



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



SIÇANLARDA ALCL₃ İLE OLUŞTURULAN ALZHEIMER MODELİNDE EVOO, ROZMARİNİK ASİT VE DONEPEZİL'İN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

SEVİM KANDİŞ

**FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Levent ALTINTAŞ**

**ANKARA
2020**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIÇANLARDA ALCL₃ İLE OLUŞTURULAN
ALZHEIMER MODELİNDE EVOO, ROZMARİNİK ASİT VE
DONEPEZİL'İN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

SEVİM KANDİŞ

**FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Levent ALTINTAŞ**

**ANKARA
2020**

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Sıçanlarda $AlCl_3$ ile Oluşturulan Alzheimer Modelinde EVOO, Rozmarinik asit ve Donepezil'in Etkilerinin Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Sevim KANDİŞ

Tarih:

İmza:

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xii
1.GİRİŞ	1
1.1. Kognisyon ve Kongitif Disfonkisyon Sendromu	1
1.2. AH ve KDS Patolojisi	4
1.3. AH’nda Deney Hayvanı Modelleri	7
1.3.1. Kolinerjik Hasar Oluşturulan Modeller	8
1.3.2. Beta-Amiloidin Nörotoksik Özelliklerine Dayalı Modeller	9
1.3.3. Streptozotosin Nörotoksitesine Dayalı Modeller	10
1.3.4. Bakteriyel Endotoksin Toksisitesine Dayalı Modeller	10
1.3.5. Hızlı Yaşlanan Kemirgen Modelleri	11
1.3.6. Transjenik Modeller	12
1.3.7. Alüminyum Klorür (AlCl ₃) ile Oluşturulan Modeller	13
1.4. Donepezil	14
1.5. Extra virgin zeytinyağı (EVOO)	16
1.6. Rozmarinik Asit (RA)	18
1.7. Çalışmanın Amacı	18
2. GEREÇ VE YÖNTEM	20
2.1. Gereç	20
2.2. Yöntem	21
2.2.1. Hayvan Seçimi	21
2.2.2. Davranış Deneyleri	22

2.2.3. Sakrifikasyon ve Doku Ayrımı	26
2.2.4. Biyokimyasal Analizler	26
2.2.4.1. Serum ve Doku Homejenatlarının Hazırlanması	26
2.2.4.2. AchE Enzim Aktivitesi Ölçümü	27
2.2.4.3. LDH Enzim Aktivitesi Ölçümü	27
2.2.4.4. Malondialdehit (MDA) Ölçümü	28
2.2.4.5. A β -42 Precursor Protein Ölçümü	29
2.2.4.6. Kortikosteron Ölçümü	30
2.2.5. Histolojik Analizler	31
2.5.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü	31
2.5.2. Congo Red Boyama Protokolü	32
2.2.6. Verilerin Değerlendirilmesi	32
3. BULGULAR	33
3.1. İzlem Sonuçları	34
3.2. Davranış Testi Sonuçları	36
3.3. Biyokimyasal Analiz Sonuçları	51
3.4. Histopatoloji Analiz Sonuçları	58
4. TARTIŞMA	62
4.1. İzlem Sonuçları	62
4.2. Davranış Testi	64
4.3. Biyokimyasal Bulgular	68
4.4. Histopatolojik Bulgular	72
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	74
ÖZET	75
SUMMARY	77
KAYNAKLAR	79
EKLER	101
Ek 1. Etik Onay	101
ÖZGEÇMİŞ	102

ÖNSÖZ

Günümüzde canlıların yaşam kalitesi ve refahı düşünüldüğünde, bu alanda belki de en önemli sorunlardan birini, yaşa bağlı olarak açığa çıkabilen kognitif rahatsızlıklar oluşturur. Bu tür durumlarda uygulanabilecek tam etkili bir tedavi seçeneği maalesef yoktur. Kullanılan ilaçlar da oldukça sınırlı ve ancak semptomatik düzeydedir. İnsanlarda Alzheimer Hastalığı'na ve köpeklerde görülen, patolojileri ve hastalık seyri birbirine oldukça benzeyen Konginif Disfonksiyon Sendromu'na karşı etkili bir tedavi seçeneğinin olmaması, hastalıktan korunmayı daha da önemli bir hale getirmiştir. Bu tür kognitif rahatsızlıklara karşı özellikle oksidatif strese yönelik olarak canlının diyetinin yeniden düzenlenmesi, gerek korunmada gerekse semptomatik tedavi amacıyla önemli seçenekler arasındadır. Günlük yaşamda kullanımı kaçınılmaz olan bitkisel yağların seçiminde; bu yönde olumlu etki gösterenlerin kullanımda ön plana çıkarılması, bu tür rahatsızlıklara karşı alınabilecek önlemler arasında etkili bir seçenek olacağı düşünülmektedir. Bu noktadan hareketle bu tez çalışmasında; bitkisel yağlar içerisinde içerdiği fenolik maddeler ve diğer antioksidan maddeler ile ön plana çıkan ve ayrı bir öneme sahip olan Extra-virgin zeytinyağının ve yine bitkilerde bulunan ve kognisyon üzerine olumlu etkilerinin olduğu bildirilen rozmarinik asitin, deneysel olarak oluşturulacak olan AH modelindeki etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Oluşabileceği öngörülen bu olumlu etkilerin karşılaştırılması için de hastalığa karşı şu an için semptomatik tedavide en sık kullanılan ilaçlardan biri olan donezepil referans olarak seçilmiştir. Çalışma sonucundan elde edilen veriler ışığında; ilerleyen zamanlarda gerek insan gerekse hayvanlarda özellikle yaşa bağlı olarak gelişen bu tür kognitif bozukluklara karşı diyetle alınabilecek önlemler ve hastalığın semptomatik tedavisinde ilaç olarak bu maddelerin kullanımına yönelik yeni çalışmaların da önü açılacaktır.

Bu tez çalışmasında, çalışma planlamasının ilk gününden itibaren sabır ve anlayışla desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen başta kıymetli tez danışmanım Doç.Dr. Levent ALTINTAŞ olmak üzere, İzmir'deki hayatımın her aşamasında yanımda olan, varlığını ve güvenini en zor zamanlarımda dahi hissettirerek yol gösteren kıymetli hocam Prof.Dr. Nazan Uysal HARZADIN'a, tez izleme komitemde yer alan Prof.Dr. Ender YARSAN ve Doç.Dr. Yasemin Salgırlı DEMİRBAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Eğitimim ve tez çalışmam

boyunca bilgi ve donanımlarından yararlandığım; Doç.Dr. Mehmet ATEŞ, Öğr.Gör.Dr. Servet KIZILDAĞ, Dr.Öğr.Üyesi Fatma ŞİMŞEK, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine, her ihtiyacım olduğunda kapılarını çekinmeden çalabildiğim ve yardımlarını esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşlarım Dr. Güven GÜVENDİ, Uzm. Psikolog Pınar YİĞİT, Uzm.Dr. Birsu Topçugil KIRIK ve Dr. Başar KOÇ'a, bölümümüzde her zaman hepimizin yardımına koşan ağabeyimiz Ferhan ORAL'a çok teşekkür ederim.

