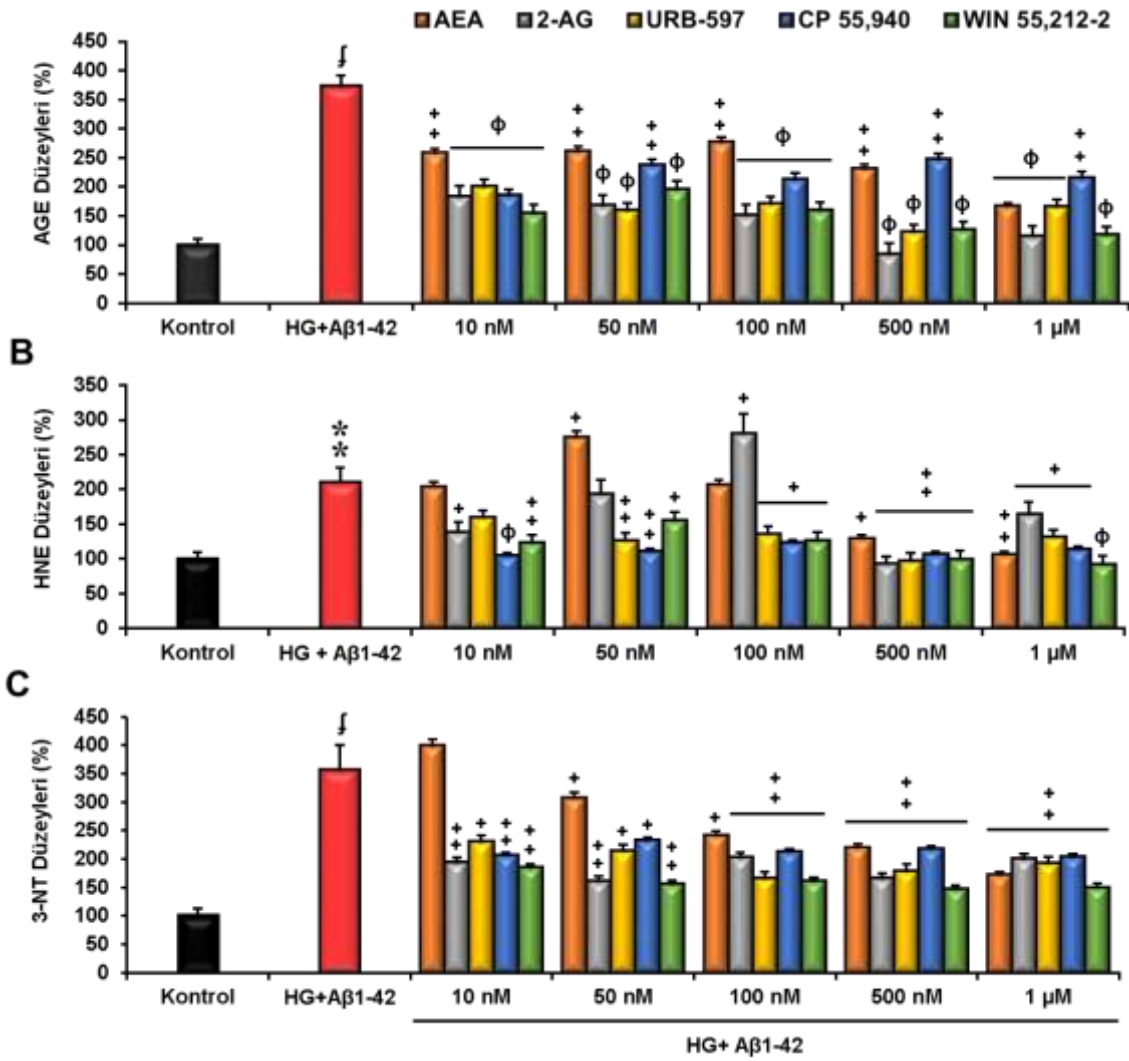
DM-AH modelinde, kontrol grubuna HG +Aβ1-42 uygulanması ile ileri glikasyon son ürünleri (AGE), ileri lipooksidasyon son ürünleri (HNE) ve nitrozatif stres son ürünü (3-NT) seviyelerinde sırasıyla %273 ($p<0,001$), %110 ($p<0,01$) ve %256 ($p<0,001$) oranında kontrol gruba göre artış gözlenmiştir (Şekil 4.20).

AEA'nın tüm konsantrasyonlarında AGE oluşumu baskılanmaktadır ($p<0,01$). Benzer şekilde, 2-AG, URB-597 ve WIN 55,212-2 bileşiklerinin uygulanan

konsantrasyonlarda, AGE seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş meydana getirmişlerdir ($p<0,001$). Öte yandan CP 55,940, HG+A β 1-42 grubundan farklı olarak, 10 nM konsantrasyonda $p<0,001$; 50 nM-1 μ M konsantrasyon aralığında ise $p<0,01$ anlamlılık derecesinde AGE düzeylerini düşürmüştür (Şekil 4.20A).

DM-AH modeline AEA, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda uygulanması HNE oluşumunu artırırken ($p<0,05$), 500 nM ve 1 μ M konsantrasyonlarda inhibe etmektedir (sırasıyla, $p<0,05$ ve $p<0,01$). 2-AG, 10 nM ($p<0,05$), 500 nM ($p<0,01$) ve 1 μ M ($p<0,05$) konsantrasyonlarda, URB-597 ise 50 nM ($p<0,01$), 100 nM ($p<0,05$), 500 nM ($p<0,01$) ve 1 μ M ($p<0,05$) konsantrasyonlarda HG+A β 1-42 aracılı HNE oluşumunu baskılamaktadır. Öte yandan, CP 55,940, 10 nM ($p<0,01$), 50 nM ($p<0,01$), 100 nM ($p<0,05$), 500 nM ($p<0,01$) ve 1 μ M ($p<0,05$) konsantrasyonlarda, WIN 55,212-2 ise 10 nM ($p<0,01$), 50 nM ($p<0,05$), 100 nM ($p<0,05$), 500 nM ($p<0,01$) ve 1 μ M ($p<0,001$) konsantrasyonlarda HNE oluşumunu azaltmaktadır (Şekil 4.20B).

HG+ A β 1-42 uygulanmasına bağlı olarak artmış 3-NT düzeyleri, AEA'nın 50 nM ($p<0,05$), 100 nM ($p<0,05$), 500 nM ($p<0,01$) ve 1 μ M ($p<0,001$) konsantrasyonlarda, 2-AG'nin tüm konsantrasyonlarda ($p<0,05$) uygulanması ile azalmıştır. Benzer şekilde sentetik kannabinomimetiklerden, URB-597, 50 nM ($p<0,05$), 100 nM ($p<0,01$), 500 nM ($p<0,01$) ve 1 μ M ($p<0,001$) konsantrasyonlarda; CP 55,940 10 nM ($p<0,01$), 50 nM ($p<0,05$), 100 nM ($p<0,01$), 500 nM ($p<0,01$) ve 1 μ M ($p<0,001$) konsantrasyonlarda and WIN 55,212-2 ise uygulanan tüm konsantrasyonlarda ($p<0,01$), HG + A β 1-42 aracılı 3-NT oluşumunu baskılamıştır (Şekil 4.20C).



Şekil 4.20. Artan konsantrasyonlarda (10 nM- 1 μM, 6 saat) anandamid (AEA), 2-araşidonilgliserol (2-AG), URB-597, CP 55-940, WIN 55,212-2 bileşiklerinin DM-AH modeline uygulanması ile AGE (A), HNE (B) 3-NT (C) aktivitesinde meydana gelen değişim (n=2). **p < 0.01, §p < 0.001, çözücü verilmiş kontrol grubuna göre; +p<0,05, ++p<0,01, Φp<0,001, HG+Aβ1-42 grubuna göre (Kruskal Wallis post hoc Dunn's testi)

4.14. *In vitro* Diyabetik Alzheimer Hastalığı (DM-AH) Modelinde Kannabinomimetiklerin İnflamatuvar Belirteçler (iNOS, IL-1 β , TNF- α) Üzerine Olan Etkileri

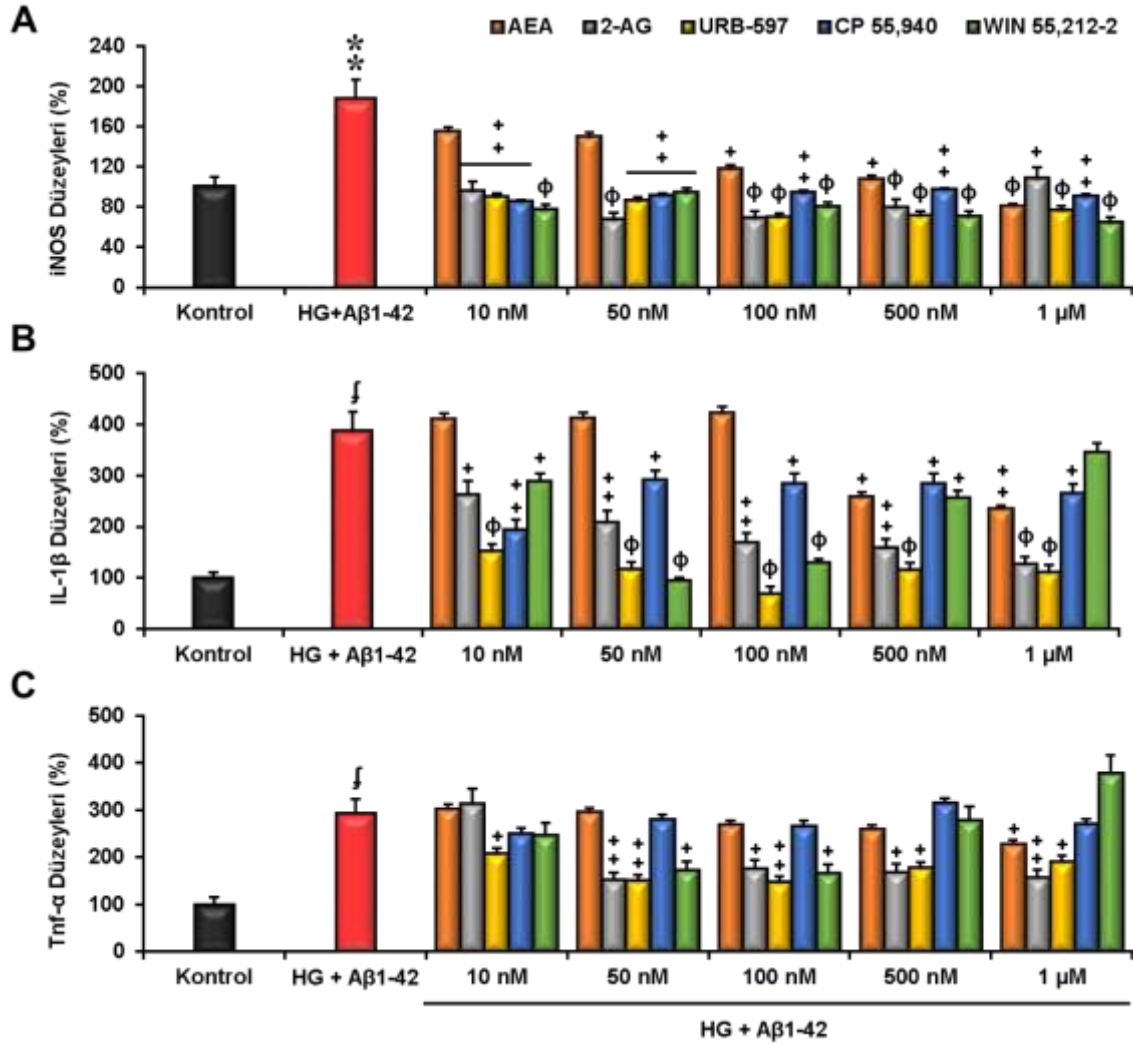
HG+A β 1-42 ile indüklenmiş DM-AH modelinde, AEA, 2-AG, URB-597, CP 55-940 ve WIN 55,212-2 bileşiklerinin artan konsantrasyonlarda uygulanması ile inflamatuvar belirteçlerde (iNOS, IL-1 β ve TNF α) meydana gelen değişimin değerlendirilmesi için kontrol grubu bazal seviye (%100) olarak alınmıştır. Buna göre, GLU+A β 1-42 uygulanmasıyla iNOS, IL-1 β ve TNF α seviyelerinde sırasıyla %88 ($p<0,01$), %286 ($p<0,001$) ve %194 ($p<0,001$) oranında artış meydana gelmiştir (Kontrol grubuna göre) (Şekil 4.21)

HG+A β 1-42 aracılığı ile artmış olan iNOS düzeyleri, AEA'nın 100 nM-1 μ M konsantrasyon aralığında uygulanması ile istatistiksel olarak anlamlı ölçüde baskılanmıştır ($p<0,05$ - $p<0,001$). Benzer şekilde diğer kannabinomimetikler uygulanan tüm konsantrasyonlarda, artmış olan iNOS düzeylerini azaltmıştır ($p<0,05$ - $p<0,001$). Meydana gelen bu azalma 2-AG, URB- 597 ve WIN 55,212-2 bileşiklerinde özellikle 100 nM ve üzeri konsantrasyonlarda dramatik boyutlara ulaşmıştır ($p<0,001$) (Şekil 4.21A).

HG + A β 1-42 grubundaki inflamatuvar yanıtı bağlı olarak IL-1 β seviyelerinde meydana gelen artış, AEA'nın sadece 500 nM ($p<0,05$) ve 1 μ M ($p<0,01$); 2-AG, URB-597 ve CP 55,940 bileşiklerinin ise uygulanan tüm konsantrasyonlarında ($p<0,05$ - $p<0,001$) baskılanmıştır. Öte yandan, WIN 55,212-2'nin özellikle 50 ve 100 nM konsantrasyonlarında uygulanması ile IL-1 β seviyelerinde dramatik bir düşüş gözlenmiştir ($p<0,001$) (Şekil 4.21B).

HG +A β 1-42 aracılığı ile artmış olan Tnf- α düzeyleri, AEA'nın sadece 1 μ M ($p<0,05$), 2-AG'nin 50 nM ($p<0,01$), 100 nM ($p<0,05$), 500 nM ($p<0,05$) ve 1 μ M ($p<0,05$) konsantrasyonlarında uygulanması ile istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir. Sentetik kannabinomimetiklerden URB-597 uygulanan tüm konsantrasyonlarda ($p<0,05$ - $p<0,01$), WIN 55,212-2 ise sadece 50 ve 100 nM ($p<0,05$) konsantrasyonlarda, HG+A β 1-42 grubuna göre Tnf- α düzeylerinde azalma meydana getirmiştir. Öte yandan, CP 55,940 uygulanması ile Tnf- α

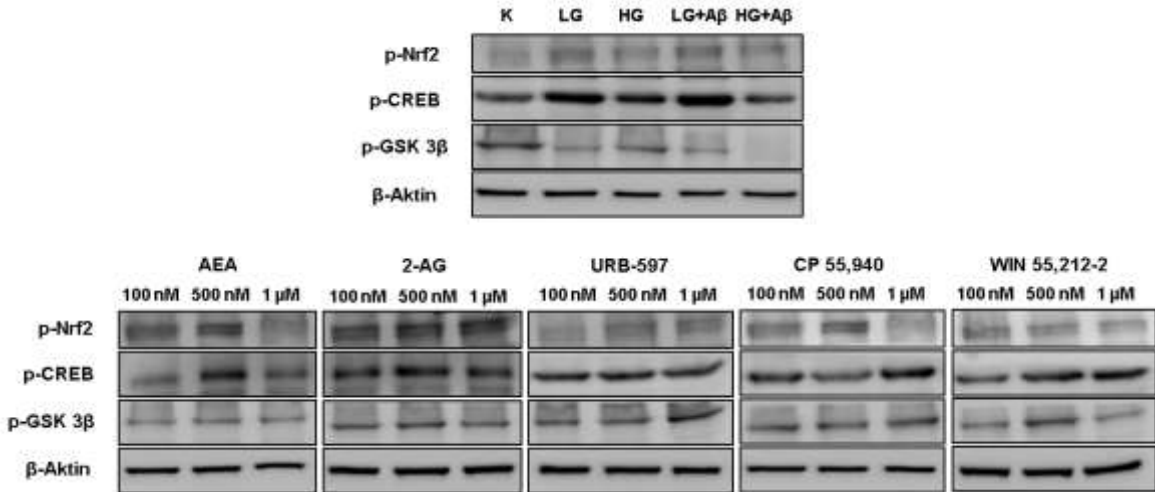
seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.21C).



Şekil 4.21. Artan konsantrasyonlarda (10 nM- 1 μM, 6 saat) anandamid (AEA), 2-araşidonilgliserol (2-AG), URB-597, CP 55-940, WIN 55,212-2 bileşiklerinin DM-AH modeline uygulanması ile indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) (A), interlökin 1 beta (IL-1β) (B) tümör nekrozis faktör alfa (Tnf-α) (C) düzeylerinde meydana gelen değişim (n=2). **p < 0.01, ^fp < 0.001, çözücü verilmiş kontrol grubuna göre; +p<0,05, ++p<0,01, ^φp<0,001, HG+Aβ1-42 grubuna göre (Kruskal Wallis *post hoc* Dunn's testi)

4.15. *In vitro* Diyabetik Alzheimer Hastalığı (DM-AH) Modelinde Kannabinomimetiklerin p-Nrf-2, p-CREB ve p-GSK 3 β Protein Düzeyleri Üzerine Olan Etkileri

DM-AH modelinde, endokannabinoidlerin ve sentetik kannabinomimetiklerin antioksidan yanıt elementi olan p-Nrf2 (aktif form), nörogenezde görev alan p-CREB (aktif form) ve inflamasyon başta olmak üzere birçok yolakla ilişkisi olan p-GSK 3 β (inaktif) protein düzeyleri western blot analizi ile ölçümlenmiştir. p-Nrf2 ve p-CREB düzeyleri nüklear; p-GSK 3 β düzeyleri ise total protein lizatından analizi yapılmıştır. Western blot analizi sonucunda kemilüminesan görüntüleme yapılarak protein bantları fotoğraflanmıştır (Resim 4.5).

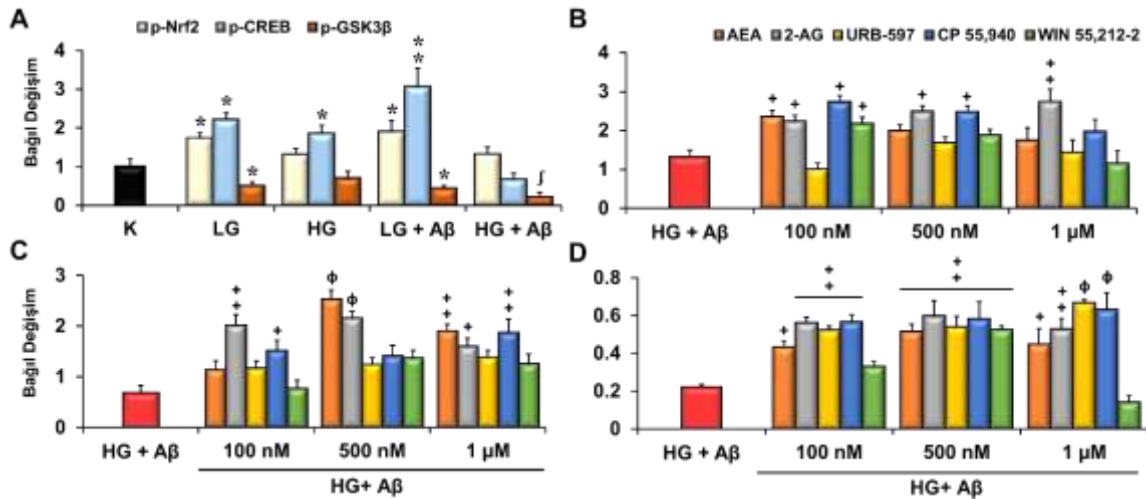


Resim 4.5. DM-AH modelinde artan konsantrasyonlarda (10 nM- 1 μ M, 6 saat) anandamid (AEA), 2-araşidonilgliserol (2-AG), URB-597, CP 55-940, WIN 55,212-2 bileşiklerinin DM-AH modeline uygulanması izole edilen p-Nrf2, p-CREB, p-GSK3 β protein bantları. K: Kontrol; LG: 25 mM glukoz; HG: 150 mM glukoz

Elde edilen protein bantlarının dansitometrik analizi için Image J 1.50i programı kullanılmıştır. Dansitometrik analiz sonucunda elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirilerek, grafiklendirilmiştir (Şekil 4.22).

Westren blot analizi sonucunda, primer hipokampal hücrelere 25 mM glukoz (LG) uygulanması ile p-Nrf2, p-CREB düzeyleri artarken ve p-GSK 3 β düzeyleri azalmaktadır ($p < 0,05$). Glukoz konsantrasyonu artırılarak hiperglisemik koşullara (HG:150 mM glukoz) ulaşıldığında p-CREB artış devam etmektedir ($p < 0,05$). LG

ortamda, A β 1-42 uygulanmasıyla p-Nrf2 ($p<0,05$), p-CREB ($p<0,01$) artarken ve p-GSK 3 β ($p<0,01$) düzeylerinde azalma meydana gelmektedir. A β 1-42'nin HG ortamına uygulanmasıyla p-Nrf2 ve p-CREB baskılanmaktadır. Öte yandan p-GSK 3 β , HG+ A β 1-42 uygulanmasıyla 6 kat daha fazla azalmaktadır ($p<0,001$) (Şekil 4.22A). HG+A β 1-42 modeline, AEA sadece 100 nM ($p<0,05$); 2-AG ise 100-500 nM ($p<0,05$) ve 1 μ M ($p<0,01$) konsantrasyonlarda uygulanmasıyla azalmış olan p-Nrf2 düzeylerinde artış meydana getirmektedir. Benzer şekilde WIN 55,212-2 sadece 100 nM; CP 55,940 ise 100 ve 500 nM konsantrasyonlarda p-Nrf2 düzeylerini artırmaktadır ($p<0,05$) (Şekil 4.22B). HG+A β 1-42 modelinde düşük olan p-CREB düzeyleri, AEA'nın 500 nM ($p<0,001$) ve 1 μ M ($p<0,01$); 2-AG'nin 100 nM ($p<0,01$), 500 nM ($p<0,001$), 1 μ M ($p<0,01$) ve CP 55,940 bileşiğinin 100 nM ($p<0,05$) ve 1 μ M ($p<0,01$) konsantrasyonlarının uygulanması ile artmaktadır (Şekil 4.22C). Diğer proteinlerden farklı olarak HG+A β 1-42 modelinde dramatik şekilde azalan p-GSK3 β seviyeleri, tüm kannabinomimetikler (100 nM) tarafından artırılmakta ($p<0,01$), özellikle URB-597 ve CP 55,940 (1 μ M) uygulanması ile bu artış dramatik boyutlarda gerçekleşmektedir ($p<0,001$) (Şekil 4.22D).