Berber büyüdüğümüz, hem hayatı hem hekimliği düşe kalka birlikte deneyimlediğimiz ve öğrendiğimiz canım meslektaşlarım ve dostlarım; Dr. Sedat SEVİN, Dr.Vet.Hek. Gizem TEZ, Dr.Vet.Hek. Eylül AKPINAR, Uzm.Vet.Hek Yengi KULE, Vet.Hek. Yenal AKKURT, Vet.Hek. Başar KARA, Vet.Hek. Mehmet ARSLAN'A çok teşekkür ederim.

Hayatımda olduğu için çok şanslı hissettiğim, her sıkıntımı ve mutluluğumu ilk paylaştığım kişi olan, yol arkadaşım Aslı UYSAL'a; hayatın en zor ve en keyifli zamanlarında sırtımı yaslamaktan çekinmediğim, her koşulda anlayışı ve sabrıyla desteğim olan Hüseyin SEVER'e çok teşekkür ederim. Çok ani kaybettiğim, ama hayatımda olduğu her saniyeyi güzelleştiren ve beni her koşulda güldüren, mutlu eden biricik kızım Kokoş, sana da çok teşekkür ederim. Seninle geçirdiğim zamanlar hayatımın en güzel zamanlarıydı.

En büyük teşekkürü, her zaman yanımda olduklarından emin olduğum, verdiğim her kararı, attığım her adımı tüm yürekleriyle destekleyen canım babam İbrahim KANDİŞ ve canım annem Hatice KANDİŞ'e etmek isterim. İyi ki varsınız.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AH	Alzheimer hastalığı
KDS	Kognitif Disfonksiyon Sendromu
A β	Amiloid beta
MAP	Mikrotübül asosiye proteinler
NFY	Nörofibriler yumak
APP	Amiloid prekürsör protein
BOS	Beyin omurilik sıvısı
A β -42	Amiloid beta 42
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
ACh	Asetilkolin
AChE	Aetilkolin esteraz enzimi
ChAT	Kolinasetil transferaz enzim
RNA	Ribo Nükleik asit
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
LPS	Bakteriyel liposakkarit
MS	Multiple skleroz
Al	Alüminyum
AlCl ₃	Alüminyum klorid
PST	Pasif sakınma testi
MWMT	Morris Water Maze testi
YALT	Yükseltilmiş artı labirent testi
AAT	Açık Alan Testi

AChEI	Asetilkolin esteraz enzim inhibitörü
FDA	Food and Drug Administration
EVOO	Extra Virgin Olive Oil
ROS	Reaktif oksijen türleri
NOS	Reaktif nitrojen türleri
GR	Glutasyon redüktaz
RA	Rozmarinik asit
FTS	Fizyolojik tuzlu su
LDH	Laktat dehidrojenaz
MDA	Malondialdehit
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
CORT	Kortikosteron
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
ANOVA	Varyans analizi
sAppbeta	Beta amiloid prekürsör protein
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
HPA	Hipotalamo-hipofiz-adrenal nöroendokrin aks
ETZ	Elektron taşıma zinciri
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
FADH2	Flavin Adenin Dinükleotit
PDK1	Piruvat dehidrojenaz kinaz izoenzim 1

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Morris Water Maze düzeneği	23
Şekil 2.2. Açık alan testi düzeneği	24
Şekil 2.3. Yükseltilmiş artı labirent testi düzeneği	25
Şekil 2.4. Motor performans testi düzeneği	25
Şekil 3.1. Grupların deney öncesi ve sonrası ağırlık değişimleri	34
Şekil 3.2. Grupların rölatif adrenal ağırlıkları	35
Şekil 3.3. Grupların rölatif timus ağırlıkları	35
Şekil 3.4. Açık alan testinde katedilen toplam mesafe	36
Şekil 3.5. Açık alan testinde orta alanda geçirilen süre	36
Şekil 3.6. Açık alan testinde kenar alanlarda geçirilen süre	37
Şekil 3.7. Açık alan testinde ortalama hızlar	37
Şekil 3.8. Yükseltilmiş artı labirent testinde katedilen toplam mesafe	38
Şekil 3.9. Yükseltilmiş artı labirent testinde ortalama hız	38
Şekil 3.10. Yükseltilmiş artı labirent testinde açık kollarda geçirilen toplam süre	39
Şekil 3.11. Yükseltilmiş artı labirent testinde kapalı kollarda geçirilen toplam süre	39
Şekil 3.12. Yükseltilmiş artı labirent testinde ortak alanda geçirilen toplam süre	40
Şekil 3.13. Motor performans testinde 16 rpm hızda toplam yürüme mesafesi	41
Şekil 3.14. Motor performans testinde 20 rpm hızda toplam yürüme mesafesi	41
Şekil 3.15. Motor performans testinde 26 rpm hızda toplam yürüme mesafesi	42
Şekil 3.16. Motor performans testinde 30 rpm hızda toplam yürüme mesafesi	42
Şekil 3.17. Morris water maze testinde deneyin ilk 4.gününde yüzme hızları	43
Şekil 3.18. Morris Water Maze testinin ilk 4 gününde platform bulma süreleri	45
Şekil 3.19. Morris water maze testinin ilk 4 gününde yüzme mesafeleri	46
Şekil 3.20. Morris water maze testinde ilk 4 gününde kenar alanlarda geçirilen zaman	47
Şekil 3.21. Morris water maze testinin 5.gününde platformun bulunduğu alanda geçirilen süre	49
Şekil 3.22. Morris water maze testinin 5.gününde diğer alanlarda geçirilen süre	49
Şekil 3.23. Morris water maze testinin 5.gününde yüzme mesafeleri	50

Şekil 3.24. Morris water maze testinin 5.gününde yüzme hızları	50
Şekil 3.25. Morris water maze testinin 5.gününde kenar alanlarda geçirilen süre	51
Şekil 3.26. Prefrontal korteks MDA düzeyleri	52
Şekil 3.27. Prefrontal korteks sAppbeta protein düzeyleri	52
Şekil 3.28. Prefrontal korteks LDH enzim düzeyleri	53
Şekil 3.29. Prefrontal korteks pseudokolinesteraz enzim düzeyleri	53
Şekil 3.30. Hipokampus MDA düzeyleri	54
Şekil 3.31. Hipokampus sAppbeta protein düzeyleri	54
Şekil 3.32. Hipokampus LDH enzim düzeyleri.	55
Şekil 3.33. Hipokampus pseudokolinesteraz enzim düzeyleri	55
Şekil 3.34. Serum kortikosteron düzeyleri	56
Şekil 3.35. Serum MDA düzeyleri	56
Şekil 3.36. Serum sAppbeta protein düzeyleri	57
Şekil 3.37. Serum pesudokolinesteraz enzim düzeyleri	57
Şekil 3.38. Serum LDH enzim düzeyleri	58
Şekil 3.39. Prefrontal korteks Hematoksilen&Eozin boyama	59
Şekil 3.40. Hipokampus Hematoksilen&Eozin boyama	60
Şekil 3.41. Hipokampus Hematoksilen&Eozin boyama	61
Şekil 3.42. Hipokampus Congo Red boyama	61
Şekil 3.43. Prefrontal korteks Congo Red boyama	61