Şekil 4.22. DM-AH modelinde (A), p-Nrf2 (B), p-CREB (C), p-GSK3 β (D) proteinlerinin dansitometrik analizi. K: Kontrol; LG: 25 mM glukoz; HG: 150 mM glukoz (n=3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $\phi p < 0.001$, çözücü verilmiş kontrol grubuna göre; + $p<0,05$, ++ $p<0,01$, $\phi p<0,001$, HG+A β grubuna göre (Kruskal Wallis *post hoc* Dunn's testi)

4. TARTIŞMA

Alzheimer hastalığı (AH), yaşlı popülasyonda görülen demans sebeplerinin başında gelen kronik progresif bir hastalıktır. Ekstraselüler amiloid beta ($A\beta$) plaklarının ve intraselüler nörofibriler yumakların (NFY) birikmesi ile karakterize olan bu hastalıkta, yaygın nöronal hücre kaybına bağlı kognitif bozukluklar meydana gelmektedir [298]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, kronik hiperglisemi, hiperlipidemi, insulin rezistansı ve oksidatif stres gibi patofizyolojik komplikasyonlarla karakterize Diabetes mellitus (DM) olgularında, hipokampal nöronlarda ve kognitif fonksiyonlarda azalma meydana geldiği gösterilmiştir [6, 7]. Bu bilgiler doğrultusunda DM'nin, AH'nın oluşumu veya progresyonunda risk faktörü olduğunu göstermektedir [8]. Ayrıca DM ve AH'nın patogeneplerinde oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, inflamasyon, hücre içi yüksek Ca^{2+} seviyeleri gibi birçok ortak yolağın bulunması iki hastalığın birbiriyle doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir [9]. Günümüzde, AH ve DM arasındaki ilişkinin aydınlatılarak, potansiyel terapötik ajanların geliştirilmesini içermektedir. Kannabinoid sistem, periferik ve merkezi sinir sisteminde (MSS) birçok patolojik ve fizyolojik fonksiyonlarda görev almaktadır [17]. MSS'de nöronal plastisite, nöroinflamasyon, nörodejenerasyon, sirkadyan ritim ve redoks homeostazındaki rollerinin aydınlatılması ile kannabinoid sistem düzenleyicilerinin AH'da potansiyel terapötik etkilerinin olabileceği hipotezi ortaya atılmıştır [18, 19]. Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda, kannabinoid türevi ajanların primer hipokampal nöron hücrelerinde yüksek glukoz ve oligomerik $A\beta$ peptidleri ile indüklenerek oluşturulmuş DM-AH toksik modelindeki, etki ve etki mekanizmaları araştırılmıştır.

Hipokampal nöron hücrelerinin primer kültürleri, Alzheimer hastalığında (AH) görülen hipokampal dejenerasyonun değerlendirilmesinde ve $A\beta$ 1-42 aracılı toksisite modellerinin oluşturulmasında yaygın olarak kullanılmaktadır [299, 300]. Çalışmamızda primer hipokampal hücreler, şıçanlardan (E18-19) izole edilip, kültüre edildikten sonra farklılaşmaları sağlanarak karakterize edildikten sonra tüm deneyler gerçekleştirilmiştir (Bkz. Resim 4.1).

Çalışmamızda, öncelikle endokannabinoidler olan anandamid (AEA) ve 2-arahidonilgliserol (2-AG) ve sentetik kannabinoidler URB-597, CP 55,940 ve WIN

55,212-2 bileşiklerinin primer hipokampal hücrelerdeki toksisitesi mitokondriyal aktiviteyi de gösteren MTT ve hücre içi proteinlere seçici geçirgen membrandan geçerek bağlanan NR boyası ile değerlendirilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda, ajanlarımızın her iki yöntemde de toksisitesine rastlanmamış ve yüksek konsantrasyonlarda ise canlılığın azaldığı gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).

DM-AH modelinde, hiperglisemik koşulun oluşturulması ve optimal glukotoksik konsantrasyonun belirlenmesi için hücrelere D-Glukoz (GLU) uygulanmıştır. Yapılan çalışmalar, hiperglisemik koşulların sinir doku hasarına aracılık ettiği ve bu etkilerini oksidatif hasara bağlı glikasyon ürünlerinin oluşarak, hücre içi reaktif oksijen/nitrojen türevlerinden (ROS/RNS kaynaklandığı bildirilmiştir [301, 302]. Literatürde yer alan bazı çalışmalar, hiperglisemik hasarın oluşturulmasında 25-75 mM GLU konsantrasyon aralığını kullanırken [303, 304], çalışmamızda bu konsantrasyon aralığında toksik etki gözlenmemiş ve bu hasarın 125-150 mM gibi yüksek GLU konsantrasyonlarında gerçekleştiği belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.3). Elde ettiğimiz bulguları destekler nitelikteki çalışmalarda da 150 mM GLU uygulanması ile primer hipokampal nöron hücre kültürlerinde hiperglisemik modelin oluşturulabileceği gösterilmiştir [305, 306]. Farklı çalışma grupları tarafından farklı koşulların optimal sayılması sebebiyle, kullanılacak olan GLU konsantrasyonunu belirlemek üzere hücre proliferasyonu, toksisitesi ve adezyon profili hakkında bilgi veren iCELLigence sistemi ile eş zamanlı olarak hücrelerde meydana gelen değişim grafiksel olarak takip edilmiştir [307-309]. Elde ettiğimiz bulgulara göre, primer hipokampal hücrelerde optimal hiperglisemik koşulun oluşturulmasında 150 mM GLU konsantrasyonunun 48 saat süreyle uygulanmasına karar verilmiştir (Bkz. Şekil 4.4).

Çalışmamızda, 150 mM GLU uygulanarak oluşturulan hiperglisemik modelde, kannabinomimetiklerin 6 saat süreyle uygulanması ile hiperglisemiye bağlı hücre canlılığındaki azalmayı geri döndürdüğü belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.5). Nöronal hücrelerdeki hiperglisemik hasarın temel sorumlusu olarak oksidatif stres ve ilişkili yollar gösterilmektedir [310, 311]. Bu nedenle, çalışmamızda kannabinomimetiklerin potansiyel protektif etkilerinin bu yollar üzerinden doğrudan veya dolaylı olarak gerçekleşebileceği düşüncesi ortaya çıkmıştır. CB1

reseptör agonisti HU-210 kullanılarak yapılan bir çalışmada, diyabetik farelerde ve hiperglisemik rat feokromastoma hücrelerinde (PC12 hücreleri) oksidatif strese bağlı nöronal hasarın kannabinoid reseptörlerinden bağımsız olarak rejenere edildiği gösterilmiştir [312]. Ayrıca yakın zamanda yapılan bir çalışmada, orta yaşlı streptozotosin uygulanmış sıçanlara kannabidiol uygulanması ile metabolik fonksiyon kaybının antioksidan mekanizmalar üzerinden geri döndürüldüğü gösterilmiştir [313].

DM-AH modelinde, lipotoksik koşulun oluşturulması ve optimal lipotoksik konsantrasyonun belirlenmesi için hücrelere palmitik asit (PAM) uygulanmıştır. PAM konsantrasyon ve maruziyet süresine bağımlı olarak nörotoksisiteyi artırdığı gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.6). iCELLigence bulguları da dikkate alınarak, 24 saat inkübasyon ile PAM/BSA'nın toksik etkisinin başladığı an olarak ilk 4 saat belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.7). Primer hipokampal hücreler, kannabinomimetikler ile 50 saat (6+44) koşullandırılıp 4 saat süreyle PAM uygulanması sonucunda, endo kannabinoidlerden 2-AG ve sentetik türevlerden CP 55,940 dramatik şekilde lipotoksisiteyi baskılamıştır. Etkilerini daha çok CB1 reseptörleri üzerinden gösteren CP 55,940 ve WIN 55,212-2 bileşiklerinden sadece CP 55,940'de bu etkinin gözlenmesi CB1R dışındaki mekanizmalardan kaynaklandığını düşündürmektedir (Bkz. Şekil 4.8). Yapılan çalışmalar PAM'ın nöronal hücrelerde endoplazmik retikulum stresini uyarak katlanmamış protein yanıtını oluşturduğu, mitokondriyal membran bütünlüğünü bozarak oksidatif stresi uyardığı, MAPK/ERK yolağı üzerinden proliferasyonu baskıladığı ve Akt/mTOR yolağı üzerinden otofaji aracılı apoptozu uyarak nöronal hasara aracılık ettiği gösterilmiştir [314-316]. CP 55,940 bileşiğinin mitokondriyal disfonksiyonu bloke ederek oksidatif stresi baskıladığı ve nöronal sağkalımı uyardığı gösterilmiştir [17]. Bu da çalışmamızdaki protektif ekiyi desteklemektedir.

Elde ettiğimiz glukotoksisite ve lipotoksisite bulgularına göre, hücrelere GLU (150 mM, 44 saat) uygulanarak ardından ortamda GLU varlığında PAM/BSA (4 saat) uygulanarak glukolipotoksisite modeli (GLU+PAM) oluşturulmuştur (Bkz. Şekil 4.9). Kannabinomimetikler ile 6 saat koşullandırma yapıldıktan sonra GLU+PAM toksisitesi değerlendirildiğinde, AEA bileşiği herhangi bir protektif etki göstermezken diğer ajanlar da düşük konsantrasyonlarda çok az protektif etki

göstermiştir (Bkz. Şekil 4.10). Oluşturduğumuz GLU+PAM modeline benzer şekilde monosit ve pankreatik β hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, düşük (25 mM-30 mM) glukoz ve PAM uygulanması ile ER stresin uyarıldığı, hücre içi ROS düzeylerinin artarak Nrf2 yolağının baskılandığı gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, GLU+PAM toksisitesini, antioksidan yolakların uyarılması, AMPK/mTOR/p70S6K yolağının aktive edilmesi veya peroksizom proliferatör-aktive reseptör (PPAR) aktivasyonu ile tedavi edilebileceği gösterilmiştir [317-320].

Kannabinomimetiklerin, GLU+PAM modelindeki etkileri ilk defa yapmış olduğumuz çalışmada gösterilmiştir. Fakat elde ettiğimiz GLU+PAM modelinde kannabinomimetiklerin dramatik bir protektif etki göstermemesi, GLU+PAM+A β ile oluşturulacak Alzheimer hastalığı modelinde geri dönüşsüz oksidatif hasar ve ER stres başta olmak üzere eksitotoksitenin hakim olduğu bir model ortaya çıkacaktır. Yapılan çalışmalarda, PAM uygulanması hücrelerde insulin direncini uyararak glukoz toksisitesini artırdığı, APP ve BACE1 seviyelerini artırarak A β oluşumunu ve birikimini uyardığı, Akt/mTOR/HIF-1 α ve Akt/NF- κ B yolakları üzerinden otofaji ve nöroinflamasyonu uyaracağı bildirilmiştir [321-323]. Bu nedenle çalışmamızda, GLU+PAM modeline A β uygulayarak oluşturulacak kompleks patogeneizde, kannabinomimetiklerin potansiyel protektif etkileri maskeleneceğinden, HG+ A β ile oluşturulmuş DM-AH modeli üzerinden devam edilmiştir. Bu modelin oluşturulması sırasında, primer hipokampal hücrelere A β oligomerleri uygulanarak toksisiteleri değerlendirilmiş ve 6 saat kannabinomimetikler ile koşullandırılan hücrelere 24 saat süreyle A β oligomerleri uygulanarak *in vitro* tedavi protokolü oluşturulmuştur. Elde ettiğimiz bulgulara göre 100 nM konsantrasyonlarda tüm kannabinomimetikler protektif etki gösterirken WIN 55,212-2 sadece 1 μ M konsantrasyonda etki göstermiştir (Bkz. Şekil 4.11). Bizim çalışmamızı destekleyen şekilde A β aracılı toksisitenin kannabinomimetikler aracılığı ile baskılandığını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır [324-328].

A β uygulaması ile oluşturulan AH modelinin, hiperglisemik (HG, 150 mM GLU) ortamdaki toksisitesi değerlendirilerek DM-AH modeli oluşturulmuştur (Şekil 4.12). 24 saat HG ve ardından HG ortamda 24 saat 500 nM A β verilmesi ile, primer hipokampal hücrelerde hücre canlılığının azalarak, hücre içi ROS

düzeylerinin arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.13). A β peptidlerinin yüksek seviyelerde hipokampal hücrelerde birikmesi ile inflamatuvar yanıtın oluşması, nöronal hücre kaybı ve kademeli olarak kognitif fonksiyon kaybı meydana gelmektedir [329]. Meydana gelen hücre kaybı ve nörit dejenerasyonu, hiperglisemik koşulların hakim olduğu diyabetik ratlarda spontan olarak da gerçekleşebilmektedir [330].

Çalışmamızda, hiperglisemik ortamda A β uygulanması ile nöronal hücrelerin canlılığında meydana gelen azalma endokannabinoidler (AEA, 2-AG) ve sentetik cannabinoidlerin (URB-597, CP 55,940, WIN 212,2-2) uygulanması ile arttığı gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.14). Benzer şekilde GLU+A β uygulanması ile ROS düzeylerinde meydana gelen artış, kannabinomimetikler ile dramatik bir şekilde baskılanmıştır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, eksitotoksisite ve oksidatif stres aracılı nörotoksisite modellerinde endokannabinoidler, sentetik cannabinoidler ve FAAH inhibitörü URB-597'nin nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir [331-334]. Kannabinomimetiklerin farklı nörotoksisite modellerindeki etkileri bilinmektedir. Fakat HG+A β modelinde, kannabinomimetiklerin potansiyel protektif etkileri ile ilgili herhangi bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Bu nedenle etkilerini doğrudan CB1 ve CB2 reseptörleri üzerinden gösteren CP 55,940 ve WIN 55,212-2 hücre canlılığında meydana gelen artış ve hücre içi ROS düzeylerinin baskılanmasıyla ve benzer etkilerin AEA ve 2-AG'de de gözlenmesi, CB1R/CB2R aracılı yolların aktive olduğunu göstermektedir. Öte yandan URB-597 bileşiği, FAAH enzimi inhibisyonuna bağlı olarak AEA seviyelerini artırması ile dolaylı yoldan CBR aracılı yolları uyarmaktadır.

HG ortamda A β oligomerlerinin agregatlaşma süreçlerine ve kannabinomimetiklerin bu süreçlerdeki etkisini ThT boyası ile değerlendirildiğinde, HG+A β varlığında, A β plaklarının çekirdek dışı yerleşimin yüksek olduğu ve bu yerleşimin özellikle AEA ve URB-597 tarafından dramatik şekilde, CP 55,940 ve WIN 55,212-2 ile kısmen azaltıldığı gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.15). 2-AG uygulanması anlamlı bir değişiklik meydana getirmemiştir. Öte yandan, tüm kannabinomimetiklerin A β plaklarının çekirdek yerleşimini baskıladığı gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.16). Bizim çalışmamızdan farklı olarak Harvey ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, A β peptidlerinin hücrelere uygulanmasını takiben 20. saatten itibaren ThT aracılı fluoresan ışımının arttığı belirlenmiştir.

Artan bu ısımanın AEA varlığında da devam ediyor olması ile AEA'nın A β peptidlerin agreagasyon sürecine doğrudan etki göstermediği sonucunu çıkarmaktadır [265]. Normoglisemik ortamda gerçekleştirilen bu çalışma ile bizim çalışmamız kıyaslandığında, hiperglisemik ortamın kannabinomimetiklerin davranışında farklı etkiler ortaya çıkarabileceğini göstermektedir. Öte yandan, BV2 ve SH-SY5Y hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise, A β oligomerlerinin 6 saatten sonra fibrileşmeye başlayarak, 12-14 saatte stabil hale geldiği belirlenmiştir. 2-AG veya AEA uygulanması ile bu fibrillasyon mekanizması baskılanarak protektif etki gözlenmiştir. Bu etkinin gözlenmesinde de CB1 ve CB2 reseptörlerinin doğrudan bir rolünün olmadığı sonucuna varılmıştır [335]. Bu bulguların aksine, kannabinoid reseptörlerinin tam agonisti olan 2-AG, selektif CB1R (SR141716), CB2R (SR144528) ve TRPV1 (kapsazepin) selektif antagonistlerinin kullanıldığı bir çalışmada, primer hipokampal hücrelerde A β toksisitesine bağlı nöronal kaybı, CB1R aracılığı ile ERK1/2, NF- κ B ve siklooksijenaz-2 (COX-2) yollarını baskılayarak engellediği bildirilmiştir [336].

Hücrelerde A β agregatlarına bağlı toksisite ve oksidatif stres arasında doğrudan bir bağlantı olduğu bilinmektedir [337, 338]. Elde ettiğimiz bulgular, bunu destekler nitelikte olup hiperglisemik ortamda A β toksisitesinin daha da arttığı belirlenmiştir. Hücrelerde oksidatif stresin ana kaynaklarından biri mitokondri olup, nöronal homeostazın sağlanmasında kritik role sahiptir [339]. Bu nedenle mitokondriyal membran potansiyelinde meydana gelen değişiklikler, enerji metabolizması ve mitokondriyal fonksiyon kaybına yol açmaktadır [340]. Mitokondriyal disfonksiyon ise AH gibi diğer nörodejeneratif hastalıklarının patogeneze katkı sağlamaktadır [341, 342]. Çalışmamızda, HG+A β uygulanmasının mitokondri membran potansiyelini ($\Delta\Psi$ M) azaltarak mitokondriyal disfonksiyona aracılık ettiği belirlenmiştir. $\Delta\Psi$ M'de meydana gelen azalma sentetik kannabinomimetikler tarafından baskılandığı gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4. 17). Çalışmamıza benzer şekilde, hiperglisemik koşulların, hücre içine kalsiyum girişini artırarak endoplazmik retikulum stresi ve bununla ilişkili (crosstalk) olarak mitokondriyal disfonksiyona aracılık ettiğini bildirilmiştir [343]. Ayrıca, Yang ve ark. (2017) tarafından SH-SY5Y (nöroblastoma) hücreleri kullanılarak oluşturulan diyabetik ensefelopati modelinde hiperglisemik ortamda, mitokondriyal kompleks I ve III aktivitesinin baskılanarak hücre içi ROS düzeylerinin arttığı ve mitokondriyal

membran potansiyelinin azalarak hücrelerden LDH saliverilmesi ile nöronal kaybın olduğu gözlenmiştir [344]. Kannabinomimetiklerin, hiperglisemik koşullarda mitokondriyal disfonksiyon üzerine olan etkilerini gösteren bir çalışma olmamasına rağmen Rangel-Lopez ve ark. (2015) tarafından oluşturulan nöronal eksitotoksiste modelinde sentetik kannabinoidlerin kısa süreli uygulanması ile mitokondriyal disfonksiyonu baskıladığı gösterilmiştir [334]. Ayrıca, AH gibi hipereksitabilitenin eşlik ettiği patogenezlere CBD uygulaması ile kalsiyumun hücre içi girişinin azaldığı ve kalsiyum osilasyonlarının ortadan kalktığı bildirilmiştir. Bu protektif etkinin ER'da yer alan ryanodine ve IP3 reseptörlerinden bağımsız olarak gerçekleştiği belirlenmiştir. CBD'nin doğrudan mitokondri üzerinde yer alan Na/Ca pompasını regüle ederek mitokondriyal membran potansiyelini koruduğu gösterilmiştir [345].

Çalışmamızda, kannabinomimetiklerin mitokondriyal disfonksiyon ve artmış ROS düzeylerindeki protektif etkileri intrinsik antioksidan aktivitede görev alan enzimlerin (SOD, KAT, GPx ve GRx) düzeylerindeki artış ile açıklanabilmektedir (Bkz. Şekil 4.18 ve Şekil 4.19). HG+Aβ uygulanması ile azalmış olan antioksidan kapasite, birden fazla reseptör ile etkileşerek etki gösteren endokannabinoidlerin uygulanması ile dramatik artış gözlenmiş, öte yandan CB1R/CB2R agonistlerinde bu artışın daha az gerçekleşmiştir. Wang ve ark. (2019) tarafından kronik serebral hipoperfüzyon oluşturulmuş ratlara WIN 55,212-2 uygulanmasının, SOD ve KAT seviyelerini artırdığı, ROS ve malondialdehit (MDA) seviyelerini azalttığı bildirilmiştir [346]. Buradan yola çıkıldığında çalışmamızda endokannabinoidlerin antioksidan aktivitedeki dramatik artışta CBR dışı yolların katkı sağladığı sonucuna varılmaktadır.

HG ve Aβ1-42 plakları, nöronal hücrelerde koordineli bir şekilde dejenerasyona aracılık etmektedir [347]. Bu yolların başında oksidatif ve nitroztatif stres gelmekle birlikte redoks dengesinin bozulmasına bağlı katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin oluşumu, NMDA reseptörü hiperaktivasyonuna bağlı hücre içi Ca^{2+} aşırımı ve nitrik oksit sentaz aktivitesindeki artışa bağlı nöronal disfonksiyon yaygın görülmektedir [347]. Çalışmamızda da, HG ve Aβ1-42 uygulanarak oluşturulan modelde oksidatif/nitroztatif son ürünleri (AGE, HNE, 3-NT) ve inflamatuvar belirteçlerin düzeyleri (iNOS, IL-1β ve Tnf-α) dramatik şekilde

artmaktadır. Kannabinomimetiklerin uygulanması ile azalan bu belirteçler, primer hipokampal hücrelerde A β toksisitesine bağılı nöronal kaybı, CB1R aracılığı ile ERK1/2, NF- κ B ve siklooksijenaz-2 (COX-2) yolaklarını baskılayarak engellediğı bildirilmiştir [336]. Ayrıca Rivera ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, URB-597'nin uygulanması ile CB1 reseptörlerinin düzeylerinin hipokampüste azaldığı, buna bağılı olarak artan AEA'nın PPAR aracılığıyla RAGE ve NF- κ B yolağını baskılayarak inflamasyonu baskıladığı bildirilmiştir [348].

Kannabinomimetiklerin, HG+ A β 1-42 modelinde artmış olan inflamasyon ve oksidatif stres parametrelerinin azaltılmasının antioksidan cevap elementi olan ve oksidatif stres varlığında nüklear yerleşim gösteren Nrf-2 fosforilasyon düzeyleri ölçülmüştür. Elde ettiğimiz bulgulara göre FAAH inhibitörü URB-597'nin doğrudan antioksidan yanıtı oluşturmadığı, endokannabinoidler ve CB1R/CB2R kannabinoid agonistlerinin ise Nrf-2'nin nüklear yerleşimi uyardığı belirlenmiştir. Çalışmamıza benzer şekilde MDA-MB231 ve MCF7 meme kanseri hücre hatlarına, URB-597 ve AEA uygulanması ile Nrf-2 ve efektörü olan HO-1 düzeylerinin arttığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada URB-597'nin doğrudan Nrf2 düzeylerini artırmadığı, FAAH inhibisyonuna bağılı olarak artan AEA seviyeleri ile bu etkinin ortaya çıktığı sonucuna varılmıştır [349]. Ayrıca lipopolisakkarit (LPS) ile oksidatif stres ve inflamasyonun indüklendiğı mikroglial hücrelerde (BV2), CBD uygulanması ile Nrf2/ATF4 yolağının aktive olarak oksidatif stres ve inflamasyonun baskılandığı belirlenmiştir [350].