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. Sıçanların deney öncesi-sonrası ağırlık değişimleri, rölatif timüs ve adrenal ağırlıkları	35
Çizelge 3.2. Açık alan testi sonuçları	37
Çizelge 3.3. Yükseltilmiş artı labirent testi sonuçları	40
Çizelge 3.4. Rotarod Motor Performans Testi sonuçları	42
Çizelge 3.5. Water maze testinin ilk 4 gününde yüzme hızları (cm/sn)	44
Çizelge 3.6. Water maze testinin ilk 4 gününde platform bulma süreleri (sn)	48
Çizelge 3.7. Water maze testinin ilk 4 gününde yüzme mesafeleri (cm)	48
Çizelge 3.8. Water maze testinin ilk 4 gününde kenar alanlarda geçirilen zaman (sn)	48
Çizelge 3.9. Morris Water Maze testinin 5.gün sonuçları	51
Çizelge 3.10: Prefrontal korteks biyokimya analiz sonuçları	53
Çizelge 3.11: Hipokampus biyokimya analiz sonuçları	55
Çizelge 3. 12: Serum biyokimya analiz sonuçları	58

1. GİRİŞ

Günümüzde canlıların yaşam kalitesi ve refahı düşünüldüğünde, bu alanda belki de en önemli sorunlardan birini, yaşa bağlı olarak açığa çıkabilen kognitif rahatsızlıklar oluşturur. Bu tür durumlarda uygulanabilecek tam etkili bir tedavi seçeneği maalesef yoktur. Kullanılan ilaçlar da oldukça sınırlı ve ancak semptomatik düzeydedir. Ayrıca; bu maddelerin kortikohippokampal bağımlı öğrenme, kognisyon ve hafıza hasarı, oksidatif redoks bozukluğuyla oluşan motor ve araştırma davranışı bozukluğu, anksiyete şiddetine etkileri ve terapötik potansiyelleri üzerine yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile sıçanlarda $AlCl_3$ ile oluşturulan Alzheimer hastalığı modelinde, dejeneratif bozukluklarda EVOO, rozmarinik asit ve donepezilin davranışsal paradigmlar üzerine etkileri ve sıçanlarının prefrontal korteks ve hippocampusunda, uygulanacak maddelerin terapötik etkileri araştırılmıştır.

1.1. Kognisyon ve Kognitif Disfonksiyon Sendromu

Kognisyon (bilis); farkındalık, öğrenme, hafıza ve karar verme gibi zihinsel süreçleri ifade eden ve canlıların çevre hakkında bilgi almasına, işlemlemesine, korumasına ve nasıl davranacağına ilişkin kararlar almasına olanak sağlayan bir yetidir. Bu yetinin kaybedilmesine veya zayıflamasına neden olabilecek durumlarda canlılarda davranış bozuklukları görülür ve memelilerin çoğunda yaşa bağlı olarak nöropatolojik değişiklikler gelişir. Bu durum; insanlarda Alzheimer Hastalığı (AH), hayvanlarda ise Kognitif Disfonksiyon Sendromu (KDS) olarak isimlendirilir (Bain ve ark., 2001). İnsanlarda yaşam kalitesinin düşmesine neden olan ve kademeli olarak bilişsel fonksiyonlarda bozulma görülen en yaygın nörodejenatif bozukluk Alzheimer hastalığıdır (Landsberg ve ark., 2012). İnsanlar, köpekler ve daha az olarak kedilerde beynin yaşlanmasında görülen nörodejenatif değişikliklerin paralellik gösterdiği kabul edilir ve bu nedenle de özellikle köpeklerde kognitif

disfonksiyon, Alzheimer hastalığının spontan modeli olarak kabul edilir (Landsberg ve ark., 2012).

Kognitif disfonksiyon sendromu; organ yetmezliği, enfeksiyon ya da neoplazi gibi medikal sorunların dışında kalan geriatrik davranışları tanımlar. Bu davranış değişiklikleri de genelde; biliş ve tanıma kaybı, ev ve tuvalet eğitimini kaybetme, disoryantasyon ve uyku-uyanıklık döngüsünde bozukluklar olmak üzere dört ana başlık altında toplanır. Bu belirtiler yaşlanma ile birlikte doğal olarak da karşılaşılan olgulardır (Dodman ve ark., 1998; Overall, 2000). Sekiz yaşından büyük köpeklerde görülen nörodavranışsal sendromlar genellikle kognitif disfonksiyon sendromu olarak tanımlanır. Özellikle serebral korteks ve hipokampuste ilerleyici nörodejeneratif değişikliklerle ve kognitif işlevlerde düşüşle karakterizedir (Landsberg ve ark., 2012). Köpeklerdeki kognitif disfonksiyonda insanlarda Alzheimer hastalığında olduğu gibi amiloid beta (A β) patolojisi, azalmış beyin volümü, nöron kaybı ve bozulmuş nöroenez görülür (Landsberg ve ark., 2012). Hayvan bakımındaki gelişmeler ve yeni besleme metodlarıyla birlikte artık pet hayvanlarının ömürleri uzamış, yaşam kaliteleri artmıştır; fakat ömrün uzamasıyla beraber, yaşlanmaya bağlı hastalıkların da görülme sıklığı artmıştır. Bunun sonucu olarak yakın zamanda yapılan çalışmalar yaşa bağlı hastalıkların tanı ve tedavisi üzerine yoğunlaşmıştır (Reid ve ark., 2000). Kognitif disfonksiyon sendromunun da Alzheimer hastalığına benzer şekilde henüz bilinen bir tedavisi yoktur. Bu nedenle değiştirilebilir risk faktörlerinin belirlenmesi ve önleyici stratejiler geliştirilmesi ciddi önem teşkil eder. Halen, kognitif disfonksiyon sendromunun risk faktörleri ile ilişkili sınırlı sayıda veri bulunmaktadır. İspanya’da yapılan bir çalışmada yaşlı köpeklerin cinsiyet, büyüklük, üreme durumu ve kognitif becerileri karşılaştırılmıştır (Azkona ve ark., 2009). Bu çalışmada dişi ve kısırlaştırılmış köpeklerin erkek ve kısır olmayan köpeklerden daha fazla risk taşıdığı bildirilmiştir. Ayrıca, ağırlık istatistiksel olarak tetikleyici faktör olarak anlamlı olmasa da; küçük ırk köpeklerde büyük ırk köpeklere göre bilişsel bozulma oranının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Azkona ve ark., 2009). Benzer şekilde başka bir çalışmada kısırlaştırılmayan erkek köpeklerin kısırlaştırılan köpeklere göre kognitif bozulma oranının daha az olduğu bildirilmiştir (Hart, 2001). Danimarka’da yapılan başka bir çalışmada ise; cinsiyetin

ya da ağırlığın kognitif bozulma ile korele olmadığı bildirilmiştir (Fast ve ark., 2013). Epidemiyolojik çalışmalar; 11-14 yaş aralığındaki köpeklerin %28-29,5'inde, 15 yaş ve üzeri köpeklerin %47,6-68'inde kognitif disfonksiyon sendromu görüldüğünü ortaya koymaktadır (Azkona ve ark., 2009; Neilson ve ark., 2001). Bazı araştırmalar köpeklerdeki kognitif bozulmanın yaygınlığını araştırmak için düzenlenmiş anket çalışmalarından da yararlanmıştır (Neilson ve ark., 2001; Osella ve ark., 2007). Bu çalışmalarda görülen prevalans tahminleri %22,5- %73,5 arasındayken, bu sonuçların önceden veteriner hekim tarafından teşhis konulan sonuçlar olmadığını da belirtmek gerekir. Örneğin bir çalışmada %75'inde kognitif disfonksiyon sendromu ile ilişkili davranış değişikliklerinin en az bir tanesi görülen köpeklerde, sahiplerinin sadece %12' sinin bu davranış değişikliklerini veteriner hekimlerine bildirdiği belirtilmiştir. Hayvan sahiplerinin büyük çoğunluğu, hayvanlarının yaşlanmaya bağlı davranış değişikliği gösterdiğine inanmayı reddeder (Landsberg ve ark., 2005).