Db/db diyabetik fareleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, reaktif oksijen ve nitrojen türevlerinin hipokampüste birikim gösterdiği ve bunun Nrf2 proteininin nüklear yerleşiminin baskılanmasından kaynaklandığı belirtilmiştir [351]. Ayrıca, streptozosin diyabetik sıçanlarda siyatik sinir ve nöronal hücrelerde yüksek glukoz konsantrasyonuna bağılı olarak Nrf-2 ve HO-1 seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir [352]. Farklı bir çalışmada ise, antioksidan yanıt elementi olan Nrf-2/HO-1 yolağının, hem gen hem de protein düzeyinde baskılanarak, inflamatuvar NF κ B yolağının aktif hale geçtiğı belirlenmiştir [353].

Bu yolakların başında oksidatif ve nitrozatif stres gelmekle birlikte redoks dengesinin bozulmasına bağılı katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin

oluşumu, NMDA reseptörü hiperaktivasyonuna bağlı hücre içi Ca^{2+} aşırımı ve nitrik oksit sentaz aktivitesindeki artışa bağlı nöronal disfonksiyon yaygın görülmektedir [347]. Melas ve ark. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, CB1/CB2 agonisti olan WIN 55,212-2, protein fosfataz 1 (PP1) aktivitesini (GADD34) artırarak, uzama başlangıç faktörü 2 alfa (eIF2 α)'nın defosforilasyonunu hızlandırdığı belirlenmiştir [354]. EIF2- α , hücrelerde protein sentezinde translasyonun başlamasında görev alan bir protein olup, fosforilasyon yoluyla inaktive olmaktadır [355]. GADD34, fosforile halde bulunan eIF2 α 'nın, defosforilasyonunu sağlayarak hücrelerde sağkalım ve protein sentezini uyarmaktadır [356]. Melas ve ark. (2018), GADD34 gen lokusunda bulunan CRE dizilerine CREB/CBP kompleksinin bağlanması ile GADD34 proteininin ifadenmesinin arttığını ve WIN 55,212-2 (1 saat) uygulanmasının CREB fosforilasyonunu uyararak 6. saatte GADD34 üretiminin gerçekleştiğini göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada, CREB geninin çıkarılması ile WIN 55,212'nin GADD34 aktivitesine ve dolaylı olarak p-eIF2 α düzeylerine etki etmediği gösterilmiştir. Bu da WIN 55,212'nin CREB fosforilasyonunu uyararak nöronal protein sentezini artırdığını göstermektedir [354]. Hücrelerde CREB fosforilasyonu, mitojen aktive protein kinaz/ekstraselüler sinyal regüle kinaz (MAPK/ERK), protein kinaz (A) ve Ca^{2+} /kalmodyulin bağımlı kinaz IV (CaMKIV) yolları aracılığı ile gerçekleşmektedir [357]. WIN 55,212-2'nin tek başına uygulanması ile CREB fosforilasyonunun arttığı fakat MEK1/2 (U0126) veya CB1/2R (AM251/AM630) antagonistleri ile birlikte uygulanmasıyla bu etkinin ortadan kalktığının gösterilmesiyle nöronal hücrelerde, WIN 55,212-2'nin kannabinoid reseptörlerini etkileyerek, MAPK/ERK yolağı üzerinden nörogenezi sağladığını ortaya koymaktadır [354]. Öte yandan, çalışmamızda artan konsantrasyonda GLU uygulanması ile ER aracılı adaptif yanıtın uyarılması ile p-CREB düzeyleri artış gösterirken HG+ A β 1-42 uygulanması nörogenez belirteci olan p-CREB anlamlı ölçüde azalmaktadır. Bu azalma URB-597 uygulanması ile geri döndürülemezken, kannabinomimetiklerin uygulanması ile Melas ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmaya benzer şekilde p-CREB düzeylerinde artış gözlenmiştir. Kannabinomimetiklerin, p-Nrf2 ve p-CREB düzeylerinde meydana getirdikleri artışın benzer profil göstermesi, bu ajanların doğrudan Nrf2/ARE ve CREB/HO-1 ekseninden nörogenezi uyarak antioksidan yanıt oluşturduğunu göstermektedir. Elde ettiğimiz bulguların, birçok yolak ile ilişkilendirilen ve DM ile

AH patogenezinde kritik role sahip olan GSK 3 β yolağı ile ilişkilendirildiğinde, kannabinomimetiklerin, HG+ A β uygulanması ile baskılanmış olan GSK3 β aktivitesini artırdığı gözlenmiştir. GSK 3 β , temel olarak PI3K/Akt yolağı üzerinden baskılanmaktadır. DM ve AH'da ise hiperglisemik ortamda GSK 3 β fosforilasyonu baskılanarak aktif hale geçen GSK3 β , tau fosforilasyonunu uyararak AH'nın patogenezinin ileriye götürmektedir [204, 215].

Çalışmamızda, p-GSK3 β , p-Nrf2 ve p-CREB düzeylerinin HG+ A β uygulanması ile azaldığı, meydana gelen bu azalmanın ise kannabinomimetikler (özellikle CB1R/CB2R agonistleri) ile artırılmış olması PI3K/Akt yolağının etkin olduğunu göstermektedir. Çünkü yapılan çalışmalar AH'da, GSK3 β , CREB, Nrf2 sinyal yollarının eş zamanlı olarak uyarılması ile nöroenezin baskın hale geçerek, oksidatif stres aracılı inflamasyonun baskılandığı ve bu 3 yolağın aktivasyonunda PI3K/Akt yolağının aktif olduğu bildirilmiştir [358].

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması, primer hipokampal hücrelere hiperglisemik ortamda amiloid beta peptid uygulanması ile oluşturulan DM-AH modelinde artan nörotoksitenin, kannabinomimetiklerin antioksidan ve anti-inflamatuvar etkileri aracılığı ile azaltılabileceğini göstermiştir.

Çalışmamızda, DM-AH modelinde görülen kronik inflamasyon, oksidatif/nitrozatif stres, azalmış antioksidan kapasite ve nörotoksite *in vitro* koşullarda taklit edilmiştir. Bu şekilde AH'nın amiloidozis, oksidatif stres, nöroinflamasyon, glukoz hipometabolizması ve mitokondriyal disfonksiyon hipotezlerini eş zamanlı içeren yeni bir model oluşturulmuştur. Bu modeli destekleyen literatür verisi kısıtlı olmakla birlikte, gen ve protein düzeyinde yapacağımız ile çalışmalar modelimizin özgün değerini artıracak ve literatüre kazandırılmasını sağlayacaktır.

Bu çalışma ile, *in vitro* koşullarda oluşturulan DM-AH modelinde, endokannabinoid sisteminin redoks parametreleri module ederek inflamasyonun baskılanmasında kritik role sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, bu etkilerin doğrudan CREB-Nrf2-GSK β sinyal yolları üzerinden gerçekleştiği ve bu yolların DM-AH-Endokannabinoid sistem ilişkisinin açıklanabileceği sonucuna varılmıştır. CREB ve Nrf2'nin sonrası yolları değerlendirmek üzere yapılacak kromatin immunpresipitasyon (ChIP) deneyleri ve bu 3 yolağın ortak paylaştığı PI3K/Akt yolağı üzerine gidilmesi kannabinoid reseptörler aracılı nöroprotektif etkinin açıklanmasına olanak sağlayacaktır.

In vitro ve *in vivo* farklı deneysel Alzheimer modelleri oluşturularak yapılacak ileri çalışmalar ile kannabinoid sistem-nörodejeneratif hastalıklar arasındaki ilişki daha da açıklığa kavuşturulacaktır.

KAYNAKLAR

1. Kandimalla, R. Thirumala, V. ve Reddy, P.H. (2017). Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Diseases*, 1863, 1078-1089.
2. Dos Santos, P. Leide, C. Ozela, P.F. de Fatima de Brito Brito, M. Pinheiro, A.A. Padilha, E.C. Braga, F.S. Carlos, H. dos Santos, C.B.R. ve Rosa, J. (2018). Alzheimer's disease: a review from the pathophysiology to diagnosis, New perspectives for pharmacological treatment. *Current Medicinal Chemistry*, 25, 3141-3159.
3. Li, F. Chen, S. Wei, C. ve Jia, J. (2017). Monetary costs of Alzheimer's disease in China: protocol for a cluster-randomised observational study. *BioMed Central Neurology*, 17, 15.
4. Cantarero, D.P. (2017). Economic impact of cognitive impairment and dementia. *Revista Espanola de Geriatria Y Gerontologia*, 52, 58-60.
5. Ohyagi, Y. Miyoshi, K. ve Nakamura, N., (2019). Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease in the View of Diabetes Mellitus. *Diabetes Mellitus*. Springer, 227-248
6. Zhao, L. Dong, M. Wang, D. Ren, M. Zheng, Y. Zheng, H. Li, C. ve Gao, H. (2018). Characteristic metabolic alterations identified in primary neurons under high glucose exposure. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 207.
7. Wijesekara, N. Gonçalves, R.A. De Felice, F.G. ve Fraser, P.E. (2018). Impaired peripheral glucose homeostasis and Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 136, 172-181.
8. Sims-Robinson, C. Kim, B. Rosko, A. ve Feldman, E.L. (2010). How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology? *Nature Reviews Neurology*, 6, 551.
9. Uttara, B. Singh, A.V. Zamboni, P. ve Mahajan, R. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7, 65-74.
10. E Abdel Moneim, A. (2015). Oxidant/antioxidant imbalance and the risk of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 12, 335-349.
11. Rosales-Corral, S. Tan, D.-X. Manchester, L. ve Reiter, R.J. (2015). Diabetes and Alzheimer disease, two overlapping pathologies with the same background: oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.
12. Lourenco, M.V. Ferreira, S.T. ve De Felice, F.G. (2015). Neuronal stress signaling and eIF2 α phosphorylation as molecular links between Alzheimer's disease and diabetes. *Progress in Neurobiology*, 129, 37-57.
13. Toth, C., (2014). Diabetes and neurodegeneration in the brain. *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, 489-511

14. Salahuddin, P. Rabbani, G. ve Khan, R. (2014). The role of advanced glycation end products in various types of neurodegenerative disease: a therapeutic approach. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 19, 407-437.
15. Serratos, I.N. Castellanos, P. Pastor, N. Millan-Pacheco, C. Rembao, D. Perez-Montfort, R. Cabrera, N. Reyes-Espinosa, F. Diaz-Garrido, P. ve Lopez-Macay, A. (2015). Modeling the Interaction between quinolinate and the receptor for advanced glycation end products (RAGE): relevance for early neuropathological processes. *Public Library of Science One*, 10.
16. Sastre, M. Klockgether, T. ve Heneka, M.T. (2006). Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 24, 167-176.
17. Rangel-López, E. Colín-González, A. Paz-Loyola, A. Pinzón, E. Torres, I. Serratos, I. Castellanos, P. Wajner, M. Souza, D. ve Santamaría, A. (2015). Cannabinoid receptor agonists reduce the short-term mitochondrial dysfunction and oxidative stress linked to excitotoxicity in the rat brain. *Neuroscience*, 285, 97-106.
18. Ahmed, A. van der Marck, M. van den Elsen, G. ve Olde Rikkert, M. (2015). Cannabinoids in late-onset Alzheimer's disease. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 97, 597-606.
19. Bedse, G. Romano, A. Lavecchia, A.M. Cassano, T. ve Gaetani, S. (2015). The role of endocannabinoid signaling in the molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer Disease*, 43, 1115-1136.
20. Blennow, K. de Leon, M.J. ve Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *The Lancet*, 368, 387-403.
21. Nelson, P.T. Braak, H. ve Markesbery, W.R. (2009). Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 68, 1-14.
22. Brookmeyer, R. Gray, S. ve Kawas, C. (1998). Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *American Journal of Public Health*, 88, 1337-1342.
23. Kidd, M. (1963). Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature*, 197, 192-193.
24. Terry, R.D. (1963). The fine structure of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 22, 629-642.
25. Hardy, J. (2006). A hundred years of Alzheimer's disease research. *Neuron*, 52, 3-13.
26. Livingston, G. Sommerlad, A. Orgeta, V. Costafreda, S.G. Huntley, J. Ames, D. Ballard, C. Banerjee, S. Burns, A. Cohen-Mansfield, J. Cooper, C. Fox, N. Gitlin, L.N. Howard, R. Kales, H.C. Larson, E.B. Ritchie, K. Rockwood, K. Sampson, E.L. Samus, Q. Schneider, L.S. Selbæk, G. Teri, L. ve Mukadam, N. (2017). Dementia prevention, intervention, and care. *The Lancet*, 390, 2673-2734.

27. Freudenberg-Hua, Y. Li, W. ve Davies, P. (2018). The Role of Genetics in Advancing Precision Medicine for Alzheimer's Disease-A Narrative Review. *Frontiers Medicine (Lausanne)*, 5, 108.
28. Ertekin-Taner, N. (2007). Genetics of Alzheimer's disease: a centennial review. *Neurologic Clinics*, 25, 611-667, v.
29. Zhu, X.C. Tan, L. Wang, H.F. Jiang, T. Cao, L. Wang, C. Wang, J. Tan, C.C. Meng, X.F. ve Yu, J.T. (2015). Rate of early onset Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Translational Medicine*, 3, 38.
30. Ferri, C.P. Prince, M. Brayne, C. Brodaty, H. Fratiglioni, L. Ganguli, M. Hall, K. Hasegawa, K. Hendrie, H. Huang, Y. Jorm, A. Mathers, C. Menezes, P.R. Rimmer, E. ve Scazufca, M. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The Lancet*, 366, 2112-2117.
31. Alzheimer's Association, (2019). 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 321-387.
32. Van der Flier, W.M. Pijnenburg, Y.A.L. Fox, N.C. ve Scheltens, P. (2011). Early-onset versus late-onset Alzheimer's disease: the case of the missing APOE ϵ 4 allele. *The Lancet Neurology*, 10, 280-288.
33. Alzheimer's Association (2016). 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 12, 459-509.
34. Bateman, R.J. Xiong, C. Benzinger, T.L. Fagan, A.M. Goate, A. Fox, N.C. Marcus, D.S. Cairns, N.J. Xie, X. Blazey, T.M. Holtzman, D.M. Santacruz, A. Buckles, V. Oliver, A. Moulder, K. Aisen, P.S. Ghetti, B. Klunk, W.E. McDade, E. Martins, R.N. Masters, C.L. Mayeux, R. Ringman, J.M. Rossor, M.N. Schofield, P.R. Sperling, R.A. Salloway, S. Morris, J.C. ve Dominantly Inherited Alzheimer, N. (2012). Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 367, 795-804.
35. McKhann, G.M. Knopman, D.S. Chertkow, H. Hyman, B.T. Jack, C.R. Kawas, C.H. Klunk, W.E. Koroshetz, W.J. Manly, J.J. Mayeux, R. Mohs, R.C. Morris, J.C. Rossor, M.N. Scheltens, P. Carrillo, M.C. Thies, B. Weintraub, S. ve Phelps, C.H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 7, 263-269.
36. Tang-Wai, D.F. Graff-Radford, N.R. Boeve, B.F. Dickson, D.W. Parisi, J.E. Crook, R. Caselli, R.J. Knopman, D.S. ve Petersen, R.C. (2004). Clinical, genetic, and neuropathologic characteristics of posterior cortical atrophy. *Neurology*, 63, 1168-1174.
37. Ossenkoppele, R. Pijnenburg, Y.A.L. Perry, D.C. Cohn-Sheehy, B.I. Scheltens, N.M.E. Vogel, J.W. Kramer, J.H. Van Der Vlies, A.E. Joie, R.L. Rosen, H.J. Van Der Flier, W.M. Grinberg, L.T. Rozemuller, A.J. Huang, E.J. Van Berckel, B.N.M. Miller, B.L. Barkhof, F. Jagust, W.J. Scheltens, P. Seeley, W.W. ve Rabinovici, G.D. (2015). The behavioural/dysexecutive variant of Alzheimer's disease: clinical, neuroimaging and pathological features. *Brain*, 138, 2732-2749.

38. Gorno-Tempini, M.L. Brambati, S.M. Ginex, V. Ogar, J. Dronkers, N.F. Marcone, A. Perani, D. Garibotto, V. Cappa, S.F. ve Miller, B.L. (2008). The logopenic/phonological variant of primary progressive aphasia. *Neurology*, 71, 1227-1234.
39. Brier, M.R. Day, G.S. Snyder, A.Z. Tanenbaum, A.B. ve Ances, B.M. (2016). N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis mediates loss of intrinsic activity measured by functional MRI. *Journal of Neurology*, 263, 1083-1091.
40. Fagan, A.M. Mintun, M.A. Mach, R.H. Lee, S.-Y. Dence, C.S. Shah, A.R. LaRossa, G.N. Spinner, M.L. Klunk, W.E. Mathis, C.A. DeKosky, S.T. Morris, J.C. ve Holtzman, D.M. (2006). Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid A β 42 in humans. *Annals of Neurology*, 59, 512-519.
41. Fagan, A.M. Roe, C.M. Xiong, C. Mintun, M.A. Morris, J.C. ve Holtzman, D.M. (2007). Cerebrospinal Fluid tau/ β -Amyloid42 Ratio as a Prediction of Cognitive Decline in Nondemented Older Adults. *Archives of Neurology*, 64, 343-349.
42. Lowe, V.J. Lundt, E.S. Albertson, S.M. Przybelski, S.A. Senjem, M.L. Parisi, J.E. Kantarci, K. Boeve, B. Jones, D.T. Knopman, D. Jack, C.R. Dickson, D.W. Petersen, R.C. ve Murray, M.E. (2019). Neuroimaging correlates with neuropathologic schemes in neurodegenerative disease. *Alzheimer's & Dementia*, 15, 927-939.
43. Ovod, V. Ramsey, K.N. Mawuenyega, K.G. Bollinger, J.G. Hicks, T. Schneider, T. Sullivan, M. Paumier, K. Holtzman, D.M. Morris, J.C. Benzinger, T. Fagan, A.M. Patterson, B.W. ve Bateman, R.J. (2017). Amyloid beta concentrations and stable isotope labeling kinetics of human plasma specific to central nervous system amyloidosis. *Alzheimer's & Dementia*, 13, 841-849.
44. Palmqvist, S. Janelidze, S. Stomrud, E. Zetterberg, H. Karl, J. Zink, K. Bittner, T. Mattsson, N. Eichenlaub, U. Blennow, K. ve Hansson, O. (2019). Performance of Fully Automated Plasma Assays as Screening Tests for Alzheimer Disease-Related beta-Amyloid Status. *Journal of American Medical Association Neurology*, 76, 1060-1069.
45. Nakamura, A. Kaneko, N. Villemagne, V.L. Kato, T. Doecke, J. Dore, V. Fowler, C. Li, Q.X. Martins, R. Rowe, C. Tomita, T. Matsuzaki, K. Ishii, K. Ishii, K. Arahata, Y. Iwamoto, S. Ito, K. Tanaka, K. Masters, C.L. ve Yanagisawa, K. (2018). High performance plasma amyloid-beta biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*, 554, 249-254.
46. Vermunt, L. Sikkes, S.A.M. van den Hout, A. Handels, R. Bos, I. van der Flier, W.M. Kern, S. Ousset, P.J. Maruff, P. Skoog, I. Verhey, F.R.J. Freund-Levi, Y. Tsolaki, M. Wallin, A.K. Olde Rikkert, M. Soininen, H. Spuru, L. Zetterberg, H. Blennow, K. Scheltens, P. Muniz-Terrera, G. Visser, P.J. Alzheimer Disease Neuroimaging, I. Group, A.R. ve groups, I.D.s. (2019). Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. *Alzheimer's & Dementia*, 15, 888-898.

47. Fagan, A.M. Xiong, C. Jasielec, M.S. Bateman, R.J. Goate, A.M. Benzinger, T.L. Ghetti, B. Martins, R.N. Masters, C.L. Mayeux, R. Ringman, J.M. Rossor, M.N. Salloway, S. Schofield, P.R. Sperling, R.A. Marcus, D. Cairns, N.J. Buckles, V.D. Ladenson, J.H. Morris, J.C. Holtzman, D.M. ve Dominantly Inherited Alzheimer, N. (2014). Longitudinal change in CSF biomarkers in autosomal-dominant Alzheimer's disease. *Science Translational Medicine*, 6, 226ra230.
48. Gordon, B.A. Blazey, T. Su, Y. Fagan, A.M. Holtzman, D.M. Morris, J.C. ve Benzinger, T.L. (2016). Longitudinal beta-Amyloid Deposition and Hippocampal Volume in Preclinical Alzheimer Disease and Suspected Non-Alzheimer Disease Pathophysiology. *Journal of American Medical Association Neurology*, 73, 1192-1200.
49. Gordon, B.A. Blazey, T.M. Su, Y. Hari-Raj, A. Dincer, A. Flores, S. Christensen, J. McDade, E. Wang, G. Xiong, C. Cairns, N.J. Hassenstab, J. Marcus, D.S. Fagan, A.M. Jack, C.R., Jr. Hornbeck, R.C. Paumier, K.L. Ances, B.M. Berman, S.B. Brickman, A.M. Cash, D.M. Chhatwal, J.P. Correia, S. Forster, S. Fox, N.C. Graff-Radford, N.R. la Fougere, C. Levin, J. Masters, C.L. Rossor, M.N. Salloway, S. Saykin, A.J. Schofield, P.R. Thompson, P.M. Weiner, M.M. Holtzman, D.M. Raichle, M.E. Morris, J.C. Bateman, R.J. ve Benzinger, T.L.S. (2018). Spatial patterns of neuroimaging biomarker change in individuals from families with autosomal dominant Alzheimer's disease: a longitudinal study. *Lancet Neurology*, 17, 241-250.
50. Hanseeuw, B.J. Betensky, R.A. Jacobs, H.I.L. Schultz, A.P. Sepulcre, J. Becker, J.A. Cosio, D.M.O. Farrell, M. Quiroz, Y.T. Mormino, E.C. Buckley, R.F. Papp, K.V. Amariglio, R.A. Dewachter, I. Ivanoiu, A. Huijbers, W. Hedden, T. Marshall, G.A. Chhatwal, J.P. Rentz, D.M. Sperling, R.A. ve Johnson, K. (2019). Association of Amyloid and Tau With Cognition in Preclinical Alzheimer Disease: A Longitudinal Study. *Journal of American Medical Association Neurology*, 76, 915-924.
51. Jack, C.R., Jr. ve Holtzman, D.M. (2013). Biomarker modeling of Alzheimer's disease. *Neuron*, 80, 1347-1358.
52. Vos, S.J. Xiong, C. Visser, P.J. Jasielec, M.S. Hassenstab, J. Grant, E.A. Cairns, N.J. Morris, J.C. Holtzman, D.M. ve Fagan, A.M. (2013). Preclinical Alzheimer's disease and its outcome: a longitudinal cohort study. *Lancet Neurology*, 12, 957-965.
53. Morris, J.C. Roe, C.M. Grant, E.A. Head, D. Storandt, M. Goate, A.M. Fagan, A.M. Holtzman, D.M. ve Mintun, M.A. (2009). Pittsburgh compound B imaging and prediction of progression from cognitive normality to symptomatic Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 66, 1469-1475.

54. Bridel, C. van Wieringen, W.N. Zetterberg, H. Tijms, B.M. Teunissen, C.E. and the, N.F.L.G. Alvarez-Cermenó, J.C. Andreasson, U. Axelsson, M. Backstrom, D.C. Bartos, A. Bjerke, M. Blennow, K. Boxer, A. Brundin, L. Burman, J. Christensen, T. Fialova, L. Forsgren, L. Frederiksen, J.L. Gisslen, M. Gray, E. Gunnarsson, M. Hall, S. Hansson, O. Herbert, M.K. Jakobsson, J. Jessen-Krut, J. Janelidze, S. Johannsson, G. Jonsson, M. Kappos, L. Khademi, M. Khalil, M. Kuhle, J. Landen, M. Leinonen, V. Logroscino, G. Lu, C.H. Lycke, J. Magdalino, N.K. Malaspina, A. Mattsson, N. Meeter, L.H. Mehta, S.R. Modvig, S. Olsson, T. Paterson, R.W. Perez-Santiago, J. Piehl, F. Pijnenburg, Y.A.L. Pyykko, O.T. Ragnarsson, O. Rojas, J.C. Romme Christensen, J. Sandberg, L. Scherling, C.S. Schott, J.M. Sellebjerg, F.T. Simone, I.L. Skillback, T. Stilund, M. Sundstrom, P. Svenningsson, A. Tortelli, R. Tortorella, C. Trentini, A. Troiano, M. Turner, M.R. van Swieten, J.C. Vagberg, M. Verbeek, M.M. Villar, L.M. Visser, P.J. Wallin, A. Weiss, A. Wikkelsø, C. ve Wild, E.J. (2019). Diagnostic Value of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Protein in Neurology: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of American Medical Association Neurology*, 76, 1035-1048.
55. Mielke, M.M. Syrjanen, J.A. Blennow, K. Zetterberg, H. Vemuri, P. Skoog, I. Machulda, M.M. Kremers, W.K. Knopman, D.S. Jack, C., Jr. Petersen, R.C. ve Kern, S. (2019). Plasma and CSF neurofilament light: Relation to longitudinal neuroimaging and cognitive measures. *Neurology*, 93, e252-e260.
56. Mattsson, N. Cullen, N.C. Andreasson, U. Zetterberg, H. ve Blennow, K. (2019). Association Between Longitudinal Plasma Neurofilament Light and Neurodegeneration in Patients With Alzheimer Disease. *Journal of American Medical Association Neurology*, 76, 791-799.
57. Preische, O. Schultz, S.A. Apel, A. Kuhle, J. Kaeser, S.A. Barro, C. Graber, S. Kuder-Bulletta, E. LaFougere, C. Laske, C. Voglein, J. Levin, J. Masters, C.L. Martins, R. Schofield, P.R. Rossor, M.N. Graff-Radford, N.R. Salloway, S. Ghetti, B. Ringman, J.M. Noble, J.M. Chhatwal, J. Goate, A.M. Benzinger, T.L.S. Morris, J.C. Bateman, R.J. Wang, G. Fagan, A.M. McDade, E.M. Gordon, B.A. Jucker, M. ve Dominantly Inherited Alzheimer, N. (2019). Serum neurofilament dynamics predicts neurodegeneration and clinical progression in presymptomatic Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 25, 277-283.
58. Francis, P.T. (2005). The interplay of neurotransmitters in Alzheimer's disease. *Central Nervous System Spectrum*, 10, 6-9.
59. Davies, P. ve Maloney, A.J. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, 2, 1403.
60. Fotiou, D. Kaltsatou, A. Tsiptios, D. ve Nakou, M. (2015). Evaluation of the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease with neuropsychological methods. *Aging Clinical And Experimental Research*, 27, 727-733.
61. Ferreira-Vieira, T.H. Guimaraes, I.M. Silva, F.R. ve Ribeiro, F.M. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropsychopharmacology*, 14, 101-115.

62. Inglis, F. (2002). The tolerability and safety of cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia. *International Journal Of Clinical Practice. Supplement*, 45-63.
63. Onor, M.L. Trevisiol, M. ve Aguglia, E. (2007). Rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease: an update. *Clinical Interventions In Aging*, 2, 17-32.
64. Fraser, M.D. Davies, J.R. ve Chang, X. (2017). New Gold in Them Thar Hills: Testing a Novel Supply Route for Plant-Derived Galanthamine. *Journal of Alzheimer Disease*, 55, 1321-1325.
65. de Souza, F.M. Busquet, N. Blatner, M. Maclean, K.N. ve Restrepo, D. (2011). Galantamine improves olfactory learning in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Scientific Reports*, 1, 137.
66. Selkoe, D.J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, 6, 487-498.
67. Liu, P.P. Xie, Y. Meng, X.Y. ve Kang, J.S. (2019). History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4, 29.
68. Patterson, C. Feightner, J.W. Garcia, A. Hsiung, G.-Y.R. MacKnight, C. ve Sadvnick, A.D. (2008). Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease. *Canadian Medical Association Journal*, 178, 548-556.
69. Wei, W. Nguyen, L.N. Kessels, H.W. Hagiwara, H. Sisodia, S. ve Malinow, R. (2010). Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity. *Nature Neuroscience*, 13, 190-196.
70. Verges, D.K. Restivo, J.L. Goebel, W.D. Holtzman, D.M. ve Cirrito, J.R. (2011). Opposing synaptic regulation of amyloid-beta metabolism by NMDA receptors in vivo. *The Journal Of Neuroscience : The Official Journal of The Society for Neuroscience*, 31, 11328-11337.
71. Gremer, L. Scholzel, D. Schenk, C. Reinartz, E. Labahn, J. Ravelli, R.B.G. Tusche, M. Lopez-Iglesias, C. Hoyer, W. Heise, H. Willbold, D. ve Schroder, G.F. (2017). Fibril structure of amyloid-beta(1-42) by cryo-electron microscopy. *Science*, 358, 116-119.
72. Masters, C.L. ve Selkoe, D.J. (2012). Biochemistry of amyloid beta-protein and amyloid deposits in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbour Perspectives in Medicine*, 2, a006262.
73. Sosna, J. Philipp, S. Albay, R., 3rd Reyes-Ruiz, J.M. Baglietto-Vargas, D. LaFerla, F.M. ve Glabe, C.G. (2018). Early long-term administration of the CSF1R inhibitor PLX3397 ablates microglia and reduces accumulation of intraneuronal amyloid, neuritic plaque deposition and pre-fibrillar oligomers in 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 13, 11.
74. Tcw, J. ve Goate, A.M. (2017). Genetics of beta-Amyloid Precursor Protein in Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harbour Perspectives in Medicine*, 7.

75. Verghese, P.B. Castellano, J.M. Garai, K. Wang, Y. Jiang, H. Shah, A. Bu, G. Frieden, C. ve Holtzman, D.M. (2013). ApoE influences amyloid-beta (A β) clearance despite minimal apoE/A β association in physiological conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, 110, E1807-1816.
76. Castellano, J.M. Kim, J. Stewart, F.R. Jiang, H. DeMattos, R.B. Patterson, B.W. Fagan, A.M. Morris, J.C. Mawuenyega, K.G. Cruchaga, C. Goate, A.M. Bales, K.R. Paul, S.M. Bateman, R.J. ve Holtzman, D.M. (2011). Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-beta peptide clearance. *Science Translational Medicine*, 3, 89ra57.
77. Nelson, P.T. Alafuzoff, I. Bigio, E.H. Bouras, C. Braak, H. Cairns, N.J. Castellani, R.J. Crain, B.J. Davies, P. Del Tredici, K. Duyckaerts, C. Frosch, M.P. Haroutunian, V. Hof, P.R. Hulette, C.M. Hyman, B.T. Iwatsubo, T. Jellinger, K.A. Jicha, G.A. Kovari, E. Kukull, W.A. Leverenz, J.B. Love, S. Mackenzie, I.R. Mann, D.M. Masliah, E. McKee, A.C. Montine, T.J. Morris, J.C. Schneider, J.A. Sonnen, J.A. Thal, D.R. Trojanowski, J.Q. Troncoso, J.C. Wisniewski, T. Woltjer, R.L. ve Beach, T.G. (2012). Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *Journal Of Neuropathology And Experimental Neurology*, 71, 362-381.
78. Altmann, A. Ng, B. Landau, S.M. Jagust, W.J. Greicius, M.D. ve Alzheimer's Disease Neuroimaging, I. (2015). Regional brain hypometabolism is unrelated to regional amyloid plaque burden. *Brain*, 138, 3734-3746.
79. Edison, P. Archer, H.A. Hinz, R. Hammers, A. Pavese, N. Tai, Y.F. Hotton, G. Cutler, D. Fox, N. Kennedy, A. Rossor, M. ve Brooks, D.J. (2007). Amyloid, hypometabolism, and cognition in Alzheimer disease: an [11C]PIB and [18F]FDG PET study. *Neurology*, 68, 501-508.
80. Pascoal, T.A. Mathotaarachchi, S. Kang, M.S. Mohaddes, S. Shin, M. Park, A.Y. Parent, M.J. Benedet, A.L. Chamoun, M. Therriault, J. Hwang, H. Cuellar, A.C. Misic, B. Soucy, J.P. Aston, J.A.D. Gauthier, S. ve Rosa-Neto, P. (2019). A β -induced vulnerability propagates via the brain's default mode network. *Nature Communications*, 10, 2353.
81. De Strooper, B. ve Karran, E. (2016). The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell*, 164, 603-615.
82. Cassidy, L. Fernandez, F. Johnson, J.B. Naiker, M. Owoola, A.G. ve Broszczak, D.A. (2020). Oxidative stress in alzheimer's disease: A review on emergent natural polyphenolic therapeutics. *Complementary Therapies in Medicine*, 49, 102294.
83. Hoover, B.R. Reed, M.N. Su, J. Penrod, R.D. Kotilinek, L.A. Grant, M.K. Pitstick, R. Carlson, G.A. Lanier, L.M. Yuan, L.L. Ashe, K.H. ve Liao, D. (2010). Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron*, 68, 1067-1081.
84. Guo, T. Noble, W. ve Hanger, D.P. (2017). Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathologica*, 133, 665-704.

85. Mota, S.I. Ferreira, I.L. ve Rego, A.C. (2014). Dysfunctional synapse in Alzheimer's disease - A focus on NMDA receptors. *Neuropharmacology*, 76 Pt A, 16-26.
86. Traynelis, S.F. Wollmuth, L.P. McBain, C.J. Menniti, F.S. Vance, K.M. Ogden, K.K. Hansen, K.B. Yuan, H. Myers, S.J. ve Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews*, 62, 405-496.
87. Wang, R. ve Reddy, P.H. (2017). Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer Disease*, 57, 1041-1048.
88. Paoletti, P. Bellone, C. ve Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14, 383-400.
89. Kodis, E.J. Choi, S. Swanson, E. Ferreira, G. ve Bloom, G.S. (2018). N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium influx connects amyloid-beta oligomers to ectopic neuronal cell cycle reentry in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 14, 1302-1312.
90. Yudowski, G.A. Olsen, O. Adesnik, H. Marek, K.W. ve Bredt, D.S. (2013). Acute inactivation of PSD-95 destabilizes AMPA receptors at hippocampal synapses. *Public Library Of Science One*, 8.
91. Zhang, J. Petit, C.M. King, D.S. ve Lee, A.L. (2011). Phosphorylation of a PDZ domain extension modulates binding affinity and interdomain interactions in postsynaptic density-95 (PSD-95) protein, a membrane-associated guanylate kinase (MAGUK). *Journal of Biological Chemistry*, 286, 41776-41785.
92. Overk, C.R. ve Masliah, E. (2014). Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease. *Biochemical Pharmacology*, 88, 508-516.
93. Stepanichev, M.Y. Onufriev, M.V. Yakovlev, A.A. Khrenov, A.I. Peregud, D.I. Vorontsova, O.N. Lazareva, N.A. ve Gulyaeva, N.V. (2008). Amyloid- β (25–35) increases activity of neuronal NO-synthase in rat brain. *Neurochemistry International*, 52, 1114-1124.
94. Brown, G.C. (2010). Nitric oxide and neuronal death. *Nitric oxide*, 23, 153-165.
95. Uehara, T. Nakamura, T. Yao, D. Shi, Z.-Q. Gu, Z. Ma, Y. Masliah, E. Nomura, Y. ve Lipton, S.A. (2006). S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature*, 441, 513-517.
96. Brito, M.A. Vaz, A.R. Silva, S.L. Falcão, A.S. Fernandes, A. Silva, R.F. ve Brites, D. (2010). N-methyl-D-aspartate receptor and neuronal nitric oxide synthase activation mediate bilirubin-induced neurotoxicity. *Molecular Medicine*, 16, 372-380.
97. Trippier, P.C. Jansen Labby, K. Hawker, D.D. Mataka, J.J. ve Silverman, R.B. (2013). Target-and mechanism-based therapeutics for neurodegenerative diseases: strength in numbers. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56, 3121-3147.

98. Shipton, O.A. ve Paulsen, O. (2014). GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369, 20130163.
99. Gong, Y. ve Lippa, C.F. (2010). Disruption of the postsynaptic density in Alzheimer's disease and other neurodegenerative dementias. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias®*, 25, 547-555.
100. Ittner, L.M. Ke, Y.D. Delerue, F. Bi, M. Gladbach, A. van Eersel, J. Wölfling, H. Chieng, B.C. Christie, M.J. ve Napier, I.A. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid- β toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*, 142, 387-397.
101. Koffie, R.M. Meyer-Luehmann, M. Hashimoto, T. Adams, K.W. Mielke, M.L. Garcia-Alloza, M. Micheva, K.D. Smith, S.J. Kim, M.L. ve Lee, V.M. (2009). Oligomeric amyloid β associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 4012-4017.
102. Paramanik, V. ve Thakur, M.K. (2013). Role of CREB signaling in aging brain. *Archives Italiennes De Biologie*, 151, 33-42.
103. Sultana, R. Banks, W.A. ve Butterfield, D.A. (2010). Decreased levels of PSD95 and two associated proteins and increased levels of Bcl2 and caspase 3 in hippocampus from subjects with amnesic mild cognitive impairment: insights into their potential roles for loss of synapses and memory, accumulation of A β , and neurodegeneration in a prodromal stage of Alzheimer's disease. *Journal Of Neuroscience Research*, 88, 469-477.
104. Stern, S.A. ve Alberini, C.M. (2013). Mechanisms of memory enhancement. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 5, 37-53.
105. Chen, Y. Huang, X. Zhang, Y.-w. Rockenstein, E. Bu, G. Golde, T.E. Masliah, E. ve Xu, H. (2012). Alzheimer's β -secretase (BACE1) regulates the cAMP/PKA/CREB pathway independently of β -amyloid. *Journal of Neuroscience*, 32, 11390-11395.
106. Miyamoto, E. (2006). Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *Journal Of Pharmacological Sciences*, 100, 433-442.
107. Zlokovic, B.V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57, 178-201.
108. Moskowitz, M.A. Lo, E.H. ve Iadecola, C. (2010). The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron*, 67, 181-198.
109. Guo, S. ve Lo, E.H. (2009). Dysfunctional cell-cell signaling in the neurovascular unit as a paradigm for central nervous system disease. *Stroke*, 40, S4-S7.
110. Iadecola, C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 5, 347-360.

111. Buée, L. Hof, P. Bouras, C. Delacourte, A. Perl, D. Morrison, J. ve Fillit, H. (1994). Pathological alterations of the cerebral microvasculature in Alzheimer's disease and related dementing disorders. *Acta Neuropathologica*, 87, 469-480.
112. Ruitenbergh, A. den Heijer, T. Bakker, S.L. van Swieten, J.C. Koudstaal, P.J. Hofman, A. ve Breteler, M.M. (2005). Cerebral hypoperfusion and clinical onset of dementia: the Rotterdam Study. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 57, 789-794.
113. Knopman, D.S. ve Roberts, R. (2010). Vascular risk factors: imaging and neuropathologic correlates. *Journal of Alzheimer's disease*, 20, 699-709.
114. Zlokovic, B.V. (2005). Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci*, 28, 202-208.
115. Latta, C.H. Brothers, H.M. ve Wilcock, D.M. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease; A source of heterogeneity and target for personalized therapy. *Neuroscience*, 302, 103-111.
116. Phillips, E.C. Croft, C.L. Kurbatskaya, K. O'Neill, M.J. Hutton, M.L. Hanger, D.P. Garwood, C.J. ve Noble, W., (2014). Astrocytes and neuroinflammation in Alzheimer's disease, Portland Press Ltd.
117. Bagyinszky, E. Giau, V.V. Shim, K. Suk, K. An, S.S.A. ve Kim, S. (2017). Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 376, 242-254.
118. McGeer, E.G. ve McGeer, P.L. (2010). Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy. *Journal of Alzheimer Disease*, 19, 355-361.
119. Efthymiou, A.G. ve Goate, A.M. (2017). Late onset Alzheimer's disease genetics implicates microglial pathways in disease risk. *Molecular Neurodegeneration*, 12, 43.
120. Karch, C.M. ve Goate, A.M. (2015). Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biological Psychiatry*, 77, 43-51.
121. Gratuze, M. Leyns, C.E.G. ve Holtzman, D.M. (2018). New insights into the role of TREM2 in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 13, 66.
122. Shi, Y. ve Holtzman, D.M. (2018). Interplay between innate immunity and Alzheimer disease: APOE and TREM2 in the spotlight. *Nature Reviews Immunology*, 18, 759-772.
123. Halle, A. Hornung, V. Petzold, G.C. Stewart, C.R. Monks, B.G. Reinheckel, T. Fitzgerald, K.A. Latz, E. Moore, K.J. ve Golenbock, D.T. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nature Immunology*, 9, 857-865.

124. Heneka, M.T. Kummer, M.P. Stutz, A. Delekate, A. Schwartz, S. Vieira-Saecker, A. Griep, A. Axt, D. Remus, A. Tzeng, T.C. Gelpi, E. Halle, A. Korte, M. Latz, E. ve Golenbock, D.T. (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*, 493, 674-678.
125. Venegas, C. Kumar, S. Franklin, B.S. Dierkes, T. Brinkschulte, R. Tejera, D. Vieira-Saecker, A. Schwartz, S. Santarelli, F. Kummer, M.P. Griep, A. Gelpi, E. Beilharz, M. Riedel, D. Golenbock, D.T. Geyer, M. Walter, J. Latz, E. ve Heneka, M.T. (2017). Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nature*, 552, 355-361.
126. Sayed, F.A. Telpoukhovskaia, M. Kodama, L. Li, Y. Zhou, Y. Le, D. Hauduc, A. Ludwig, C. Gao, F. Clelland, C. Zhan, L. Cooper, Y.A. Davalos, D. Akassoglou, K. Coppola, G. ve Gan, L. (2018). Differential effects of partial and complete loss of TREM2 on microglial injury response and tauopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, 115, 10172-10177.
127. Leyns, C.E.G. Ulrich, J.D. Finn, M.B. Stewart, F.R. Koscal, L.J. Remolina Serrano, J. Robinson, G.O. Anderson, E. Colonna, M. ve Holtzman, D.M. (2017). TREM2 deficiency attenuates neuroinflammation and protects against neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, 114, 11524-11529.
128. Michaud, M. Balardy, L. Moulis, G. Gaudin, C. Peyrot, C. Vellas, B. Cesari, M. ve Nourhashemi, F. (2013). Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. *Journal of the American Medical Directors Association*, 14, 877-882.
129. Abdel-Haq, R. Schlachetzki, J.C.M. Glass, C.K. ve Mazmanian, S.K. (2019). Microbiome-microglia connections via the gut-brain axis. *Journal of Experimental Medicine*, 216, 41-59.
130. Saji, N. Niida, S. Murotani, K. Hisada, T. Tsuduki, T. Sugimoto, T. Kimura, A. Toba, K. ve Sakurai, T. (2019). Analysis of the relationship between the gut microbiome and dementia: a cross-sectional study conducted in Japan. *Scientific Reports*, 9, 1-9.
131. Vogt, N.M. Kerby, R.L. Dill-McFarland, K.A. Harding, S.J. Merluzzi, A.P. Johnson, S.C. Carlsson, C.M. Asthana, S. Zetterberg, H. Blennow, K. Bendlin, B.B. ve Rey, F.E. (2017). Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 7, 13537.
132. Bauerl, C. Collado, M.C. Diaz Cuevas, A. Vina, J. ve Perez Martinez, G. (2018). Shifts in gut microbiota composition in an APP/PSS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease during lifespan. *Letters In Applied Microbiology*, 66, 464-471.

133. Minter, M.R. Zhang, C. Leone, V. Ringus, D.L. Zhang, X. Oyler-Castrillo, P. Musch, M.W. Liao, F. Ward, J.F. Holtzman, D.M. Chang, E.B. Tanzi, R.E. ve Sisodia, S.S. (2016). Antibiotic-induced perturbations in gut microbial diversity influences neuro-inflammation and amyloidosis in a murine model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 6, 30028.
134. Chen, X. Guo, C. ve Kong, J. (2012). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*, 7, 376-385.
135. Gella, A. ve Durany, N. (2009). Oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Adhesion & Migration*, 3, 88-93.
136. Hawking, Z.L. (2016). Alzheimer's disease: the role of mitochondrial dysfunction and potential new therapies. *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research*, 9.
137. Di Meo, S. Reed, T.T. Venditti, P. ve Victor, V.M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1245049.
138. Ray, P.D. Huang, B.W. ve Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24, 981-990.
139. Holmstrom, K.M. ve Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15, 411-421.
140. Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417, 1-13.
141. Reddy, P.H. (2006). Amyloid precursor protein-mediated free radicals and oxidative damage: implications for the development and progression of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 96, 1-13.
142. Mutisya, E.M. Bowling, A.C. ve Beal, M.F. (1994). Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 63, 2179-2184.
143. Picone, P. Nuzzo, D. Caruana, L. Scafidi, V. ve Di Carlo, M. (2014). Mitochondrial dysfunction: different routes to Alzheimer's disease therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 780179.
144. Islam, B.U. Jabir, N.R. ve Tabrez, S. (2019). The role of mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of Drug Targeting*, 27, 932-942.
145. Sheng, Z.H. ve Cai, Q. (2012). Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, 13, 77-93.
146. Sery, O. Povova, J. Misek, I. Pesak, L. ve Janout, V. (2013). Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia Neuropathologica*, 51, 1-9.
147. Mark, R.J. Lovell, M.A. Markesbery, W.R. Uchida, K. ve Mattson, M.P. (1997). A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid beta-peptide. *Journal of Neurochemistry*, 68, 255-264.