Yaşlanmaya bağlı olarak gelişen davranış değişiklikleri, farklı bir çevre ya da medikal bir problemde değil; disfonksiyon sürecinin normal seyri olarak kendini gösterir. Bu süreçteki hayvanların, aile üyeleriyle geçirdiği zaman sıklığı ve kalitesi de düşer. Hatta bazı hayvanların aile üyelerini bile tanıyamadığı, bazılarının evin içinde kaybolduğu, yine bazılarının da daha önce doğru bir şekilde edinilen ev alışkanlıklarını unutabildiği bildirilmiştir. Bu süreçte ürinaryona bağlı problemler defekasyon kaynaklı problemlerden daha ciddi olarak kendini gösterir. Boşluğa bakıp kalma, köşede hareketsiz bekleme, yanlış kapıya ya da kapının yanlış tarafına yönelme, amaçsız dolaşma gibi davranışlar görülür. Bazı hayvanlar gündüz uyurken, gece uyanıklıktırlar. Hayvanlarda sızlanma, dolaşma, yerleri çizme gibi davranışlar görülebilir. Klinik belirti olarak; aşırı havlama ya da uluma, egzersiz intolerans, merdiven çıkma zorluğu, yön bulmada zorlanma, uyarılabilirlikte artış, sahip yokluğunda oluşan yeni korkular ve fobiler görülebilir. Bazı hayvanlar sahiplerine daha bağımlı bir hale gelir ve sahiplerini her yerde takip ederler (Frank, 2003). Aynı zamanda kognitif disfonksiyon sendromu olan köpeklerde mekansal öğrenme ve hafızayı ölçen testlerde önemli bir kognitif düşüş görüldüğü de rapor edilmiştir. Düzensiz lokomotor aktivite, artan amaçsız davranışların sıklığı, toplumsal

izolasyon, anksiyete de kognitif disfonksiyon sendromunun klinik belirtilerindendir (Rosado ve ark., 2012).

1.2. AH ve KDS Patolojisi

AH, demansın en sık görülen nöro-patolojik formudur ve beyinde çoğunlukla β -amiloid ($A\beta$) birikimiyle oluşan senil plak ve hiper-fosforile tau proteininin oluşturduğu nörofibriler yumak lezyonlarının görülmesi ile karakterizedir (Vinters, 2015). Tau 17. kromozom tarafından kodlanan mikrotübül asosiye proteinler (MAP) ailesinden bir proteindir. Mikrotübüllerin stabilizasyonu, hücre iskeletinin bütünlüğü ve aksonal transportta önemli rol alır. AH patogenezinde hiperaktif kinazlar ve/veya hipoaktif fosfatazlar tau proteininin hiperfosforilasyonuna yol açarak mikrotübüllere bağlanma yeteneğini bozar. Bağlanmamış fosforile tau çözölemeyen çift sarmallı filamanlara polimerize olur. Bunlar zaman içinde intranöronal nörofibriler yumaklar (NFY) haline gelir (Braak ve ark., 1991).

AH'ndaki ikinci temel nöropatolojik değişiklik olan amiloid plaklar, farklı morfolojik yapılarda olabilir; ancak ana bileşeni amiloid beta proteindir. $A\beta$ amiloid, 40-42 aminoasitten oluşan bir protein olup, daha büyük bir transmembran protein olan, 19. kromozomda kodlanan ve işlevi tam olarak anlaşılamamış bir transmembran protein olan amiloid prekürsör protein (APP)'den proteolitik yolla oluşur (Glennner ve ark., 1984; Masters ve ark., 1985). AH'nda klinik olarak ilerleyici bir biliş kaybı görülür. Bu durum, günlük aktiviteleri gerçekleştirmede güçlük çekme ile başlayarak, nihayetinde ölüme kadar ilerleyebilir (Nelson ve ark., 2009). Serebral amiloidozis, AH patogenezinin muhtemel başlangıcı olarak değerlendirilir. Plaklar çoğunlukla $A\beta$ -42 peptidlerinden oluşur. Bu peptidler canlıda agregasyon oluşturma eğilimine de neden olur (Bitan ve ark., 2003; Cole ve ark., 2008). Beyin omurilik sıvısında (BOS) $A\beta$ -42 nin azalması ve beyinde amiloid birikimi, belirgin demans semptomlarının ortaya çıkmasından yıllar öncesine dayanır (Karran ve ark., 2011). AH ilerleyici karakter gösteren bir hastalık olduğu için; hastalıkla mücadelede erken tedavi oldukça önemlidir. AH için risk faktörlerinin erken belirlenmesi, hastalığın

erken teşhisine ve dolayısıyla da başarılı tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlar (Sperling ve ark., 2011). AH, tıbbi bakım ve buna bağlı toplumsal maliyetlerde önemli zorluklar ortaya çıkarır. AH'nın prevalansı tüm dünyada yaşlanan nüfusun artışıyla birlikte dramatik bir şekilde artmaktadır, çünkü AH'nin primer risk faktörü yaşlılıktır (Frisoni ve ark., 2017). AH'nın biyobelirteçlerinin belirlenmesinde nörogörüntüleme sistemlerinin kullanılması merkezi bir rol oynar. En sık kullanılan nörogörüntüleme sistemlerinden biri, AH için beyin atrofisini tanımlayan manyetik rezonans görüntülemesidir (MRG) (Davatzikos ve ark., 2009). Hatta yakın zamanda yapılan araştırmalarda beyin atrofisinin (örneğin hipokampal bölgede) AH başlamadan 10 yıl öncesine kadar sağlıklı bireylerde bile tanımlanabileceğini göstermiştir (den Heijer ve ark., 2010; Dickerson ve ark., 2011).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda hayvanlardaki KDS ile AH patolojisi arasında benzerlikler olduğu bildirilmiştir. Yaşlı hayvanlardaki bilişsel bozukluklar kuvvetli bir şekilde β -amiloid birikimiyle ilişkilidir. Ventriküler genişleme ve vasküler değişiklikler insanlarda ve köpeklerde benzerdir (Cummings ve ark., 1996). Çoğu açıdan, köpeklerdeki bilişsel fonksiyonlar primatlarla karşılaştırılabilir düzeydedir. Özellikle sosyal kognisyon, insanlarda ve köpeklerde birbiriyle uyum içerisindedir (Hare ve ark., 2005). Ayrıca, insanların ve köpeklerin beslenme ihtiyaçları da benzerdir (Araujo ve ark., 2005).

Son zamanlarda insanlar ve köpeklerin ortak çevreyi ve yaşam tarzını paylaşması, benzer kirleticilere ve hastalık etkenlerine maruz kalması, yaşlanmaya bağlı olarak gelişen hastalıkların patolojilerinin de benzer şekilde ilerlemesine sebep olmuştur (Kaeberlein ve ark., 2016). Daha uzun yaşam süresi ve AH, obsesif kompulsif bozukluk ya da hiperaktivite gibi insanlarda da görülen birçok psikiyatrik hastalığın da görülmesi sebebiyle köpekler, hastalıkların altında yatan sebeplerin araştırılmasında geleneksel rodent modelleri ya da primat modellerinin önüne geçmiştir (Kaeberlein ve ark., 2016). Laboratuvarında Beagle ırkı köpeklerle yapılan kognisyon çalışmalarında, kognitif bozukluğun insanlarda olduğu gibi köpeklerde de beyinde senil plaklarda β -amiloid protein birikimiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, yaşa bağlı kognitif bozuklukların insanlarda ve köpeklerde benzer

nöropatolojiden kaynaklandığını gösterir (Adams ve ark., 2000). AH'nda daha ziyade A-amiloid alt tiplerinin birikimi olsa da, β -amiloid birikimi de görülür. Bununla birlikte nöron kaybı, hiperfosforile tau proteinlerinin çökmesi gibi histopatolojik belirtiler ise her iki vakada da görülür (Erik, 2004). Yine hayvanlarda da; AH benzer şekilde, yaşlanmayla birlikte serebral amiloid plaklar gelişmekte ve bu durum yaşa bağlı bilişsel işlev bozukluğunun doğal modeli olarak kullanılmaktadır (Cotman ve ark., 2008). Hayvanların beyin paransiminde amiloid depoları çoğunlukla diffuz plaklar olarak görülür ve bu plaklar insan beyinde görülenlerden daha büyüktür (Cummings ve ark., 1996).

İnsanlarda ve hayvanlarda amiloid protein öncüsü izoformları, proteazları ve A β bozulmasına yol açan enzimler arasında yakın bir benzerlik bulunur (Sarasa ve ark., 2010). Bu nedenlerden ötürü, A β izoformlarının profili ve serebrospinal sıvıdaki A β değişimleri insanlarda ve hayvanlarda karşılaştırılabilir durumdadır (Lu ve ark., 2013). Hayvanlarda beyinde ve BOS'ta görülen A β değişimleri, insanlardaki AH'nda görülen değişikliklerle benzerlik gösterir (A β -42 BOS'ta düşerken, beyinde biriken plak miktarı her iki vakada da artar) (Head ve ark., 2010). Yine hayvanlarda yaşa bağlı kognitif bozukluk şablonu ile insanlarda AH'nın erken döneminde görülen bozukluklar paralellik gösterir. Her ikisinde de kısa süreli çalışma belleği ve yürütücü fonksiyonlarda problemler görülür (Studzinski ve ark., 2006). Özellikle yaşlanma ile birlikte köpeklerin beyinde oluşacak değişiklikler; insanların yaşlanmasıyla birlikte beyinde görülen oluşumlara benzerdir. Buna ilişkin 1900'lerin başında benzer anormal nöron filizlenmesi gösterilmiştir (Lafora, 1914). 1950'li yıllara gelindiğinde araştırmacılar Alzheimer plak patolojisi olan A β proteini birikimini gözlemlemişlerdir (Osetowska, 1966). Yeni çalışmalarda ise, yaşlı köpek beyinde azalmış endojen antioksidan seviyesi, kortikal atrofi, miyelin dejenerasyonu ve protein birikimleri de incelenmiştir (Tapp ve ark., 2004). Yani, köpek beyinde yaşa bağlı olarak değişen β -amiloid patolojisi, kognitif fonksiyonlardaki değişiklikler ve in vivo AH belirteçleri; yaşlanan köpeğin AH'nın ilerlemesinin takibinde model olarak kullanılabileceğini gösterir (Borghys ve ark., 2017).

Bu benzerliklerin yanında hayvan ve insanlarda görülen kognitif bozuklukların patolojisinin örtüşmediği belirtiler de vardır. Alzheimer hastalarının beyinde hiperfosforile tau proteinin birikiminden kaynaklanan olgun nörofibril yumaklar gelişirken, hayvanlarda hiperfosforile tau bulunmasına rağmen, insanlarda görüldüğü gibi nörofibril yumaklar gözlenmez (Wegiel ve ark., 1998). A β plakları yaşlanan köpek beyinde diffuz plaklar oluşturacak şekilde çöker (Head ve ark., 1998). A β -42, A β 'lerin baskın türüdür, daha uzun ve daha toksiktir, sıralanımı insanlara benzer şekildedir (Cummings ve ark., 1996). Plakların birikimi bölge spesifiktir, prefrontal kortekste, entorinal, parietal ve oksipital bölgeye göre daha yoğun ve daha erken yaşta plak birikimi gözlenir ki bu insanlarda görülen patolojiyle de uyumludur (Head ve ark., 2000). A β plakları önce daha derin kortikal alanlarda birikirken, daha sonra yüzeysel kortikal tabakada birikim gösterir (Satou ve ark., 1997). İnsanlardan farklı olarak, köpek korteksinin 1. tabakasında A β birikimi gözlenmez; fakat her iki türde de hipokampusun dış moleküler tabakasında dağınık bant şeklinde görülür (Cotman ve ark., 2002).

KDS, insanlarda AH hastalığında olduğu gibi beyin hücrelerinin ve sinapsların geri dönüşümsüz kaybı nedeniyle şiddetli beyin atrofisi ile ilişkilidir (Borras ve ark., 1999; UCHIDA ve ark., 1991). Köpeklerde KDS'nun risk faktörleri henüz tam olarak çalışılmamış olsa da, insanlardaki demansa benzer şekilde oluştuğu varsayılır (Pan, 2013).

1.3. AH'nda Deney Hayvanı Modelleri

AH patolojisini anlamak ve ilaçların klinik öncesi testlerini yapabilmek için deneysel modeller oldukça önemlidir. Yakın zamana kadar deneysel modellerin büyük çoğunluğunu amiloid plakların birikmesine ya da nörofibriler yumakların oluşmasına sebep olan genlerle oluşturulan, insan genlerine benzetilmiş transjenik fareler oluşturmaktaydı (Boutajangout ve ark., 2014; Dujardin ve ark., 2015). *Drosophila melanogaster* ve *Caenorhabditis elegans* gibi omurgasız ve zebrafish gibi omurgalı modeller de AH patolojisi ve tedavisinin araştırılmasında kullanılsa da,

insan fizyolojisine uzaklıkları dikkate alındığında sıklıkla tercih edilmezler (Bouleau ve ark., 2015; Dujardin ve ark., 2015).

AH'nın genetik ve sporadik olmak üzere iki farklı patogenezi vardır. Kuşkusuz ki hiçbir model bu hastalığın kognitif, davranışsal, biyokimyasal ya da histopatolojik bulgularını tamamen karşılayamaz; fakat bununla birlikte hastalık modelleri bu hastalığın özellikle patolojik açıdan araştırılabilmesine de olanak sağlar (Gulyaeva ve ark., 2017). Sporadik AH modeli oluşturmak biraz daha zordur çünkü normal koşullarda deneysel araştırmalarda sıklıkla kullanılan fare ve sıçanlarda senil plaklar nadiren oluşur. Yine de yeni deneysel yaklaşımlarla deney hayvanlarında Alzheimer benzeri patoloji oluşturulmaya başlanmıştır (Gulyaeva ve ark., 2017).