148. Bradley-Whitman, M.A. ve Lovell, M.A. (2015). Biomarkers of lipid peroxidation in Alzheimer disease (AD): an update. *Archives of Toxicology*, 89, 1035-1044.
149. Mattson, M.P. ve Chan, S.L. (2003). Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium*, 34, 385-397.
150. Tamagno, E. Robino, G. Obbili, A. Bardini, P. Aragno, M. Parola, M. ve Danni, O. (2003). H₂O₂ and 4-hydroxynonenal mediate amyloid beta-induced neuronal apoptosis by activating JNKs and p38MAPK. *Experimental Neurology*, 180, 144-155.
151. Gabbita, S.P. Lovell, M.A. ve Markesbery, W.R. (1998). Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 71, 2034-2040.
152. Sayre, L.M. Zelasko, D.A. Harris, P.L. Perry, G. Salomon, R.G. ve Smith, M.A. (1997). 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 68, 2092-2097.
153. Mecocci, P. MacGarvey, U. ve Beal, M.F. (1994). Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 36, 747-751.
154. Rigotto, G. ve Basso, E. (2019). Mitochondrial Dysfunctions: A Thread Sewing Together Alzheimer's Disease, Diabetes, and Obesity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1-16.
155. La Joie, R. Perrotin, A. Barré, L. Hommet, C. Mézenge, F. Ibazizene, M. Camus, V. Abbas, A. Landeau, B. Guilloteau, D. de La Sayette, V. Eustache, F. Desgranges, B. ve Chételat, G. (2012). Region-specific hierarchy between atrophy, hypometabolism, and β -amyloid (A β) load in Alzheimer's disease dementia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32, 16265-16273.
156. Acosta-Cabronero, J. Patterson, K. Fryer, T.D. Hodges, J.R. Pengas, G. Williams, G.B. ve Nestor, P.J. (2011). Atrophy, hypometabolism and white matter abnormalities in semantic dementia tell a coherent story. *Brain : A Journal Of Neurology*, 134, 2025-2035.
157. Liu, Z.-D. Zhang, S. Hao, J.-J. Xie, T.-R. ve Kang, J.-S. (2016). Cellular model of neuronal atrophy induced by DYNC111 deficiency reveals protective roles of RAS-RAF-MEK signaling. *Protein & Cell*, 7, 638-650.
158. Nasrallah, I. ve Dubroff, J. (2013). An Overview of PET Neuroimaging. *Seminars in Nuclear Medicine*, 43, 449-461.
159. Cisneros-Mejorado, A. Pérez-Samartín, A. Gottlieb, M. ve Matute, C. (2015). ATP signaling in brain: release, excitotoxicity and potential therapeutic targets. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35, 1-6.
160. Arnold, S.E. Arvanitakis, Z. Macauley-Rambach, S.L. Koenig, A.M. Wang, H.-Y. Ahima, R.S. Craft, S. Gandy, S. Buettner, C. Stoeckel, L.E. Holtzman, D.M. ve Nathan, D.M. (2018). Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. *Nature Reviews. Neurology*, 14, 168-181.

161. Costantini, L.C. Barr, L.J. Vogel, J.L. ve Henderson, S.T. (2008). Hypometabolism as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *BioMed Central Neuroscience*, 9 Suppl 2, S16-S16.
162. Neth, B.J. ve Craft, S. (2017). Insulin resistance and Alzheimer's disease: bioenergetic linkages. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 345.
163. Croteau, E. Castellano, C. Fortier, M. Bocti, C. Fulop, T. Paquet, N. ve Cunnane, S. (2018). A cross-sectional comparison of brain glucose and ketone metabolism in cognitively healthy older adults, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology*, 107, 18-26.
164. Weise, C.M. Chen, K. Chen, Y. Kuang, X. Savage, C.R. Reiman, E.M. ve Initiative, A.s.D.N. (2018). Left lateralized cerebral glucose metabolism declines in amyloid- β positive persons with mild cognitive impairment. *NeuroImage: Clinical*, 20, 286-296.
165. de Leon, M.J. Ferris, S.H. George, A.E. Christman, D.R. Fowler, J.S. Gentes, C. Reisberg, B. Gee, B. Emmerich, M. Yonekura, Y. Brodie, J. Kricheff, I.I. ve Wolf, A.P. (1983). Positron emission tomographic studies of aging and Alzheimer disease. *AJNR. American Journal Of Neuroradiology*, 4, 568-571.
166. Szablewski, L. (2017). Glucose transporters in brain: in health and in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*, 55, 1307-1320.
167. Di Domenico, F. Barone, E. Perluigi, M. ve Butterfield, D.A. (2017). The triangle of death in Alzheimer's disease brain: the aberrant cross-talk among energy metabolism, mammalian target of rapamycin signaling, and protein homeostasis revealed by redox proteomics. *Antioxidants & Redox Signaling*, 26, 364-387.
168. Cheignon, C. Tomas, M. Bonnefont-Rousselot, D. Faller, P. Hureau, C. ve Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology*, 14, 450-464.
169. Barnham, K.J. McKinstry, W.J. Multhaup, G. Galatis, D. Morton, C.J. Curtain, C.C. Williamson, N.A. White, A.R. Hinds, M.G. Norton, R.S. Beyreuther, K. Masters, C.L. Parker, M.W. ve Cappai, R. (2003). Structure of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein copper binding domain. A regulator of neuronal copper homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 17401-17407.
170. Atwood, C.S. Obrenovich, M.E. Liu, T. Chan, H. Perry, G. Smith, M.A. ve Martins, R.N. (2003). Amyloid-beta: a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid-beta. *Brain Research Reviews*, 43, 1-16.
171. Cristovao, J.S. Santos, R. ve Gomes, C.M. (2016). Metals and Neuronal Metal Binding Proteins Implicated in Alzheimer's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 9812178.
172. Tammela, T. Petrova, T.V. ve Alitalo, K. (2005). Molecular lymphangiogenesis: new players. *Trends in Cell Biology*, 15, 434-441.
173. Alitalo, K. Tammela, T. ve Petrova, T.V. (2005). Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*, 438, 946-953.

174. Aspelund, A. Antila, S. Proulx, S.T. Karlsen, T.V. Karaman, S. Detmar, M. Wiig, H. ve Alitalo, K. (2015). A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *Journal of Experimental Medicine*, 212, 991-999.
175. Sweeney, M.D. Sagare, A.P. ve Zlokovic, B.V. (2018). Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nature Reviews. Neurology*, 14, 133-150.
176. Zhao, Z. Sagare, A.P. Ma, Q. Halliday, M.R. Kong, P. Kisler, K. Winkler, E.A. Ramanathan, A. Kanekiyo, T. Bu, G. Owens, N.C. Rege, S.V. Si, G. Ahuja, A. Zhu, D. Miller, C.A. Schneider, J.A. Maeda, M. Maeda, T. Sugawara, T. Ichida, J.K. ve Zlokovic, B.V. (2015). Central role for PICALM in amyloid-beta blood-brain barrier transcytosis and clearance. *Nature Neuroscience*, 18, 978-987.
177. Yang, L. Kress, B.T. Weber, H.J. Thiagarajan, M. Wang, B. Deane, R. Benveniste, H. Iliff, J.J. ve Nedergaard, M. (2013). Evaluating glymphatic pathway function utilizing clinically relevant intrathecal infusion of CSF tracer. *Journal of Translational Medicine*, 11, 107.
178. Thrane, A.S. Rangroo Thrane, V. ve Nedergaard, M. (2014). Drowning stars: reassessing the role of astrocytes in brain edema. *Trends Neurosci*, 37, 620-628.
179. Iliff, J.J. ve Nedergaard, M. (2013). Is there a cerebral lymphatic system? *Stroke*, 44, S93-S95.
180. Iliff, J.J. Wang, M. Liao, Y. Plogg, B.A. Peng, W. Gundersen, G.A. Benveniste, H. Vates, G.E. Deane, R. ve Goldman, S.A. (2012). A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Science Translational Medicine*, 4, 147ra111-147ra111.
181. Mestre, H. Hablitz, L.M. Xavier, A.L. Feng, W. Zou, W. Pu, T. Monai, H. Murlidharan, G. Castellanos Rivera, R.M. Simon, M.J. Pike, M.M. Pla, V. Du, T. Kress, B.T. Wang, X. Plog, B.A. Thrane, A.S. Lundgaard, I. Abe, Y. Yasui, M. Thomas, J.H. Xiao, M. Hirase, H. Asokan, A. Iliff, J.J. ve Nedergaard, M. (2018). Aquaporin-4-dependent glymphatic solute transport in the rodent brain. *Elife*, 7, e40070.
182. Long, J.M. ve Holtzman, D.M. (2019). Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*, 179, 312-339.
183. Vermunt, L. Sikkes, S.A. Van Den Hout, A. Handels, R. Bos, I. Van Der Flier, W.M. Kern, S. Ousset, P.J. Maruff, P. ve Skoog, I. (2019). Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. *Alzheimer's & Dementia*, 15, 888-898.
184. Birks, J.S. (2006). Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database: Systematic Reviews*, 1, CD005593.
185. Cummings, J.L. Morstorf, T. ve Zhong, K. (2014). Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimer's Research & Therapy*, 6, 37.

186. Anand, A. Patience, A.A. Sharma, N. ve Khurana, N. (2017). The present and future of pharmacotherapy of Alzheimer's disease: A comprehensive review. *European Journal Of Pharmacology*, 815, 364-375.
187. Becker, R.E. Greig, N.H. ve Giacobini, E. (2008). Why do so many drugs for Alzheimer's disease fail in development? Time for new methods and new practices? *Journal of Alzheimer's disease*, 15, 303-325.
188. Hardigan, T. Ward, R. ve Ergul, A. (2016). Cerebrovascular complications of diabetes: focus on cognitive dysfunction. *Clinical Science*, 130, 1807-1822.
189. Henning, R.J. (2018). Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Future Cardiology*, 14, 491-509.
190. Ben Nasr, M. D'Addio, F. Usuelli, V. Tezza, S. Abdi, R. ve Fiorina, P. (2015). The rise, fall, and resurgence of immunotherapy in type 1 diabetes. *Pharmacological Research*, 98, 31-38.
191. Bassi, R. ve Fiorina, P. (2011). Impact of Islet Transplantation on Diabetes Complications and Quality of Life. *Current Diabetes Reports*, 11, 355.
192. Arneth, B. Arneth, R. ve Shams, M. (2019). Metabolomics of Type 1 and Type 2 Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 2467.
193. Khan, R.M.M. Chua, Z.J.Y. Tan, J.C. Yang, Y. Liao, Z. ve Zhao, Y. (2019). From Pre-Diabetes to Diabetes: Diagnosis, Treatments and Translational Research. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 55, 546.
194. Duarte, J. Oses, J. Rodrigues, R. ve Cunha, R. (2007). Modification of purinergic signaling in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neuroscience*, 149, 382-391.
195. Ehehalt, S. Popovic, P. Muntoni, S. Muntoni, S. Willasch, A. Hub, R. Ranke, M.B. ve Neu, A. (2009). Incidence of diabetes mellitus among children of Italian migrants substantiates the role of genetic factors in the pathogenesis of type 1 diabetes. *European Journal Of Pediatrics*, 168, 613.
196. Kim, H.-G. (2019). Cognitive dysfunctions in individuals with diabetes mellitus. *Yeungnam University Journal Of Medicine*, 36, 183-191.
197. Yi, S.S. Hwang, I.K. Kim, D.W. Shin, J.H. Nam, S.M. Choi, J.H. Lee, C.H. Won, M.-H. Seong, J.K. ve Yoon, Y.S. (2011). The chronological characteristics of SOD1 activity and inflammatory response in the hippocampi of STZ-induced type 1 diabetic rats. *Neurochemical Research*, 36, 117-128.
198. Wang, S.-h. Sun, Z.-l. Guo, Y.-j. Yuan, Y. ve Yang, B.-q. (2009). Diabetes impairs hippocampal function via advanced glycation end product mediated new neuron generation in animals with diabetes-related depression. *Toxicological Sciences*, 111, 72-79.
199. Ye, L. Wang, F. ve Yang, R.-H. (2011). Diabetes impairs learning performance and affects the mitochondrial function of hippocampal pyramidal neurons. *Brain Research*, 1411, 57-64.

200. Reagan, L.P. Grillo, C.A. ve Piroli, G.G. (2008). The As and Ds of stress: metabolic, morphological and behavioral consequences. *European Journal of Pharmacology*, 585, 64-75.
201. Wessels, A.M. Scheltens, P. Barkhof, F. ve Heine, R.J. (2008). Hyperglycaemia as a determinant of cognitive decline in patients with type 1 diabetes. *European Journal of Pharmacology*, 585, 88-96.
202. Zhao, N. Liu, C.-C. Van Ingelgom, A.J. Martens, Y.A. Linares, C. Knight, J.A. Painter, M.M. Sullivan, P.M. ve Bu, G. (2017). Apolipoprotein E4 impairs neuronal insulin signaling by trapping insulin receptor in the endosomes. *Neuron*, 96, 115-129. e115.
203. Chuang, Y.F. An, Y. Bilgel, M. Wong, D.F. Troncoso, J.C. O'Brien, R.J. Breitner, J.C. Ferruci, L. Resnick, S.M. ve Thambisetty, M. (2016). Midlife adiposity predicts earlier onset of Alzheimer's dementia, neuropathology and presymptomatic cerebral amyloid accumulation. *Molecular Psychiatry*, 21, 910-915.
204. Ribe, E.M. ve Lovestone, S. (2016). Insulin signalling in Alzheimer's disease and diabetes: from epidemiology to molecular links. *Journal of Internal Medicine*, 280, 430-442.
205. Grillo, C.A. Piroli, G.G. Lawrence, R.C. Wrighten, S.A. Green, A.J. Wilson, S.P. Sakai, R.R. Kelly, S.J. Wilson, M.A. Mott, D.D. ve Reagan, L.P. (2015). Hippocampal Insulin Resistance Impairs Spatial Learning and Synaptic Plasticity. *Diabetes*, 64, 3927-3936.
206. Kang, S. Lee, Y.-h. ve Lee, J.E. (2017). Metabolism-Centric Overview of the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Yonsei Medical Journal*, 58, 479-488.
207. Ho, L. Qin, W. Pompl, P.N. Xiang, Z. Wang, J. Zhao, Z. Peng, Y. Cambareri, G. Rocher, A. ve Mobbs, C.V. (2004). Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 18, 902-904.
208. Formiga, F. ve Pérez-Maraver, M. (2014). Type 3 diabetes mellitus. The revival of inhaled insulin? *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*, 61, 173-175.
209. Pugazhenth, S. Qin, L. ve Reddy, P.H. (2017). Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863, 1037-1045.
210. Haque, R. ve Nazir, A. (2014). Insulin-degrading enzyme: a link between Alzheimer's and type 2 diabetes mellitus. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 13, 259-264.
211. Ettcheto, M. Cano, A. Busquets, O. Manzone, P.R. Sánchez-López, E. Castro-Torres, R.D. Beas-Zarate, C. Verdager, E. García, M.L. Olloquequi, J. Auladell, C. Folch, J. ve Camins, A. (2019). A metabolic perspective of late onset Alzheimer's disease. *Pharmacological Research*, 145, 104255-104255.

212. Ahmad, W. Ijaz, B. Shabbiri, K. Ahmed, F. ve Rehman, S. (2017). Oxidative toxicity in diabetes and Alzheimer's disease: mechanisms behind ROS/RNS generation. *Journal of Biomedical Science*, 24, 76.
213. Akter, K. Lanza, E.A. Martin, S.A. Myronyuk, N. Rua, M. ve Raffa, R.B. (2011). Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: shared pathology and treatment? *British Journal of Clinical Pharmacology*, 71, 365-376.
214. Kubis-Kubiak, A.M. Rorbach-Dolata, A. ve Piwowar, A. (2019). Crucial players in Alzheimer's disease and diabetes mellitus: Friends or foes? *Mechanisms Of Ageing And Development*, 181, 7-21.
215. Verdile, G. Keane, K.N. Cruzat, V.F. Medic, S. Sabale, M. Rowles, J. Wijesekara, N. Martins, R.N. Fraser, P.E. ve Newsholme, P. (2015). Inflammation and Oxidative Stress: The Molecular Connectivity between Insulin Resistance, Obesity, and Alzheimer's Disease. *Mediators of Inflammation*, 2015, 105828-105828.
216. Zuardi, A.W. (2006). History of cannabis as a medicine: a review. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 28, 153-157.
217. Maule, W. (2015). Medical uses of marijuana (*Cannabis sativa*): fact or fallacy? *British Journal of Biomedical Science*, 72, 85-91.
218. Brenneisen, R., (2007). Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other Cannabis constituents. (editörler). *Marijuana and the Cannabinoids*. Springer, 17-49
219. Di Marzo, V. ve Fontana, A. (1995). Anandamide, an endogenous cannabinomimetic eicosanoid: 'killing two birds with one stone'. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 53, 1-11.
220. Sugiura, T. Kondo, S. Sukagawa, A. Nakane, S. Shinoda, A. Itoh, K. Yamashita, A. ve Waku, K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 215, 89-97.
221. Devane, W.A. Hanus, L. Breuer, A. Pertwee, R.G. Stevenson, L.A. Griffin, G. Gibson, D. Mandelbaum, A. Etinger, A. ve Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258, 1946-1949.
222. Novotna, A. Mares, J. Ratcliffe, S. Novakova, I. Vachova, M. Zapletalova, O. Gasperini, C. Pozzilli, C. Cefaro, L. ve Comi, G. (2011). A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, enriched-design study of nabiximols* (Sativex®), as add-on therapy, in subjects with refractory spasticity caused by multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*, 18, 1122-1131.
223. Fraguas-Sanchez, A.I. ve Torres-Suarez, A.I. (2018). Medical Use of Cannabinoids. *Drugs*, 78, 1665-1703.
224. Oddi, S. Scipioni, L. ve Maccarrone, M. (2019). Endocannabinoid system and adult neurogenesis: a focused review. *Current Opinions in Pharmacology*, 50, 25-32.

225. Maccarrone, M. Guzman, M. Mackie, K. Doherty, P. ve Harkany, T. (2014). Programming of neural cells by (endo)cannabinoids: from physiological rules to emerging therapies. *Nature Reviews Neuroscience*, 15, 786-801.
226. Cristino, L. Bisogno, T. ve Di Marzo, V. (2020). Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nature reviews. Neurology*, 16, 9-29.
227. Simon, V. ve Cota, D. (2017). MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Endocannabinoids and metabolism: past, present and future. *European Journal of Endocrinology*, 176, R309-R324.
228. Henstridge, C.M. (2012). Off-target cannabinoid effects mediated by GPR55. *Pharmacology*, 89, 179-187.
229. Chen, D.J. Gao, M. Gao, F.F. Su, Q.X. ve Wu, J. (2017). Brain cannabinoid receptor 2: expression, function and modulation. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38, 312-316.
230. Bisogno, T. Oddi, S. Piccoli, A. Fazio, D. ve Maccarrone, M. (2016). Type-2 cannabinoid receptors in neurodegeneration. *Pharmacological Research*, 111, 721-730.
231. Chiurchiu, V. Battistini, L. ve Maccarrone, M. (2015). Endocannabinoid signalling in innate and adaptive immunity. *Immunology*, 144, 352-364.
232. Chevalleyre, V. Takahashi, K.A. ve Castillo, P.E. (2006). Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annual Review of Neuroscience*, 29, 37-76.
233. Galve-Roperh, I. Chiurchiù, V. Díaz-Alonso, J. Bari, M. Guzmán, M. ve Maccarrone, M. (2013). Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation. *Progress in Lipid Research*, 52, 633-650.
234. Chevalleyre, V. Takahashi, K.A. ve Castillo, P.E. (2006). Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annual Review of Neuroscience*, 29, 37-76.
235. Chen, D.-J. Gao, M. Gao, F.-F. Su, Q.-X. ve Wu, J. (2017). Brain cannabinoid receptor 2: expression, function and modulation. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38, 312-316.
236. Araque, A. Castillo, P.E. Manzoni, O.J. ve Tonini, R. (2017). Synaptic functions of endocannabinoid signaling in health and disease. *Neuropharmacology*, 124, 13-24.
237. Castillo, P.E. Younts, T.J. Chávez, A.E. ve Hashimoto-dani, Y. (2012). Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*, 76, 70-81.
238. Benarroch, E.E. (2014). Synaptic effects of cannabinoids: complexity, behavioral effects, and potential clinical implications. *Neurology*, 83, 1958-1967.
239. Mukhamedyarov, M.A. ve Zefirov, A.L. (2013). The influence of beta-amyloid peptide on the functions of excitable tissues: physiological and pathological aspects. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*, 44, 55-71.

240. Walsh, D.M. ve Selkoe, D.J. (2004). Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein and Peptide Letters*, 11, 213-228.
241. Klein, W.L. Krafft, G.A. ve Finch, C.E. (2001). Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends In Neurosciences*, 24, 219-224.
242. Klein, W.L. (2013). Synaptotoxic amyloid- β oligomers: a molecular basis for the cause, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease? *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 33 Suppl 1, S49-S65.
243. Steardo, L., Jr. Bronzuoli, M.R. Iacomino, A. Esposito, G. Steardo, L. ve Scuderi, C. (2015). Does neuroinflammation turn on the flame in Alzheimer's disease? Focus on astrocytes. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 259-259.
244. Walsh, D.M. ve Selkoe, D.J. (2004). Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron*, 44, 181-193.
245. Munoz, L. ve Ammit, A.J. (2010). Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 58, 561-568.
246. Katsumoto, A. Takeuchi, H. Takahashi, K. ve Tanaka, F. (2018). Microglia in Alzheimer's Disease: Risk Factors and Inflammation. *Frontiers in Neurology*, 9, 978-978.
247. Yanuck, S.F. (2019). Microglial Phagocytosis of Neurons: Diminishing Neuronal Loss in Traumatic, Infectious, Inflammatory, and Autoimmune CNS Disorders. *Frontiers in Psychiatry*, 10, 712-712.
248. Combs, C.K. Johnson, D.E. Cannady, S.B. Lehman, T.M. ve Landreth, G.E. (1999). Identification of microglial signal transduction pathways mediating a neurotoxic response to amyloidogenic fragments of beta-amyloid and prion proteins. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19, 928-939.
249. Caldeira, C. Cunha, C. Vaz, A.R. Falcão, A.S. Barateiro, A. Seixas, E. Fernandes, A. ve Brites, D. (2017). Key Aging-Associated Alterations in Primary Microglia Response to Beta-Amyloid Stimulation. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9.
250. Sastre, M. Klockgether, T. ve Heneka, M.T. (2006). Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 24, 167-176.
251. White, J.A. Manelli, A.M. Holmberg, K.H. Van Eldik, L.J. ve Ladu, M.J. (2005). Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta 1-42 on astrocyte-mediated inflammation. *Neurobiology of Disease*, 18, 459-465.
252. Reed-Geaghan, E.G. Savage, J.C. Hise, A.G. ve Landreth, G.E. (2009). CD14 and toll-like receptors 2 and 4 are required for fibrillar A β -stimulated microglial activation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29, 11982-11992.