1.3.1. Kolinerjik Hasar Oluşturulan Modeller

AH'nda nörodejeneratif değişiklikler öncelikle kognitif fonksiyonlarla ilişkili beyin bölgelerinde oluşur. Ön beyin bazal çekirdeğindeki dejenerasyon AH'nın erken evrelerinde kendini gösterir (Coyle ve ark., 1983; Winkler ve ark., 1998). Skopolamin gibi muskarinik asetilkolin reseptör antagonistlerinin enjeksiyonu ya da septo hipokampal bölgede magnoselüler bazal çekirdek tahribasyonu ile oluşturulan modellerde, hayvanlarda kolinerjik eksikliğe bağlı davranış değişiklikleri görülmüş; fakat AH'nın patomorfolojik karakteristik bulgusu olan amiloid plak ve nörofibriler yumak yapıları görülememiştir (McDonald ve ark., 1997). Kolinerjik eksiklik, asetilkolinin (ACh) kolinerjik nöronlardan sentezini ve salınımını etkileyen spesifik nörotoksinler kullanılarak da modellenenir. Kolinotoksin AF64A (etil kolin aziridinyum) uzun süreli kolinerjik hipofonksiyona neden olan ve septumun medial çekirdeğinde kolinerjik nöronların ölümüne sebep olan bir kolin analogudur (Chrobak ve ark., 1988; Lorens ve ark., 1991). Kolinerjik hipofonksiyon oluşturmada sıklıkla kullanılan bir diğer madde ise Immunglobulin 192 IgG saporin'dir. Bu toksin etkisini ribozom inaktivasyonu ile gösterir (Wiley ve ark., 1991). Bu toksinin

serebral ventriküllere enjeksiyonu, neokorteks ve hipokampustaki fonksiyonel parametreleri belirgin bir şekilde azaltır ve medial septal çekirdekte asetilkolin esteraz (AChE) ve kolinasetil transferaz enzim (ChAT) etkinliğini etkiler (Rossner ve ark., 1995; Waite ve ark., 1995). Hayvanlarda beyinde kolinerjik nörotransmisyonu bozan bir diğer yaklaşım kolinerjik çekirdeklerdeki ChAT kodlayan genlerin inaktivasyonudur. Diğer iki yaklaşımdan farklı olarak bu modelde hücre bütünlüğü bozulmaz. Bu modelde transjenik tekniklerin getirdiği kısıtlamalar olmadan etkileşimli RNA'ların kullanılmasıyla mediyatörlerin üretilmesi için gerekli olan protein sentezini azaltarak ChAT üretimi azaltılır (Santamaria ve ark., 2009).

1.3.2. Beta-Amiloidin Nörotoksik Özelliklerine Dayalı Modeller

Beta-amiloid, AH'nın patogenezinin ana oyuncusu olarak bilinir. Hem in vivo, hem de in vitro olarak nörotoksik özellik gösterir (Hardy, 2009). Farklı araştırmacıların çalışmalarında ve birçok yayında sentetik A β analoglarının kognitif bozukluk oluşturduğu bildirilmiştir (Gulyaeva ve ark., 2017; Gulyaeva ve ark., 2010). Hayvanlarda A β enjeksiyonundan sonra görülen hafıza ve öğrenmedeki bozukluklar, nörodejeneratif değişikliklerin gelişmesinden kaynaklanır. Sentetik bir A β analogu olan A β (25-35)'in sıçanlarda neokortekse ya da hipokampusa enjeksiyonu, enjeksiyon bölgesinde nöron kaybı ve gliosis sebebinin yanında, aynı zamanda locus coeruleus ve medial septum bölgelerinde de nörotransmitter seviyelerini etkiler (Chen ve ark., 1996; Stepanichev ve ark., 2003). Enjeksiyon sonrası yapılan histolojik çalışmalarda farelerde ve sıçanlarda frontoparietal kortekste ve hipokampusta ılımlı; fakat belirgin hücre kaybı ve ön beyin bazal çekirdeklerde dejeneratif değişiklikler görüldüğü bildirilmiştir (Delobette ve ark., 1997; Maurice ve ark., 1996). Kuşkusuz ki A β analoglarının serebral ventriküle enjeksiyonundan sonra görülen davranış değişiklikleri kolinerjik bozulmayla ilişkilidir. Hayvanlarla yapılan birçok çalışmada medial septal çekirdekte ChAT proteininde ve aktivitesinde azalma da gösterilmiştir (Stepanichev ve ark., 2014; Yamaguchi ve ark., 2001). Kümeleşen A β , mikrogliaları aktive eder ve amiloid

plakların etrafında birikmelerini indükler. Hastaların beyinde aktive olan mikroglialar plakların çevresinde yalnızca toplanmakla kalmaz, aynı zamanda fagosite eder ve buna proinflamatuvar sitokinler ve kemokinler de eşlik eder. Fagositoz aktivitesi sıçanlarla yapılan deneylerle de kanıtlanmıştır (Frautschy ve ark., 1992).

1.3.3. Streptozotosin Nörotoksisitesine Dayalı Modeller

Sıçanlara intraserebroventriküler olarak düşük dozda β -toksik ilaç olan streptozotosin uygulaması Alzheimer modeli olarak kullanılmaktadır (Salkovic-Petrisic ve ark., 2013). Bu hayvanlarda insülin direnci, glikoz hipometabolizması, ilerleyen kolinerjik eksiklik, oksidatif stres, nöroinflamasyon, nörodejenerasyon ve öğrenme bellekte bozulma görülür. Streptozotosinin oluşturduğu nörotoksisite in vitro olarak hücre kültürlerinde de gösterilmiştir. Bu madde sıçan serebellumunda granül nöronlarda kalsiyum homeostazisini ve mitokondri fonksiyonlarını bozar (Genrikhs ve ark., 2017). Streptozotosinin periventriküler bölgede ve dorsal hipokampusta mikrogliozisi ve astrgliozi reaktif ettiği ve hipokampal dentat girus ve subventriküler alanda nöronal kök hücrelerin proliferasyonunda azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir. Streptozotosin aynı zamanda yeni nöronların farklılaşması, olgunlaşması ve hayatta kalmasına da engel olarak, uzun ve kısa süreli hafızada bozulmalara da neden olduğu bildirilmiştir (Bassani ve ark., 2018).

1.3.4. Bakteriye Endotoksin Toksisitesine Dayalı Modeller

Bakteriyel liposakkaritlerin (LPS) nörotoksisiteleri çeşitli merkezi sinir sistemi patolojileri modellemede kullanılır. Literatürde sepsis ve nörodejeneratif hastalıklarla ilgili birçok çalışma mevcuttur. Son zamanlarda beyne LPS enjeksiyonundan sonra görülen kognitif bozuklukların sporadik AH'na özgü süreçleri yansıttığına dair bir

hipotez ortaya konmuştur (Zakaria ve ark., 2017). Kuşkusuz ki bu hipotez, LPS'nin deney hayvanlarının beyinde indüklediği nöroinflamasyonla ilişkilidir. Bununla birlikte, ne lezyonların lokasyonu ne de sonuçları sporadik AH'nın spesifik patogenezi olmamasına rağmen, bazı vakalarda medial septik bölgedeki immunreaktif hücrelerde ChAT azalması eşlik edebilir (Houdek ve ark., 2014). Beyinde farklı bölgelere LPS uygulaması, bu bölgelerde farklı hücrelerin ölümüyle sonuçlanır. Örneğin; Parkinson hastalığını modellemek için LPS, substansia nigraya (Arai ve ark., 2004); multiple skleroz (MS) modeli oluşturmak için ise LPS, beyaz cevhere enjekte edilir. Çünkü LPS beyaz cevherde demiyelinizasyona yol açar (Desai ve ark., 2016). Sonuç olarak LPS'nin hayvanların beyine enjekte edilmesi bir dereceye kadar sporadik AH modeli olarak kullanılabilir, çünkü gelişen nöroinflamatuvar hastalık spesifik değildir (Gulyaeva ve ark., 2017).