253. Arroyo, D.S. Soria, J.A. Gaviglio, E.A. Rodriguez-Galan, M.C. ve Iribarren, P. (2011). Toll-like receptors are key players in neurodegeneration. *International Immunopharmacology*, 11, 1415-1421.
254. Moul, P.R. Corrêa, S.A.L. Collingridge, G.L. Fitzjohn, S.M. ve Bashir, Z.I. (2008). Co-activation of p38 mitogen-activated protein kinase and protein tyrosine phosphatase underlies metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *The Journal of Physiology*, 586, 2499-2510.
255. Bissen, D. Foss, F. ve Acker-Palmer, A. (2019). AMPA receptors and their minions: auxiliary proteins in AMPA receptor trafficking. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76, 2133-2169.
256. Paloczi, J. Varga, Z.V. Hasko, G. ve Pacher, P. (2018). Neuroprotection in Oxidative Stress-Related Neurodegenerative Diseases: Role of Endocannabinoid System Modulation. *Antioxidants & Redox signaling*, 29, 75-108.
257. Hampson, A. Grimaldi, M. Axelrod, J. ve Wink, D. (1998). Cannabidiol and (-) Δ^9 -tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 8268-8273.
258. Esposito, G. Scuderi, C. Savani, C. Steardo Jr, L. De Filippis, D. Cottone, P. Iuvone, T. Cuomo, V. ve Steardo, L. (2007). Cannabidiol in vivo blunts β -amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1 β and iNOS expression. *British Journal of Pharmacology*, 151, 1272-1279.
259. Esposito, G. De Filippis, D. Carnuccio, R. Izzo, A.A. ve Iuvone, T. (2006). The marijuana component cannabidiol inhibits β -amyloid-induced tau protein hyperphosphorylation through Wnt/ β -catenin pathway rescue in PC12 cells. *Journal of Molecular Medicine*, 84, 253-258.
260. Fernández-Ruiz, J. Sagredo, O. Pazos, M.R. García, C. Pertwee, R. Mechoulam, R. ve Martínez-Orgado, J. (2013). Cannabidiol for neurodegenerative disorders: important new clinical applications for this phytocannabinoid? *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75, 323-333.
261. Hayakawa, K. Mishima, K. ve Fujiwara, M. (2010). Therapeutic potential of non-psychotropic cannabidiol in ischemic stroke. *Pharmaceuticals*, 3, 2197-2212.
262. Juknat, A. Pietr, M. Kozela, E. Rimmerman, N. Levy, R. Coppola, G. Geschwind, D. ve Vogel, Z. (2012). Differential transcriptional profiles mediated by exposure to the cannabinoids cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol in BV-2 microglial cells. *British Journal of Pharmacology*, 165, 2512-2528.
263. More, S.V. ve Choi, D.-K. (2015). Promising cannabinoid-based therapies for Parkinson's disease: motor symptoms to neuroprotection. *Molecular Neurodegeneration*, 10, 17.
264. Zhou, H. Zhang, Z. Wei, H. Wang, F. Guo, F. Gao, Z. Marsicano, G. Wang, Q. ve Xiong, L. (2013). Activation of STAT3 is involved in neuroprotection by electroacupuncture pretreatment via cannabinoid CB1 receptors in rats. *Brain Research*, 1529, 154-164.

265. Harvey, B.S. Ohlsson, K.S. Mååg, J.L.V. Musgrave, I.F. ve Smid, S.D. (2012). Contrasting protective effects of cannabinoids against oxidative stress and amyloid- β evoked neurotoxicity in vitro. *Neurotoxicology*, 33, 138-146.
266. Singh, N. Hroudová, J. ve Fišar, Z. (2015). Cannabinoid-induced changes in the activity of electron transport chain complexes of brain mitochondria. *Journal of Molecular Neuroscience*, 56, 926-931.
267. Slusar, J.E. Cairns, E.A. Szczesniak, A.-M. Bradshaw, H.B. Di Polo, A. ve Kelly, M.E. (2013). The fatty acid amide hydrolase inhibitor, URB597, promotes retinal ganglion cell neuroprotection in a rat model of optic nerve axotomy. *Neuropharmacology*, 72, 116-125.
268. Majd, S. Zarifkar, A. Rastgar, K. ve Takhshid, M.A. (2008). Culturing adult rat hippocampal neurons with long-interval changing media.
269. Kaneko, A. ve Sankai, Y. (2014). Long-term culture of rat hippocampal neurons at low density in serum-free medium: combination of the sandwich culture technique with the three-dimensional nanofibrous hydrogel PuraMatrix. *Public Library Of Science One*, 9.
270. Si, D. Yang, P. Jiang, R. Zhou, H. Wang, H. ve Zhang, Y. (2014). Improved cognitive outcome after progesterone administration is associated with protecting hippocampal neurons from secondary damage studied in vitro and in vivo. *Behavioural Brain Research*, 264, 135-142.
271. Wang, R. Wang, R. Niu, X. Cheng, Y. Shang, X. Li, Y. Li, S. Liu, X. ve Shao, J. (2019). Role of astrocytes-derived d-serine in PFOS-induced neurotoxicity through NMDARs in the rat primary hippocampal neurons. *Toxicology*, 422, 14-24.
272. de Carvalho, N.D. Garcia, R.C. Ferreira, A.K. Batista, D.R. Cassola, A.C. Maria, D. Lebrun, I. Carneiro, S.M. Afeche, S.C. Marcourakis, T. ve Sandoval, M.R.L. (2014). Neurotoxicity of coral snake phospholipases A2 in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Research*, 1552, 1-16.
273. Liu, F.-f. Zhao, S. Liu, P. ve Huo, S.-p. (2019). Influence of mTOR signaling pathway on ketamine-induced injuries in the hippocampal neurons of rats. *Neurological Research*, 41, 77-86.
274. Zhang, Y. Su, P. Liang, P. Liu, T. Liu, X. Liu, X.-Y. Zhang, B. Han, T. Zhu, Y.-B. ve Yin, D.-M. (2010). The DREAM protein negatively regulates the NMDA receptor through interaction with the NR1 subunit. *Journal of Neuroscience*, 30, 7575-7586.
275. Nie, S.-D. Li, X. Tang, C.-E. Min, F.-Y. Shi, X.-J. Wu, L.-Y. Zhou, S.-L. Chen, Z. Wu, J. Song, T. Dai, Z.-J. Zheng, J. Liu, J.-j. ve Wang, S. (2018). High glucose forces a positive feedback loop connecting ErbB4 expression and mTOR/S6K pathway to aggravate the formation of tau hyperphosphorylation in differentiated SH-SY5Y cells. *Neurobiology of Aging*, 67, 171-180.
276. Liu, D. Zhang, H. Gu, W. ve Zhang, M. (2014). Effects of exposure to high glucose on primary cultured hippocampal neurons: involvement of intracellular ROS accumulation. *Neurological Sciences*, 35, 831-837.

277. Almaguel, F.G. Liu, J.W. Pacheco, F.J. Casiano, C.A. ve De Leon, M. (2009). Activation and reversal of lipotoxicity in PC12 and rat cortical cells following exposure to palmitic acid. *Journal of Neuroscience Research*, 87, 1207-1218.
278. Song, Z. Song, M. Lee, D.Y. Liu, Y. Deaciuc, I.V. ve McClain, C.J. (2007). Silymarin prevents palmitate-induced lipotoxicity in HepG2 cells: involvement of maintenance of Akt kinase activation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 101, 262-268.
279. Liu, J.W. Montero, M. Bu, L. ve De Leon, M. (2015). Epidermal fatty acid-binding protein protects nerve growth factor-differentiated PC 12 cells from lipotoxic injury. *Journal of Neurochemistry*, 132, 85-98.
280. Jung, I.-R. Choi, S.-E. Jung, J.-G. Lee, S.-A. Han, S.J. Kim, H.J. Kim, D.J. Lee, K.-W. ve Kang, Y. (2015). Involvement of iron depletion in palmitate-induced lipotoxicity of beta cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 407, 74-84.
281. Bournival, J. Francoeur, M.-A. Renaud, J. ve Martinoli, M.-G. (2012). Quercetin and sesamin protect neuronal PC12 cells from high-glucose-induced oxidation, nitrosative stress, and apoptosis. *Rejuvenation Research*, 15, 322-333.
282. Yar Saglam, A. Alp, E. Elmazoglu, Z. ve Menevse, S. (2016). Treatment with cucurbitacin B alone and in combination with gefitinib induces cell cycle inhibition and apoptosis via EGFR and JAK/STAT pathway in human colorectal cancer cell lines. *Human & Experimental Toxicology*, 35, 526-543.
283. Elmazoglu, Z. Yar Saglam, A.S. Sonmez, C. ve Karasu, C. (2020). Luteolin protects microglia against rotenone-induced toxicity in a hormetic manner through targeting oxidative stress response, genes associated with Parkinson's disease and inflammatory pathways. *Drug And Chemical Toxicology*, 43, 96-103.
284. Repetto, G. del Peso, A. ve Zurita, J.L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*, 3, 1125-1131.
285. Ates, G. Vanhaecke, T. Rogiers, V. ve Rodrigues, R.M., (2017). Assaying cellular viability using the neutral red uptake assay. *Cell Viability Assays*. Springer, 19-26
286. Wang, Q. Zhou, J.-L. Wang, H. Ju, Q. Ding, Z. Zhou, X.-L. Ge, X. Shi, Q.-M. Pan, C. ve Zhang, J.-P. (2016). Inhibition effect of cypermethrin mediated by co-regulators SRC-1 and SMRT in interleukin-6-induced androgen receptor activation. *Chemosphere*, 158, 24-29.
287. Türker Şener, L. Albeniz, G. Dinç, B.r. ve Albeniz, I. (2017). iCELLigence real-time cell analysis system for examining the cytotoxicity of drugs to cancer cell lines. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14, 1866-1870.

288. Haugen, B. Karinshak, S.E. Mann, V.H. Popratiloff, A. Loukas, A. Brindley, P.J. ve Smout, M.J. (2018). Granulin secreted by the food-borne liver fluke *Opisthorchis viverrini* promotes angiogenesis in human endothelial cells. *Frontiers in Medicine*, 5, 30.
289. Cumaoğlu, A. Rackova, L. Stefek, M. Kartal, M. Maechler, P. ve Karasu, Ç. (2011). Effects of olive leaf polyphenols against H₂O₂ toxicity in insulin secreting β -cells. *Acta Biochimica Polonica*, 58.
290. Cumaoğlu, A. Ari, N. Kartal, M. ve Karasu, C. (2011). Polyphenolic extracts from *Olea europea* L. protect against cytokine-induced β -cell damage through maintenance of redox homeostasis. *Rejuvenation Research*, 14, 325-334.
291. Bali, E.B. Ergin, V. Rackova, L. Bayraktar, O. Küçükboyacı, N. ve Karasu, Ç. (2014). Olive leaf extracts protect cardiomyocytes against 4-hydroxynonenal-induced toxicity in vitro: comparison with oleuropein, hydroxytyrosol, and quercetin. *Planta Medica*, 80, 984-992.
292. Beriault, D.R. ve Werstuck, G.H. (2013). Detection and quantification of endoplasmic reticulum stress in living cells using the fluorescent compound, Thioflavin T. 1833, 2293-2301.
293. Walsh, D.M. Thulin, E. Minogue, A.M. Gustavsson, N. Pang, E. Teplow, D.B. ve Linse, S. (2009). A facile method for expression and purification of the Alzheimer's disease-associated amyloid β -peptide. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 276, 1266-1281.
294. Maezawa, I. Hong, H.-S. Liu, R. Wu, C.-Y. Cheng, R.H. Kung, M.-P. Kung, H.F. Lam, K.S. Oddo, S. Laferla, F.M. ve Jin, L.-W. (2007). Congo red and thioflavin-T analogs detect A β oligomers. *Journal of Neurochemistry*, 0, 071024001227002.
295. Elmazoglu, Z. Ergin, V. Sahin, E. Kayhan, H. ve Karasu, C. (2017). Oleuropein and rutin protect against 6-OHDA-induced neurotoxicity in PC12 cells through modulation of mitochondrial function and unfolded protein response. *Interdisciplinary Toxicology*, 10, 129-141.
296. Guo, Y. Yu, W. Sun, D. Wang, J. Li, C. Zhang, R. Babcock, S.A. Li, Y. Liu, M. ve Ma, M. (2015). A novel protective mechanism for mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) in type i diabetes-induced cardiac dysfunction: role of AMPK-regulated autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1852, 319-331.
297. Tsai, C.-Y. Wang, C.-C. Lai, T.-Y. Tsu, H.-N. Wang, C.-H. Liang, H.-Y. ve Kuo, W.-W. (2013). Antioxidant effects of diallyl trisulfide on high glucose-induced apoptosis are mediated by the PI3K/Akt-dependent activation of Nrf2 in cardiomyocytes. *International Journal of Cardiology*, 168, 1286-1297.
298. Kandimalla, R. Thirumala, V. ve Reddy, P.H. (2017). Is Alzheimer's disease a type 3 diabetes? A critical appraisal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1863, 1078-1089.

299. Koppensteiner, P. Trinchese, F. Fà, M. Puzzo, D. Gulisano, W. Yan, S. Poussin, A. Liu, S. Orozco, I. Dale, E. Teich, A.F. Palmeri, A. Ninan, I. Boehm, S. ve Arancio, O. (2016). Time-dependent reversal of synaptic plasticity induced by physiological concentrations of oligomeric A β 42: an early index of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 6, 32553-32553.
300. Tackenberg, C. ve Nitsch, R.M. (2019). The secreted APP ectodomain sAPP α , but not sAPP β , protects neurons against A β oligomer-induced dendritic spine loss and increased tau phosphorylation. *Molecular Brain*, 12.
301. Bongarzone, S. Savickas, V. Luzi, F. ve Gee, A.D. (2017). Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60, 7213-7232.
302. Ren, X. Wang, N.-N. Qi, H. Qiu, Y.-Y. Zhang, C.-H. Brown, E. Kong, H. ve Kong, L. (2018). Up-Regulation Thioredoxin Inhibits Advanced Glycation End Products-Induced Neurodegeneration. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 50, 1673-1686.
303. Chen, Y. Cao, C.-P. Li, C.-R. Wang, W. Zhang, D. Han, L.-L. Zhang, X.-Q. Kim, A. Kim, S. ve Liu, G.-L. (2010). Ghrelin Modulates Insulin Sensitivity and Tau Phosphorylation in High Glucose-Induced Hippocampal Neurons. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 33, 1165-1169.
304. Gaspar, J.M. Castilho, Á. Baptista, F.I. Liberal, J. ve Ambrósio, A.F. (2010). Long-term exposure to high glucose induces changes in the content and distribution of some exocytotic proteins in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*, 171, 981-992.
305. Liu, J. Wang, Y.-H. Li, W. Liu, L. Yang, H. Meng, P. ve Han, Y.-S. (2019). Structural and functional damage to the hippocampal neurovascular unit in diabetes-related depression. *Neural Regeneration Research*, 14, 289-297.
306. Liu, D. Zhang, H. Gu, W. ve Zhang, M. (2014). Effects of exposure to high glucose on primary cultured hippocampal neurons: involvement of intracellular ROS accumulation. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 35, 831-837.
307. Wang, Q. Zhou, J.-L. Wang, H. Ju, Q. Ding, Z. Zhou, X.-L. Ge, X. Shi, Q.-M. Pan, C. Zhang, J.-P. Zhang, M.-R. Yu, H.-M. ve Xu, L.-C. (2016). Inhibition effect of cypermethrin mediated by co-regulators SRC-1 and SMRT in interleukin-6-induced androgen receptor activation. *Chemosphere*, 158, 24-29.
308. Hamidi, H. Lilja, J. ve Ivaska, J. (2017). Using xCELLigence RTCA Instrument to Measure Cell Adhesion. *Bio-protocol*, 7, e2646.
309. Düzgün, Ş.A. Yerlikaya, A. Zeren, S. Bayhan, Z. Okur, E. ve Boyacı, İ. (2017). Differential effects of p38 MAP kinase inhibitors SB203580 and SB202190 on growth and migration of human MDA-MB-231 cancer cell line. *Cytotechnology*, 69, 711-724.

310. Maciejczyk, M. Żebrowska, E. ve Chabowski, A. (2019). Insulin Resistance and Oxidative Stress in the Brain: What's New? *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 874.
311. Nakabeppu, Y., (2019). Molecular Pathophysiology of Insulin Depletion, Mitochondrial Dysfunction, and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease Brain. Y. Nakabeppu ve Ninomiya, T. *Advances in Experimental Medicine and Biology* Springer, Singapore, 27-44
312. Dagon, Y. Avraham, Y. Link, G. Zolotarev, O. Mechoulam, R. ve Berry, E.M. (2007). The synthetic cannabinoid HU-210 attenuates neural damage in diabetic mice and hyperglycemic pheochromocytoma PC12 cells. *Neurobiology of Disease*, 27, 174-181.
313. Zorzenon, M.R.T. Santiago, A.N. Mori, M.A. Piovan, S. Jansen, C.A. Perina Padilha, M.E. Ciotta, S.R. Cezar de Freitas Mathias, P. Guimarães, F.S. Weffort de Oliveira, R.M. Milani, P.G. ve Mareze-Costa, C.E. (2019). Cannabidiol improves metabolic dysfunction in middle-aged diabetic rats submitted to a chronic cerebral hypoperfusion. *Chemico-Biological Interactions*, 312, 108819-108819.
314. Park, H.R. Kim, J.-Y. Park, K.-Y. ve Lee, J. (2011). Lipotoxicity of palmitic Acid on neural progenitor cells and hippocampal neurogenesis. *Toxicological Research*, 27, 103-110.
315. Yuan, Q. Zhao, S. Wang, F. Zhang, H. Chen, Z.-J. Wang, J. Wang, Z. Du, Z. Ling, E.-A. Liu, Q. ve Hao, A. (2013). Palmitic acid increases apoptosis of neural stem cells via activating c-Jun N-terminal kinase. *Stem Cell Research*, 10, 257-266.
316. Wang, Z. Liu, D. Zhang, Q. Wang, J. Zhan, J. Xian, X. Du, Z. Wang, X. ve Hao, A. (2014). Palmitic acid affects proliferation and differentiation of neural stem cells in vitro. *Journal Of Neuroscience Research*, 92, 574-586.
317. Miao, X.-Y. Gu, Z.-Y. Liu, P. Hu, Y. Li, L. Gong, Y.-P. Shu, H. Liu, Y. ve Li, C.-L. (2013). The human glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide regulates pancreatic beta-cell proliferation and apoptosis via an AMPK/mTOR/P70S6K signaling pathway. *Peptides*, 39, 71-79.
318. Lenin, R. Maria, M.S. Agrawal, M. Balasubramanyam, J. Mohan, V. ve Balasubramanyam, M. (2012). Amelioration of glucolipotoxicity-induced endoplasmic reticulum stress by a “chemical chaperone” in human THP-1 monocytes. *Experimental Diabetes Research*, 2012.
319. Guo, J. Li, C. Yang, C. Li, B. Wei, J. Lin, Y. Ye, P. Hu, G. ve Li, J. (2018). Liraglutide reduces hepatic glucolipotoxicity-induced liver cell apoptosis through NRF2 signaling in Zucker diabetic fatty rats. *Molecular Medicine Reports*, 17, 8316-8324.
320. Chen, S. An, F.-M. Yin, L. Liu, A.-r. Yin, D.-k. ve Yao, W.-B. (2014). Glucagon-like peptide-1 protects hippocampal neurons against advanced glycation end product-induced tau hyperphosphorylation. *Neuroscience*, 256, 137-146.

321. Benoit, S.C. Kemp, C.J. Elias, C.F. Abplanalp, W. Herman, J.P. Migrenne, S. Lefevre, A.-L. Cruciani-Guglielmacci, C. Magnan, C. Yu, F. Niswender, K. Irani, B.G. Holland, W.L. ve Clegg, D.J. (2009). Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- θ subcellular localization in rodents. *The Journal of Clinical Investigation*, 119, 2577-2589.
322. Kim, J.Y. Lee, H.J. Lee, S.-J. Jung, Y.H. Yoo, D.Y. Hwang, I.K. Seong, J.K. Ryu, J.M. ve Han, H.J. (2017). Palmitic Acid-BSA enhances Amyloid- β production through GPR40-mediated dual pathways in neuronal cells: Involvement of the Akt/mTOR/HIF-1 α and Akt/NF- κ B pathways. *Scientific reports*, 7, 1-16.
323. Martins, I.J. (2018). Inactivation of endoplasmic reticulum stress and the prevention of neurodegenerative diseases. *Research & Reviews: Neuroscience*, 2(2), 22-25.
324. Harvey, B.S. Ohlsson, K.S. Mååg, J.L. Musgrave, I.F. ve Smid, S.D. (2012). Contrasting protective effects of cannabinoids against oxidative stress and amyloid- β evoked neurotoxicity in vitro. *Neurotoxicology*, 33, 138-146.
325. Milton, N.G. (2002). Anandamide and noladin ether prevent neurotoxicity of the human amyloid- β peptide. *Neuroscience letters*, 332, 127-130.
326. Twitchell, W. Brown, S. ve Mackie, K. (1997). Cannabinoids Inhibit N- and P/Q-Type Calcium Channels in Cultured Rat Hippocampal Neurons. *Journal of Neurophysiology*, 78, 43-50.
327. Haghani, M. Shabani, M. Javan, M. Motamedi, F. ve Janahmadi, M. (2012). CB1 Cannabinoid Receptor Activation Rescues Amyloid β -Induced Alterations in Behaviour and Intrinsic Electrophysiological Properties of Rat Hippocampal CA1 Pyramidal Neurones. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 29, 391-406.
328. Chen, X. Zhang, J. ve Chen, C. (2011). Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects neurons against β -amyloid insults. *Neuroscience*, 178, 159-168.
329. Huber, C.M. Yee, C. May, T. Dhanala, A. ve Mitchell, C.S. (2018). Cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease: amyloid-beta versus tauopathy. *Journal of Alzheimer's disease*, 61, 265-281.
330. Li, Z.-g. Zhang, W. ve Sima, A.A. (2007). Alzheimer-like changes in rat models of spontaneous diabetes. *Diabetes*, 56, 1817-1824.
331. Kotlar, I. Rangel-López, E. Colonnello, A. Aguilera-Portillo, G. Serratos, I.N. Galván-Arzate, S. Pedraza-Chaverri, J. Túnez, I. Wajner, M. ve Santamaría, A. (2019). Anandamide reduces the toxic synergism exerted by quinolinic acid and glutaric acid in rat brain neuronal cells. *Neuroscience*, 401, 84-95.