1.3.5. Hızlı Yaşlanan Kemirgen Modelleri

Yakın zamana kadar yalnızca P8 (SAMP8) fareleri sporadik AH modeli olarak kabul edilmiştir (Ito, 2013; Morley ve ark., 2012). Bu fareler beyinde amiloid öncü proteinin (APP) aşırı üretimi ve oksidatif hasarla ilişkili olarak oluşan spongiform nörodejenerasyonun spontan modelidir. SAMP8 fareleri hafıza kaybının erken belirtilerini gösterir, kan-beyin bariyerinde değişiklikler görülür ve bu durum A β 'nın beyinden çıkışının azalması ile sonuçlanır. Bu hayvanlarda oksidatif stresin erken gelişimi; mitokondriyal disfonksiyon ve A β 'nın aşırı birikimine sebep olur. A β 'nın aşırı birikimi mitokondriye daha fazla zarar verir. Araştırmacılar bunu “İnflamatuvar Amiloid Döngüsü” olarak adlandırır ve bu mekanizma AH'ndaki patofizyolojik değişikliklerden sorumlu mekanizmayla da benzer (Morley ve ark., 2012). Son yıllarda OXYS sıçanlarının da, AH'nın patogenetik ve klinik belirtilerini gösterdiği için, model olarak kullanılabileceği tartışılmaktadır (Kolosova ve ark., 2014). AH'nın erken formuna spesifik olan App, Psen1 ve Psen2 gen mutasyonlarının OXYS sıçanlarının genomunda bulunmaması, bu modelin de sporadik AH modeli olarak değerlendirilebileceğini düşündürür (Stefanova ve ark., 2014).

1.3.6. Transjenik Modeller

Transjenik AH modelleri, AH patolojisinde yer alan proteinleri kodlayan gen varyantlarının rastgele entegrasyonu ile elde edilen genetik modellerdir (Götz ve ark., 2018). Senil plakları ve A β nöropatisi ilişkili hayvan modelini oluşturmak için insan APP'sini eksprese eden (Quon ve ark., 1991), A β (LaFerla ve ark., 1995), APP'nin C-terminal parçası (Nalbantoglu ve ark., 1997), ailevi AH mutasyonlarını taşıyan APP genleri (Games ve ark., 1995) olan hayvan modelleri gibi birçok model üretilmiştir (Yamada ve ark., 2000). İnsan APP751'in aşırı eksprese edildiği transjenik fare modelinde, AH'nın erken histopatolojisinde görülen yaygın A-bantlarının birikimi ve anormal tau protein immunoreaktivitesi görülür (Higgins ve ark., 1994). Aynı zamanda davranışsal olarak water maze testinde spasyal öğrenmede bozukluklar ve Y-labirent testinde ani davranış değişiklikleri görüldüğü de belirtilmiştir (Moran ve ark., 1995).

AH'nın ilk transjenik hayvan modeli, APP V717F mutasyonunu kodlayan insan APP minigeninin fareye entegrasyonu ile elde edilmiş (PDAPP faresi) ve kapsamlı AH nöropatolojisi görülmüştür (Games ve ark., 1995). PDAPP farelerinde A β birikimi, nöritik plaklar, sinaptik kayıplar, astrositoz ve mikrogliozis oluşmuştur (Irizarry ve ark., 1997). Bu hayvanlarda ApoE (apolipoprotein E) geninin A β birikimindeki rolünü araştırmak için PDAPP fareleri, ApoE knockout farelerle çaprazlanmıştır. ApoE geninin yokluğunda APP ekspresyonu ya da A β formasyonu değişmeden A β birikimi belirgin bir şekilde azalmıştır ve bu sonuç ApoE varlığının amiloid birikiminde rolü olduğunu gösterir (Bales ve ark., 1997). Başka bir transjenik fare türü olan Tg2576 fareleri, genlerindeki çift mutasyondan dolayı aileden gelen kalıtsal AH modelini teşkil ederler. Amiloid plak birikimi ve spasyal öğrenme testlerinde yaşa bağlı bozukluklar görülür (Hsiao ve ark., 1995). Bu ve buna benzer birçok transjenik hayvan modeli, AH'nın patogenezi ve tedavisini araştırmak amacıyla kullanılır.

1.3.7. Alüminyum klorür (AlCl₃) ile Oluşturulan Modeller

Özellikle β -amiloid ve diğer proteinlerin proteolizini ve agregasyonunu teşvik eden ve AH patogenezinde önemli rol oynayan farklı moleküler oyuncular bulunur. Beyinde metal iyonu homeostazı, normal bilişsel performanslar için gereklidir ve metal iyonlarının serbestleşmesi nörodejenerasyonun oluşmasına sebep olan en önemli faktörlerden birisidir (Nelson, 1999). Alüminyum, bakır, çinko, kurşun, civa, demir gibi metaller nörotoksisiteye sebep olsa da; AH'nın nedeni ve gelişimi için en büyük risk faktörleri arasında alüminyum metalinin olduğu bildirilmiştir (Singla ve ark., 2014). Alüminyum (Al) beyine beslenme yoluyla, antiasitlerle, kozmetik ürünleriyle, diş macunlarıyla, parçacık yoluyla ve içme suyuyla ulaşmakta; hafıza ve kognisyonla sorumlu olan korteks, serebellum ve hippocampusta birikmektedir. Bu bölgelerde alüminyum, β -amiloid birikimi, oligomerizasyon, hiperfosforile tau yığılması, lipid peroksidasyonu, bozulmuş kalsiyum iyon değişimi ve apoptozis gibi AH patolojisiyle ilişkili bozuklukları meydana getirir (Enas, 2010). AH ve alüminyum arasındaki bağlantı hala tartışmalara sebep olsa da, deneysel olarak alüminyum maruziyetinin AH benzeri nöropatolojik değişiklikler ve kognitif bozukluklara neden olduğu gösterilmiştir (Shamasundar ve ark., 2006).

Sıçanlarda kronik AlCl₃ maruziyetinin, kontrol sıçanlarına kıyasla beyin AChE enzim aktivitesinde belirgin bir artış gösterdiği belirtilmiştir. Hücresel ve moleküler düzeyde AH; asetilkolin eksikliği, hücre dışı A β birikimleri, nörofibril yumaklar ve nöron kaybıyla karakterizedir (Kumar ve ark., 2009). Oksidatif stresi indükleyen alüminyumun, nöronları tahrip ederek A ve nörofibriler tubül proteinlerinin birikimini teşvik ettiği gösterilmiştir (Puzzo ve ark., 2015). Nöronal çevrede Al, sinaptik terminaller ve aksonlardaki endomoleküller ve organelleri ayrıştırarak önemli hücre içi iyonların fizyolojik işlevlerini bozmakta ve polipeptidlerin fosforilasyon ya da defosforilasyonunu engellemektedir (Cavallucci ve ark., 2013). Bu işlemler sonucunda Al mitokondrial fonksiyonları bozabilmekte ve endoplazmik retikulum stresine neden olmaktadır (Bernales ve ark., 2012; Selfridge ve ark., 2013).