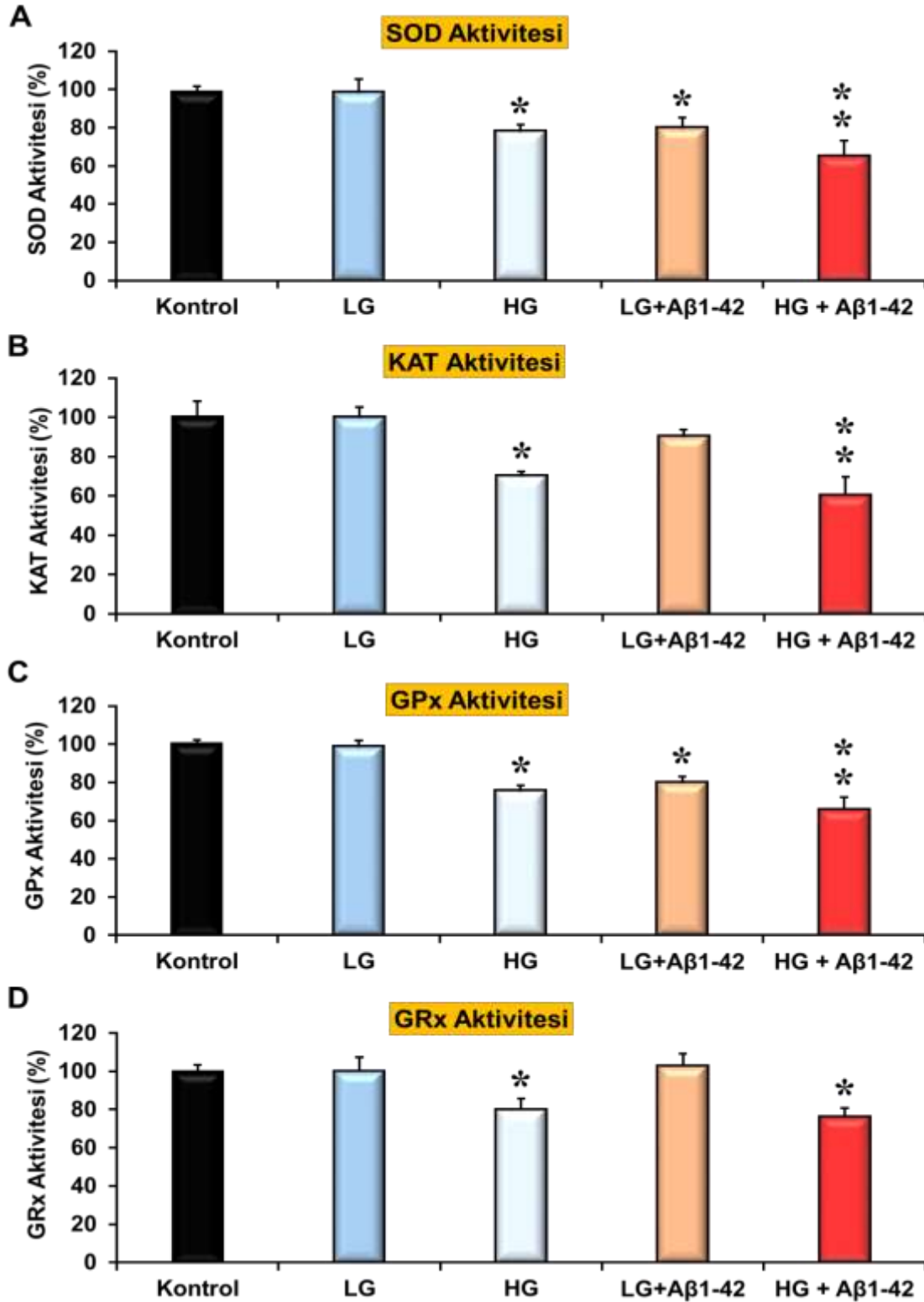
332. Maya-López, M. Rubio-López, L.C. Rodríguez-Alvarez, I.V. Orduño-Piceno, J. Flores-Valdivia, Y. Colonnello, A. Rangel-López, E. Túnez, I. Prospéro-García, O. ve Santamaría, A. (2020). A cannabinoid receptor-mediated mechanism participates in the neuroprotective effects of oleamide against excitotoxic damage in rat brain synaptosomes and cortical slices. *Neurotoxicity Research*, 37, 126-135.
333. Aguilera-Portillo, G. Rangel-López, E. Villeda-Hernández, J. Chavarría, A. Castellanos, P. Elmazoglu, Z. Karasu, Ç. Túnez, I. Pedraza, G. Königsberg, M. ve Santamaría, A. (2019). The Pharmacological Inhibition of Fatty Acid Amide Hydrolase Prevents Excitotoxic Damage in the Rat Striatum: Possible Involvement of CB1 Receptors Regulation. *Molecular Neurobiology*, 56, 844-856.
334. Rangel-López, E. Colín-González, A.L. Paz-Loyola, A.L. Pinzón, E. Torres, I. Serratos, I.N. Castellanos, P. Wajner, M. Souza, D.O. ve Santamaría, A. (2015). Cannabinoid receptor agonists reduce the short-term mitochondrial dysfunction and oxidative stress linked to excitotoxicity in the rat brain. *Neuroscience*, 285, 97-106.
335. Janefjord, E. Mååg, J.L.V. Harvey, B.S. ve Smid, S.D. (2014). Cannabinoid Effects on β Amyloid Fibril and Aggregate Formation, Neuronal and Microglial-Activated Neurotoxicity In Vitro. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 34, 31-42.
336. Chen, X. Zhang, J. ve Chen, C. (2011). Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects neurons against β -amyloid insults. *Neuroscience*, 178, 159-168.
337. Ding, H. Wang, H. Zhao, Y. Sun, D. ve Zhai, X. (2015). Protective effects of baicalin on A β 1–42-induced learning and memory deficit, oxidative stress, and apoptosis in rat. *Cellular And Molecular Neurobiology*, 35, 623-632.
338. Xu, P.-x. Wang, S.-w. Yu, X.-l. Su, Y.-j. Wang, T. Zhou, W.-w. Zhang, H. Wang, Y.-j. ve Liu, R.-t. (2014). Rutin improves spatial memory in Alzheimer's disease transgenic mice by reducing A β oligomer level and attenuating oxidative stress and neuroinflammation. *Behavioural Brain Research*, 264, 173-180.
339. Akhter, F. Chen, D. Yan, S.F. ve Yan, S., (2017). Mitochondrial perturbation in Alzheimer's disease and diabetes. (editörler). *Progress In Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier, 341-361
340. Rose, J. Brian, C. Woods, J. Pappa, A. Panayiotidis, M.I. Powers, R. ve Franco, R. (2017). Mitochondrial dysfunction in glial cells: Implications for neuronal homeostasis and survival. *Toxicology*, 391, 109-115.
341. Cenini, G. ve Voos, W. (2019). Mitochondria as Potential Targets in Alzheimer Disease Therapy: An Update. *Frontiers in Pharmacology*, 10.
342. Chang, C.-Y. Liang, M.-Z. ve Chen, L. (2019). Current progress of mitochondrial transplantation that promotes neuronal regeneration. *Translational Neurodegeneration*, 8, 17.

343. Liu, Z. Ma, C. Zhao, W. Zhang, Q. Xu, R. Zhang, H. Lei, H. ve Xu, S. (2017). High Glucose Enhances Isoflurane-Induced Neurotoxicity by Regulating TRPC-Dependent Calcium Influx. *Neurochemical Research*, 42, 1165-1178.
344. Yang, Y. Fan, C. Wang, B. Ma, Z. Wang, D. Gong, B. Di, S. Jiang, S. Li, Y. Li, T. Yang, Z. ve Luo, E. (2017). Pterostilbene attenuates high glucose-induced oxidative injury in hippocampal neuronal cells by activating nuclear factor erythroid 2-related factor 2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863, 827-837.
345. Ryan, D. Drysdale, A.J. Lafourcade, C. Pertwee, R.G. ve Platt, B. (2009). Cannabidiol Targets Mitochondria to Regulate Intracellular Ca²⁺ Levels. *Journal of Neuroscience*, 29, 2053-2063.
346. Wang, D.-P. Lv, Q.-L. Lin, Q. Kang, K. Jin, K.-Y. ve Hai, J. (2019). The Cannabinoid Receptor Agonist WIN55,212-2 Ameliorates Hippocampal Neuronal Damage After Chronic Cerebral Hypoperfusion Possibly Through Inhibiting Oxidative Stress and ASK1-p38 Signaling. *Neurotoxicity Research*, 10.1007/s12640-019-00141-8.
347. Akhtar, M.W. Sanz-Blasco, S. Dolatabadi, N. Parker, J. Chon, K. Lee, M.S. Soussou, W. McKercher, S.R. Ambasudhan, R. Nakamura, T. ve Lipton, S.A. (2016). Elevated glucose and oligomeric β -amyloid disrupt synapses via a common pathway of aberrant protein S-nitrosylation. *Nature Communications*, 7, 10242.
348. Blanco Calvo, E. Rodríguez de Fonseca, F. Rivera, P. Suárez, J. Bindila, L. Alén, F. Rubio, L. Vargas, A. Pavón, F.J. ve Serrano, A. (2015). Pharmacological activation of CB2 receptors counteracts the deleterious effect of ethanol on cell proliferation in the main neurogenic zones of the adult rat brain. *Cellular Neuroscience*, 2015, vol. 9, núm. 379, p. 1-14.
349. Li, H. Wood, J.T. Whitten, K.M. Vadivel, S.K. Seng, S. Makriyannis, A. ve Avraham, H.K. (2013). Inhibition of fatty acid amide hydrolase activates Nrf2 signalling and induces heme oxygenase 1 transcription in breast cancer cells. *British Journal of Pharmacology*, 170, 489-505.
350. Juknat, A. Pietr, M. Kozela, E. Rimmerman, N. Levy, R. Gao, F. Coppola, G. Geschwind, D. ve Vogel, Z. (2013). Microarray and pathway analysis reveal distinct mechanisms underlying cannabinoid-mediated modulation of LPS-induced activation of BV-2 microglial cells. *Public Library Of Science One*, 8.
351. Pu, D. Zhao, Y. Chen, J. Lv, A. Zhu, S. Luo, C. Zhao, K. ve Xiao, Q. (2018). Protective effects of sulforaphane on cognitive impairments and AD-like lesions in diabetic mice are associated with the upregulation of Nrf2 transcription activity. *Neuroscience*, 381, 35-45.
352. Negi, G. Kumar, A. ve S Sharma, S. (2011). Nrf2 and NF- κ B modulation by sulforaphane counteracts multiple manifestations of diabetic neuropathy in rats and high glucose-induced changes. *Current Neurovascular Research*, 8, 294-304.

353. Zhao, J. Liu, L. Li, X. Zhang, L. Lv, J. Guo, X. Chen, H. ve Zhao, T. (2019). Neuroprotective effects of an Nrf2 agonist on high glucose-induced damage in HT22 cells. *Biological Research*, 52.
354. Melas, P.A. Qvist, J.S. Deidda, M. Upreti, C. Wei, Y.B. Sanna, F. Fratta, W. Scherma, M. Fadda, P. Kandel, D.B. ve Kandel, E.R. (2018). Cannabinoid Modulation of Eukaryotic Initiation Factors (eIF2 α and eIF2B1) and Behavioral Cross-Sensitization to Cocaine in Adolescent Rats. *Cell Reports*, 22, 2909-2923.
355. Wek, R.C. Jiang, H.Y. ve Anthony, T.G. (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochemical Society Transactions*, 34, 7-11.
356. Choy, Meng S. Yusoff, P. Lee, Irene C. Newton, Jocelyn C. Goh, Catherine W. Page, R. Shenolikar, S. ve Peti, W. (2015). Structural and Functional Analysis of the GADD34:PP1 eIF2 α Phosphatase. *Cell Reports*, 11, 1885-1891.
357. Kida, S. ve Serita, T. (2014). Functional roles of CREB as a positive regulator in the formation and enhancement of memory. *Brain Research Bulletin*, 105, 17-24.
358. Murphy, K.E. ve Park, J.J. (2017). Can co-activation of Nrf2 and neurotrophic signaling pathway slow Alzheimer's disease? *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1168.

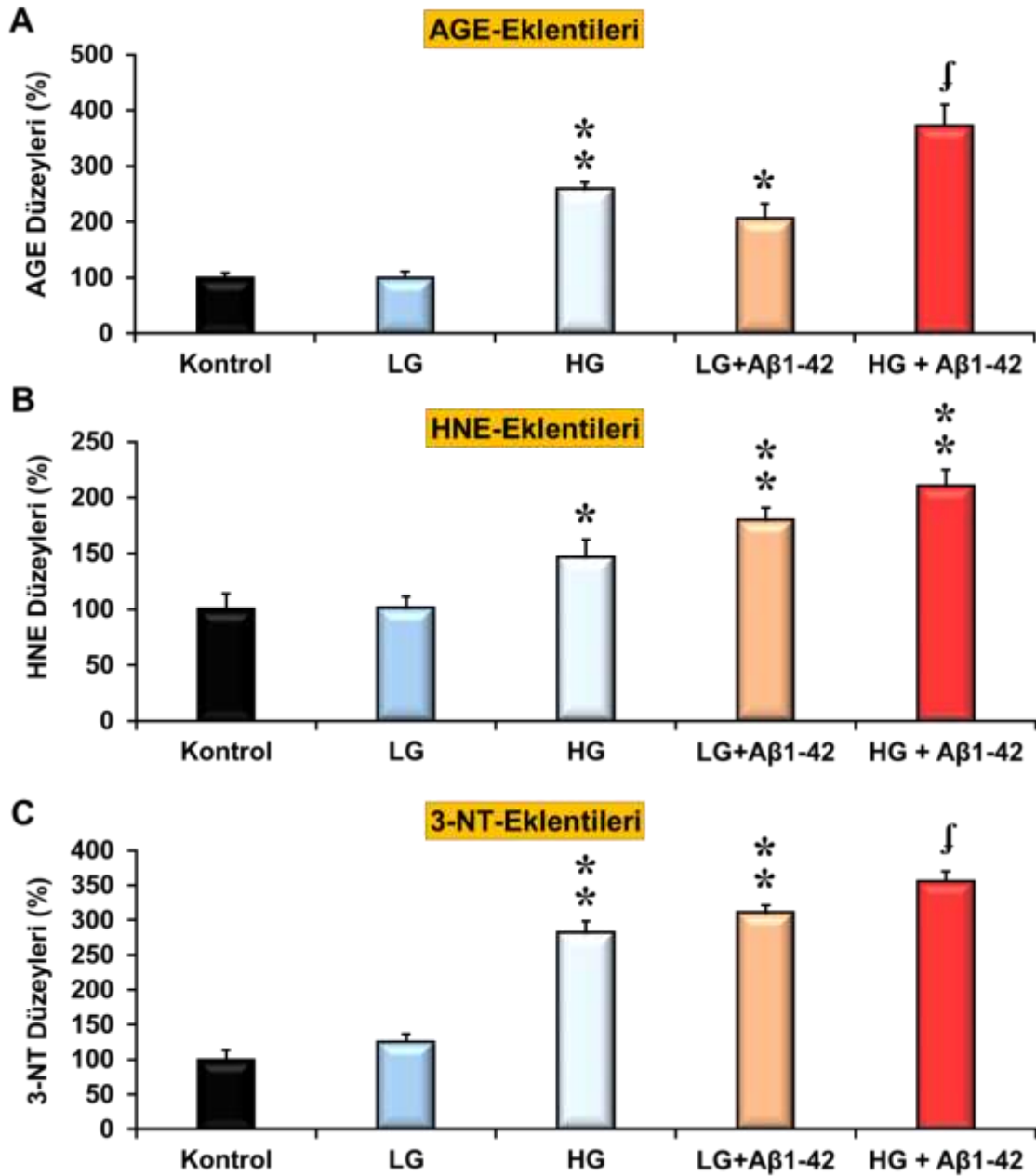
EKLER

EK-1. DM-AH modelinde intrinsik antioksidan enzim aktiviteleri



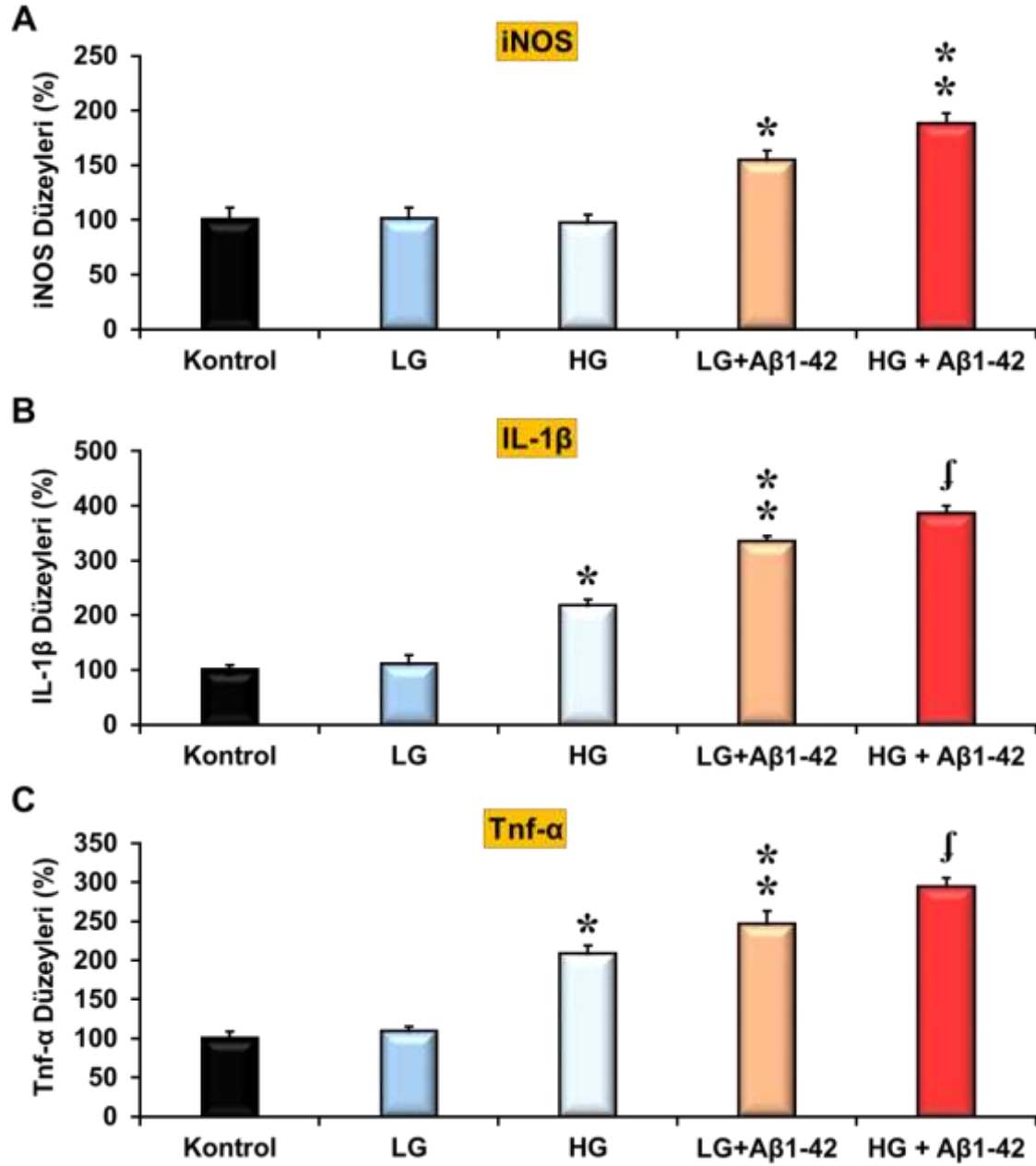
Şekil 1.1. DM-AH modelinde primer hipokampal hücrelere 25 mM glukoz (LG), 150 mM glukoz (HG), LG+ 500 nM Aβ1-42 veya HG+Aβ1-42 uygulanması sonucu süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyn redüktaz (GRx) aktivitelerinde meydana gelen değişim (n=2). *p < 0.05, **p < 0.01, †p < 0.001, çözücü verilmiş kontrol grubuna göre (Kruskal Wallis post hoc Dunn's testi)

EK-2. DM-AH modelinde oksidatif/nitrozatif stres ileri son ürünlerinin düzeyleri



Şekil 2.1. DM-AH modelinde primer hipokampal hücrelere 25 mM glukoz (LG), 150 mM glukoz (HG), LG+ 500 nM Aβ1-42 veya HG+Aβ1-42 uygulanması sonucu ileri glikasyon son ürünü (AGE), ileri lipooksidasyon son ürünü 4-hidoksi-2-nonenal (HNE), 3-nitrotirozin (3-NT) düzeylerinde meydana gelen değişim (n=2). *p < 0.05, **p < 0.01, ^fp < 0.001, çözücü verilmiş kontrol grubuna göre (Kruskal Wallis post hoc Dunn's testi)

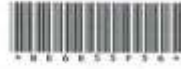
EK-3. DM-AH modelinde inflamatuvar belirteçlerin düzeyleri



Şekil 3.1. DM-AH modelinde primer hipokampal hücrelere 25 mM glukoz (LG), 150 mM glukoz (HG), LG+ 500 nM Aβ1-42 veya HG+Aβ1-42 uygulanması sonucu indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), interlökin 1 beta (IL-1β) ve tümör nekrozis faktör (Tnf-α) düzeylerinde meydana gelen değişim (n=2). *p < 0.05, **p < 0.01, [§]p < 0.001, çözücü verilmiş kontrol grubuna göre (Kruskal Wallis post hoc Dunn's testi)

EK-4. Deney hayvanları etik kurul onay belgesi

Evrak Tarih ve Sayısı: 09/05/2017-E.67719


 4 86 0 8 5 5 7 5 6 4


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



Sayı : 66332047-604.01.02-
 Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Çimen KARASU
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Daha önce 24.12.2016 tarih ve E.156796 sayılı yazımız ile onay alan, araştırmacı grubu Çimen KARASU, Gülnur TAKE KAPLANOĞLU, Handan KAYHAN ve Zübeyir ELMAZOĞLU'ndan oluşan G.Ü.ET-16.081 kod numaralı ve "*Gluko-Lipotoksisite ile İndüklenmiş, Amiloid- β Aracılı Nörodejenerasyonda Endokannabinoid Sistemin Rolünün Değerlendirilmesi*" başlıklı araştırma önerisi ile ilgili alınan 06.04.2017 tarihli dilekçe konusu Başkanlığımız tarafından incelenmiş olup,

Araştırmacı grubundan Gülnur TAKE KAPLANOĞLU ve Handan KAYHAN'ın ayrılması ile ilgili talebin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiş ve karara ilişkin imza listesi ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
 Kurul Başkanı

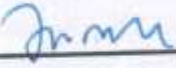
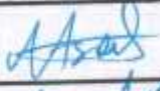
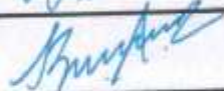
Ek:1 Liste

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/

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

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-4.(devam) Deney hayvanları etik kurul onay belgesi

GAZİ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ	
TOPLANTI TARİHİ :05.05.2017	TOPLANTI SAYISI : 04
ADI-SOYADI	İMZA
Prof.Dr.Abdülcadir BEDİRLİ (Başkan)	
Uzm.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)	
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU	KATILAMADI
Prof.Dr.Tuncay PEKER	
Prof.Dr.Fatma AKAR	
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK	KATILAMADI
Doç.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ	
Doç.Dr.Süleyman YEŞİL	
Doç.Dr.Emre BARIŞ	
Doç.Dr.İpek SÜNTAR	KATILAMADI
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR	
Vet.Hek.Burcu AVCI	
Osman İÇ	KATILAMADI

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Zübeyir ELMAZOĞLU
 Uyuğu : KKTC
 Doğum tarihi ve yeri : 03.09.1989, Lefkoşa/ KKTC
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0506 924 77 12
 e-mail : zub_pharma@hotmail.com



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	2014
Lisans	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2011
Lise	Güzelyurt Türk Maarif Koleji	2006

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Ozlu, H., Cakir Gundogdu, A., Elmazoglu, Z., Take Kaplanoglu, G., Oktar, L., & Karasu, C. (2020). *Bacopa Monnieri* Protects the Directly Affected Organ as Well as Distant Organs Against I/R Injury by Modulating Anti-Inflammatory and Anti-Nitrosative Pathways in A Rat Model for Infra-Renal Aortic Occlusion. *Journal of Investigative Surgery*, 1–12.

2. Prnová, M. Š., Račková, L., Kováčiková, L., Balleková, J., Viskupičová, J., Micháliková, S., Taskoparan, B., Elmazoglu, Z., Rižner, T. L., Karasu, C., & Banerjee, S. (2019). General toxicity assessment of the novel aldose reductase inhibitor cemtirestat. *Interdisciplinary Toxicology*, 12(3), 120-128.
3. Prnova, M. S., Kovacikova, L., Svik, K., Bezek, S., Elmazoğlu, Z., Karasu, C., & Stefek, M. (2019). Triglyceride-lowering effect of the aldose reductase inhibitor cemtirestat-another factor that may contribute to attenuation of symptoms of peripheral neuropathy in STZ-diabetic rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 10.1007/s00210-019-01769.
4. Seymen, C. M., Ilgaz, C., Erdogan, D., Elmas, C., Saglam, A., Elmazoglu, Z., Aral, B. S., and Kaplanoglu, G. T. (2019). Melatonin Modulates NMDA-Receptor 2B/Calpain-1/ Caspase-12 Pathways in Rat Brain After Long Time Exposure to GSM Radiation. *Turkish Neurosurgery*, 29(6), 887–900.
5. Ergun, S. B., Saribas, G. S., Yarayici, S., Elmazoglu, Z., Cardak, A., Ozogul, C., Ilhan, M. N., Karasu, C., and Evren Kemer, O. (2019). Comparison of Efficacy and Safety of Two Tea Tree Oil-Based Formulations in Patients with Chronic Blepharitis: A Double-Blinded Randomized Clinical Trial. *Ocular Immunology and Inflammation*, 1–10.
6. Aguilera-Portillo, G., Rangel-López, E., Villeda-Hernández, J., Chavarría, A., Castellanos, P., Elmazoglu, Z., Karasu, Ç., Túnez, I., Pedraza, G., Königsberg, M., & Santamaría, A. (2019). The Pharmacological Inhibition of Fatty Acid Amide Hydrolase Prevents Excitotoxic Damage in the Rat Striatum: Possible Involvement of CB1 Receptors Regulation. *Molecular Neurobiology*, 56(2), 844–856.
7. Sağlam ASY, Elmazoğlu Z, Kayhan H, Önen Hİ, Yılmaz A, Menevşe ES. EF24'ün Dose-taksel ile Sıralı Uygulamasının Metastatik Meme Kanseri Hücre Hattına Etkisi. *Firat Tıp Dergisi*, 2018; 23(2)
8. Elmazoglu, Z., Yar Saglam, A. S., Sonmez, C., & Karasu, C. (2018). Luteolin protects microglia against rotenone-induced toxicity in a hormetic manner through targeting oxidative stress response, genes associated with Parkinson's disease and inflammatory pathways. *Drug and Chemical Toxicology*, 43(1), 96–103.
9. Elmazoglu, Z., Ergin, V., Sahin, E., Kayhan, H., & Karasu, C. (2017). Oleuropein and rutin protect against 6-OHDA-induced neurotoxicity in PC12 cells through modulation of mitochondrial function and unfolded protein response. *Interdisciplinary Toxicology*, 10(4), 129–141.

10. Saglam, A. S., Alp, E., Elmazoglu, Z., & Menevse, E. S. (2016). Effect of API-1 and FR180204 on cell proliferation and apoptosis in human DLD-1 and LoVo colorectal cancer cells. *Oncology Letters*, 12(4), 2463–2474.
11. Yar Saglam, A. S., Alp, E., Elmazoglu, Z., & Menevse, S. (2016). Treatment with cucurbitacin B alone and in combination with gefitinib induces cell cycle inhibition and apoptosis via EGFR and JAK/STAT pathway in human colorectal cancer cell lines. *Human & Experimental Toxicology*, 35(5), 526–543.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1. **Elmazoglu Z**, Oguz D, Bek ZA, Rangel-López E, Santamaria A, Karasu C. S-Allyl-L-Cysteine and Luteolin Prevents Hyperglycemia Induced Aβ1-42 Injury in an Alzheimer's Disease Cell Model. **(Sözlü Sunum)** COST Action NutRedOx-CA16112, 2nd-4th October 2019, Lisbon-Portugal.
2. **Elmazoglu Z**, Saglam ASY, Menevse ES. LB42708, a Farnesyltransferase Inhibitor, Induces Apoptosis and Suppresses Cell Growth without Altering p-Akt (Ser473) in p53+/+ and p53-/- HCT-116 Cells. **(Poster Sunumu)** VII.INTERNATIONAL CONGRESS OF MOLECULAR MEDICINE, 5-7 September 2019, Istanbul-Turkey.
3. **Elmazoglu Z**, Ceylan Asli F, Kovacicova L, Soltesova Prnova M, Stefek M, Karasu C. ALDOSE REDUCTASE INHIBITORS IN THE PREVENTION OF DIABETIC NEURO-DEGENERATIVE DISEASES: STUDIES IN CELL CULTURE MODELS OF ALZHEIMER'S DISEASE AND PARKINSON'S DISEASE UNDER HYPERGLYCEMIC CONDITIONS. **(Sözlü Sunum)** Interdisciplinary Toxicology Volume 12 (Supplement 1) Page: 22 L-09. 24th Interdisciplinary Toxicology Conference (TOXCON 2019), 26-28 June 2019, Vyhne-Slovakia.
4. Ceylan Asli F, **Elmazoglu Z**, Stefek M, Karasu C. EFFECTS OF CEMTIRESTAT ON GSH/GSSG, CASPASE-3 AND PROTEIN CARBONYL OF LIVER AND LUNG IN A RAT MODEL OF DIABETES INDUCED BY HIGH FRUCTOSE DIET AND STREPTOZOTOCIN: A COMPARATIVE STUDY WITH STOBADINE AND EPALRESTAT. **(Sözlü Sunum)** Interdisciplinary Toxicology Volume 12 (Supplement 1) Page: 22 L-10. 24th Interdisciplinary Toxicology Conference (TOXCON 2019), 26-28 June 2019, Vyhne-Slovakia.

5. Afandiyeva N, **Elmazoglu Z**, Bek Aydin Z, Ceylan Asli F, Stefek M, Kavutcu M, Karasu C. COMPARATIVE EFFECTS OF CEMTIRESTAT, STOBADINE AND EPALRESTAT ON GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE AND CATALASE ACTIVITIES IN THE LIVER AND LUNG OF DIABETIC RATS GIVEN HIGH FRUCTOSE DIET AND STREPTOZOTOCIN. **(Poster Sunumu)** Interdisciplinary Toxicology Volume 12 (Supplement 1) Page: 33. 24th Interdisciplinary Toxicology Conference (TOXCON 2019), 26-28 June 2019, Vyhne-Slovakia.
6. **Elmazoglu Z**, Bek ZA, Göker B, Bitik B, Aktekin CN, Tezcan ME, Karasu C. AB0107S-Allyl-L-Cysteine Attenuates Inflammation related Oxidative Stress Parameters and Increases Adhesion Capacity of Primary Human Osteoarthritic Articular Chondrocytes. **(Poster Sunumu)** Annals of the Rheumatic Diseases 2019; 78: 1514-1515. European Congress of Rheumatology (EULAR) 14-18 June 2019, Madrid-Spain.
7. **Elmazoglu Z**, Kovacikova L, Stefek M, Karasu C. Novel Carboxymethylated Mercaptotriazinoindole Derivatives as Potential inhibitors of Aldo-Keto Reductase (AKR1B1) Ameliorate Hyperglycemia Mediated and 6-OHDA-induced Neurotoxicity in PC12 Cells: *In Vitro* Hyperglycemic Parkinson's Disease Model. **(Sözlü Sunum)** (OP-52) The Fifth International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences (ISPBS-5) 26-28 April 2019, Cappadoica-Turkey.
8. **Elmazoglu Z**, Aydın Bek Z, Goker B, Aytekin CN, Bitik B, Karasu C. Effects of Quercetin on Oxidative and inflammatory Stress Pathways in Human Osteoarthritic Chondrocytes. **(Poster Sunumu)** (PP-27) The Fifth International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences (ISPBS-5) 26-28 April 2019, Cappadoica-Turkey.
9. Aydın Bek Z, **Elmazoglu Z**, Goker B, Bitik B, Aytekin CN, Karasu C. Icariin Inhibits Inflammatory Degeneration in Human Osteoarthritic Chondrocytes via Modulation of Redox Stress-induced Pathways. **(Poster Sunumu)** (PP-28) The Fifth International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences (ISPBS-5) 26-28 April 2019, Cappadoica-Turkey.
10. **Elmazoglu Z**, Reihanifar T, Kovacikova L, Stefek M, Ceylan Isık A, Karasu C. Novel Aldo-Keto Reductase inhibitors Give Rise To Have A Great Potential on Regulating Hyperglycemia Exacerbated A β 1-42 Neurotoxicity in Primary Hippocampal Neurons. **(Poster Sunumu)** (PP-29) The Fifth International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences (ISPBS-5) 26-28 April 2019, Cappadoica-Turkey.

11. **Elmazoglu Z**, Rangel-López E, Santamaria A, Karasu C. Endogenous Cannabinoids Exerts Neuroprotective Functions against A β 1-42- Mediated injury in Hippocampal Neurons Under Hyperglycemic Conditions. **(Poster Sunumu)** (PP-30) The Fifth International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences (ISPBS-5) 26-28 April 2019, Cappadoica-Turkey.
12. **Elmazoglu Z**, Rangel-López E, Santamaria A, Karasu C. The Synthetic Cannabinoid, CP 55,940, Has A Potential Redox Modulatory Effect on A β 1-42-Mediated Injury in High Glucose-induced Neurotoxicity in Hippocampal Neurons. **(Poster Sunumu)** (PP-31) The Fifth International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences (ISPBS-5) 26-28 April 2019, Cappadoica-Turkey.
13. **Elmazoglu Z**, Rangel-López E, Santamaria A, Karasu C. Neuroprotective Effects of Active Phytoconstituents Against A β 1-42 - Mediated Injury in High Glucose-Induced Primary Hippocampal Neurotoxicity: *In Vitro* Hyperglycemic Alzheimer's Disease Model. **(Sözlü Sunum)** (OP-31) The Fifth International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants (MESMAP-5) 24-26 April 2019, Cappadocia-Turkey.
14. **Aydın Bek Z, Elmazoglu Z**, Goker B, Bitik B, Aytekin CN, Karasu C. Therapeutic Potential of Olive Leaf Polyphenols (ZeyEX®) in Human Osteoarthritic Chondrocytes *In Vitro*. **(Sözlü Sunum)** (OP-80) The Fifth International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants (MESMAP-5) 24-26 April 2019, Cappadocia-Turkey.
15. **Aydın Bek Z, Elmazoglu Z**, Goker B, Bitik B, Aytekin CN, Karasu C. Effects of Mulberry (*Morus alba* L.) Leaf Extract (Immunflex®) on MMP-9, BMP-2 and COMP in Human Osteoarthritic Chondrocytes *In Vitro*. **(Poster Sunumu)** (PP-45) The Fifth International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants (MESMAP-5) 24-26 April 2019, Cappadocia-Turkey.
16. **Elmazoglu Z**, Inan Z, Keskin C, Bozkurt Z, Calis I, Karasu C. Astragaloside IV and Forsythoside B Modulate Hyperglycemia-Mediated Neurotoxicity in Primary Hippocampal Neuronal Cells. **(Poster Sunumu)** (PP-46) The Fifth International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants (MESMAP-5), 24-26 April 2019, Cappadocia-Turkey.
17. **Goker B, Elmazoglu Z**, Bitik B, Aytekin CN, Karasu C. Luteolin Modulates Glyco-Lipo-Oxidative Protein Modifications and Inhibits Inflammatory Cytokine Release in Human Osteoarthritic Articular Chondrocytes: Comparison with Colchicine **(Poster Sunumu)** Arthritis Rheumatol 2018; 70 (suppl 10), ACR/ARHP Annual Meeting, 19-24 October 2018, Chicago, USA

18. **Elmazoglu Z**, Colakoglu M, Banerjee S, Bitik B, Aktekin CN, Goker B, Karasu C. AB0090 Verbascoside and hydroxytyrosol downregulate stress-related pathways in human osteoarthritic articular chondrocytes. **(Poster Sunumu)** Annals of the Rheumatic Diseases 2018;77:1241. European Congress of Rheumatology (EULAR), 13-16 June 2018, Amsterdam-Netherlands.

19. Yarayıcı S, **Elmazoğlu Z**, Yar Sağlam AS, Stefek M, Karasu C. Effects of a Novel Carboxymethylated Mercaptotriazinoindole Inhibitor of Aldo-Keto Reductase in in vitro Glucolipotoxicity model for Hippocampal Neurodegeneration. **(Sözlü Sunum)** FD 2017: The 67th Czech and Slovak Pharmacological Days. Programme & abstracts. Interdisciplinary toxicology. - Bratislava: Slovak Toxicology Society SETOX: Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology SAS, 2017, vol. 10, suppl. 2, p. 53. 2-4 October 2017. The 67th Czech and Slovak Pharmacological Days, Stara Lesna-Slovakia.

20. **Elmazoglu Z**, Karasu C. Protective Effects of Olive Polyphenols Against Neurotoxin-Induced cellular Model of Parkinson's Disease. **(Sözlü Sunum)** FD 2017: The 67th Czech and Slovak Pharmacological Days. Programme & abstracts. Interdisciplinary toxicology. - Bratislava: Slovak Toxicology Society SETOX: Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology SAS, 2017, vol. 10, suppl. 2, p. 22. 2-4 October 2017. The 67th Czech and Slovak Pharmacological Days, Stara Lesna-Slovakia.

21. **Elmazoglu Z**, Yarayici S, Aydın Bek Z, Aktekin CN, Bitik B, Goker B, Karasu C. Targeting Oxidative Degeneration by Redox Modulating Phytoconstituents in Osteoarthritic Articular Chondrocyte Cultures. **(Poster Sunumu)** FD 2017: The 67th Czech and Slovak Pharmacological Days. Programme & abstracts. Interdisciplinary toxicology. - Bratislava: Slovak Toxicology Society SETOX: Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology SAS, 2017, vol. 10, suppl. 2, p. 30. 2-4 October 2017, The 67th Czech and Slovak Pharmacological Days, Stara Lesna-Slovakia.

22. **Elmazoglu Z**, Yarayici S, Aktekin CN, Bitik B, Goker B, Karasu C. Targeting Redox Signaling by Phytophenols in Condocytes Isolated from Human Osteoarthritic Articular Cartilage *in vitro*. **(Poster Sunumu)** The NutRedOx COST Action CA16112 & the 6th NutriOx Atelier, , P13, Page 11. 27-29 September 2017, Strasbourg-France.

23. Derici MK, Saglam ASY, Kayhan H, **Elmazoglu Z**, Yilmaz ED, Yilmaz A. Effects of the Lanosterol Synthase Inhibition on Apoptosis and PI3K/AKT Signaling Pathway in HeLa Cells **(Poster Sunumu)** 1st International Congress on Cancer and Ion Channels, 21-23 September 2017, SanliUrfa-Turkey.
24. Saglam ASY, **Elmazoglu Z**, Kayhan H, Onen HI, Yilmaz A, Menevse ES. The Effects of Sequential Administration of EF24 with Docetaxel Apoptotic Response in Metastatic Breast Cancer Cell Line. **(Sözlü Sunum)** VI International Congress of Molecular Medicine, 22-25 May 2017, Istanbul-Turkey.
25. Yildirim EF, Saglam ASY, **Elmazoglu Z**, Kayhan H, Onen HI. Apoptotic Effect of Anacardic Acid and Farnesyl Transferase Inhibitor on Metastatic Breast Cancer Cell Line (MCF-7). **(Sözlü Sunum)** VI International Congress of Molecular Medicine. 22- 25th May 2017, Istanbul-Turkey.
26. **Elmazoglu Z**, Gurkan-Alp AS, Buyukbingol E. Synthesis of some novel *N*-substituted farnesylthiosalicylamide derivatives, **(Poster Sunumu)** 4th European Conference on Chemistry for Life Sciences (4ECCLS), 192 pp. (P50). Budapest, Hungary, 31 August - 3 September 2011.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1. **Elmazoglu Z**, Kovacikova L, Prnova MS, Stefek M, Santamaria A, Karasu C. Cemtirestat Ameliorates A β 1-42 -Mediated Injury in High Glucose-Induced Neuronal Injury: Type 3 Diabetes *in vitro* Model. **(Sözlü Sunum)** TÜRK FARMAKOLOJİ DERNEĞİ 25. ULUSAL FARMAKOLOJİ KONGRESİ 9. Klinik Farmakoloji Sempozyumu 8. Klinik Toksikoloji Sempozyumu, 3-7 Kasım 2019, Kuşadası-Türkiye.
2. **Elmazoglu Z**, Ceylan FA, Saribas GS, Kovacikova L, Prnova MS, Stefek M, Kaleci B, Dagistanli F, Ozogul C, Karasu C. Effects of Cemtirestat on Oxidative Stress and Tissue injury in a Rat Model of Diabetes Induced by High Fructose Diet and Streptozotocin: A Comperative Study with Stobadine and Epalrestat. **(Sözlü Sunum)** TÜRK FARMAKOLOJİ DERNEĞİ 25. ULUSAL FARMAKOLOJİ KONGRESİ 9. Klinik Farmakoloji Sempozyumu 8. Klinik Toksikoloji Sempozyumu, 3-7 Kasım 2019, Kuşadası-Türkiye.

3. BEK ZA, **Elmazoglu Z**, Göker B, Bitik B, Aktekin CN, Tezcan ME, Karasu C Dut Yaprağı (*Morus alba L.*) Standart Ekstresinin (ImmunFLEX®) ve Major Biyoaktif Komponentlerinden Deoksinojirimisin'in İnsan Osteoartritik Primer Kondrositler Üzerine Etkileri, *in vitro* **(Poster Sunumu)** TÜRK FARMAKOLOJİ DERNEĞİ 25. ULUSAL FARMAKOLOJİ KONGRESİ 9. Klinik Farmakoloji Sempozyumu 8. Klinik Toksikoloji Sempozyumu, 3-7 Kasım 2019, Kuşadası-Türkiye.
4. **Elmazoglu Z**, Kovacikova L, Prnova MS, Stefek M, Karasu C. Novel Aldose Reductase Inhibitors, CMTI and COTI, Prevent 6-OHDA-Induced Cellular Neurotoxicity via Modulation of Redox Stress and Inflammation Pathways. **(Sözlü Sunum)** TÜRK FARMAKOLOJİ DERNEĞİ 25. ULUSAL FARMAKOLOJİ KONGRESİ 9. Klinik Farmakoloji Sempozyumu 8. Klinik Toksikoloji Sempozyumu, 3-7 Kasım 2019, Kuşadası-Türkiye.
5. **Elmazoglu Z**, Bek ZA, Göker B, Aktekin CN, Bitik B, Karasu C. Osteoartritik İnsan Kondrositlerinde, Oleuropein ve Zeytin Yaprağı Polifenolik Bileşiklerinin (ZeyEX ®) Kondroprotektif Etkileri **(Poster Sunumu)** Ankara Romatoloji Toplantısı, 5-7 Nisan 2019, Nevsehir-Türkiye.
6. Saglam ASY, **Elmazoglu Z**, Guney S, Onen HI, Seymen CM, Kaplanoglu GT, Karasu C, Menevse ES. The effect of PSD-95 inhibitor on neuroprotection, learning and memory functions in amyloid beta peptide 1-42 induced experimental Alzheimer model. **(Sözlü Sunum)** XV. National Congress of Medical Biology and Genetics, 26-29 October 2017, 26-29 October 2017, Fethiye-Turkey.
7. Karasu Ç, Ergün ŞB, Sarıbaş S, Yarayıcı S, **Elmazoğlu Z**, Özoğul C, Kemer ÖE. Blefarite Karşı Geliştirilmiş Kozmetik Temizleme Jellerinde Etkinlik Ve Güvenlilik Değerlendirmeleri İçin Klinik Araştırmalar **(Sözlü Sunum)** 1. Uluslararası Kozmetik Kongresi, 26-28 October 2017; Antalya-Turkey.
8. Seymen CM, Celal I, Erdoğan D, Elmas Ç, Saglam ASY, **Elmazoglu Z**, Aral BS, Kaplanoğlu GK. Investigation the effects of chronic mobile phone radiation and melatonin used for protection purpose on the brain by using different methods. **(Sözlü Sunum)** 14. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 26-29 May 2016. An International Journal of Experimental and Clinical Anatomy 10 (Suppl) May 2016. 14. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 26-29 May 2016, Ankara-Turkey.

Kongre ve Sertifikalar

1. Türk Farmakoloji Derneği 25. Ulusal Farmakoloji Kongresi 9. Klinik Farmakoloji Sempozyumu 8. Klinik Toksikoloji Sempozyumu, 3-7 Kasım 2019, Kuşadası-Türkiye
2. The Fifth International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences (ISPBS-5) 26-28 April 2019, Cappadoica-Turkey.
3. The Fifth International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants (MESMAP-5) 24-26 April 2019, Cappadocia-Turkey
4. “RS-G4 Confocal Microscopy Course”, MAVIG Research, Gazi University School of Medicine, Department of Anatomy, 27-28 February 2019, Ankara-Turkey
5. “Commet Assay Course”, The NutRedOx COST Action CA16112 and MAESTRO Project (2014/14/A/ST4/00640), 5-7 February 2019, Gdansk University of Technology, Poland
6. The 67th Czech and Slovak Pharmacological Days. 2-4 October 2017, Stará Lesná-Slovakia
7. 3. ODTU Sınır Bilim Günleri, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, 6-7 May 2017, Ankara-Türkiye.
8. 2. ODTU Sınır Bilim Günü, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, 24 April 2016, Ankara- Türkiye.
9. “XIIth Laboratory Animal Practice & Ethics Course”, Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee, 10-20 December 2012, Ankara- Turkey.
10. 10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-10), Ankara University Faculty of Pharmacy, 26-29 June 2012 , Ankara-Turkey.

Ödüller

1. “Best Oral Presentation” Award, The 5th International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants & The 5th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences Joint Meeting, **(Ödül)** 24-28 April 2019, Cappadocia-Turkey
2. Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) and The National Council of Science and Technology (CONACYT) Joint Project entitled “Targeting cannabinoid receptor signalling in inflammatory neurodegeneration: a potential role for redox-mediated pathways” 2552- TUBITAK-CONACYT, Grant No: 315S088, **(Burs)** 2017-



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKDIR..