AlCl₃ uygulamasının, sıçanlarda AH modeli olarak kullanılabileceği, yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. Oluşan AH modelinde kognitif bozuklukları değerlendirmek için ise; Pasif Sakınma Testi (PST), Morris Water Maze Testi (MWM), Yükseltmiş Artı Labirent Testi (YALT) ve Açık Alan Testi (AAT) gibi davranış ve öğrenme testleri kullanılır (Lakshmi ve ark., 2015; Mathiyazahan ve ark., 2015; Olajide ve ark., 2017). Literatürde oral gavaj yoluyla 15 gün AlCl₃ uygulamasından sonra kognitif bozukluğun olduğu ispatlandığı gibi (Olajide ve ark., 2017), uygulamanın daha uzun süre ile yapıldığı çalışmalar da mevcuttur (Lin ve ark., 2015).

1.4. Donepezil

Henüz günümüzde tam anlamıyla AH ya da KDS'yi tedavi edebilecek bir ilaç grubu ya da tedavi yöntemi malesef yoktur; ancak, hastalığa yakalanan canlıların refahını artırmaya yönelik olarak diyetle yapılacak düzenlemeler ile veya bazı ilaçlar ile tedavi programları uygulanır. İlaçla tedavide kullanılan ve sıklıkla tercih edilen gruplardan biri de asetilkolinesteraz enzim inhibitör (AChEI)'leridir. AChEI, enzimatik bozulmayı önleyerek etki göstermekte ve AH için birinci basamak tedavi seçeneği olarak görülmektedir. AChEI grubu ilaçlar, hastalığın altında yatan patolojinin gelişimini değiştirmeden, oluşan semptomları rahatlatarak ve hastanın yaşam kalitesini artırarak etki gösterir ve “semptomatik ilaçlar” olarak değerlendirilir. Fakat bu ilaçlar hepatotoksiste gibi yan etkileri sebebiyle klinik kullanım için her zaman uygun değildir (Garlich ve ark., 2014; Howes, 2014; Winblad ve ark., 2001). Bu nedenle klinik problemleri ve hafıza bozukluklarını önleyecek, kolinomimetik ve nöroprotektif alternatifler aramaya da devam edilmektedir (Oh ve ark., 2013).

Kolinerjik nöronların belirgin ölçüde kaybı ve azalmış AChE enzim etkinliği hastalığın bulgularıyla tutarlı bulunmuştur ve kognitif bozukluğun oluşmasına

önemli katkıda bulunduğu düşünülür (Mullan, 2000). Donepezil, rivastigmin ve galantamin gibi ilaçlar hafif-orta dereceli AH kullanılan ve AchEI etkinliği gösteren ilaçlardır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda özellikle donezepilin orta şiddetli AH'na karşı olumlu etkileri ortaya konmuştur (Molino ve ark., 2013). Donezepilin klinik öncesi in vitro çalışmalarda β -amiloidle oluşturulmuş nörotoksiste de dahil olmak üzere, bazı hastalık modellerinde nöroprotektif etkisi gösterilmiştir (Akasofu ve ark., 2003). Dahası, transjenik fare modeli kullanılan bazı çalışmalarda donezepilin A β veya tau-protein ilişkili patolojiyi azalttığı da gösterilmiştir (Dong ve ark., 2009; Yoshiyama ve ark., 2010). AH tedavisi için halen ilk seçenek olarak tercih edilen donepezil; düşük toksisitesi ve iyi derecede tolere edilebilmesi sebebiyle günümüzde de halen popülerliğini korur (Wu ve ark., 2016). Donepezil, piyasaya sürülen ikinci FDA onaylı kolinesteraz inhibitörüdür (Aricept-Eisai /Pfizer). İlk formülasyonları hafif ve orta dereceli AH tedavisinde kullanılmak üzere 5 ve 10 mg'lık dozlarda 1996 yılında, 23 mg doz ise orta ve şiddetli derecede AH'nda kullanılmak üzere 2010 yılında FDA onayı almıştır (English, 2012).

Donepezil, AChE'nin oldukça seçici, merkezi etkili ve geri dönüşümlü inhibitörü olarak işlev görür ve sinaptik aralıkta asetilkolin miktarını artırır (YY Szeto ve ark., 2016). Bu etki mekanizması AH'nın kolinerjik hipotezine dayanır ve asetilkolin konsantrasyonunu artırarak nöronal fonksiyonların iyileştirilmesini amaçlar (Sharma, 2019). İlacın yarılanma ömrü 60-90 dakikadır ve buda günde 1 doz kullanım için uygun kabul edilir (Atri, 2019). Rutin kullanımda maksimum plazma konsantrasyonuna 3-5 saatte, kararlı durum yoğunluğuna 14-21 günde ulaşır (Shigeta ve ark., 2001). Donepezil karaciğerde CYP2D6 ve CYP3A4 enzimleri ile metabolize edilir, değişmemiş ilacın çoğunluğu ve metabolitleri böbrekler yoluyla atılır. Bir meta-analiz çalışmasında donezepilin, Alzheimer semptomlarını iyileştirmede galantaminden veya rivastigmininden daha etkili olduğu gösterilmiştir (Blanco-Silvente ve ark., 2017). Donepezil uygulamasını takiben görülen yan etkiler ise; artan kolinerjik aktivitenin etki mekanizmasını yansıtır (Haake ve ark., 2020).

1.5. Extra Virgin Zeytinyağı (EVOO)

Oksidatif stres insanlarda yaşlanma ve AH gibi patolojik olguların en önemli nedenlerinden biri olarak kabul edilir. Hücre metabolik süreçleri sırasında oluşan fazla miktarda serbest radikal; antioksidan savunma sistemindeki bozukluklar ya da yetersizlikler nedeniyle ortaya çıkar. Antioksidan savunma sisteminde endojen enzimler (süperoksit dismutaz, katalaz ve glutasyon peroksidaz), metal bağlama proteinleri (ferritin, seruloplazmin, laktoferrin ve albümin) ve temel olarak meyve ve sebzelerden alınan ekzojen bileşikler (selenyum, çinko, A,C,E vitaminleri, taurin) bulunur (Huang ve ark., 2016). Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) gibi serbest radikaller, dengesiz ve oldukça reaktif oksijen ya da nitrojen bazlı moleküller ve eşlenmemiş elektronlar tarafından üretilir. Genellikle, hücresel bileşiklerdeki oksidatif hasar akışkanlık, iyon transportu, enzim aktiviteleri ve protein bağlanmaları gibi membran özelliklerinde değişikliklere neden olur (Liao ve ark., 2016). Dahası hasarlar nükleer bileşenler ve hücre içi organellere kadar uzanabilir (Blasiak ve ark., 2013). Ayrıca serbest radikallerin yaşlanmada önemli rol oynadığını gösteren çok fazla çalışma da bulunmaktadır. Beyin, yüksek oksidatif metabolizması, fazla miktarda yağ içermesi ve rejenerasyonunun az olması nedeniyle serbest radikallerin etkilerine çok açıktır. Gerek KDS'nun gerekse AH'nın diyet ile tedavisi; temelde, serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltabilecek antioksidanlar ve mitokondriyal kofaktörlerin kullanımına dayanır (Cotman ve ark., 2002).

Antioksidanların yaşlı kemirgenlerde ve antioksidandan zenginleştirilmiş diyetle beslenen yaşlı köpeklerde kognitif performansın arttığını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Ikeda-Douglas ve ark., 2004). Yine oksidatif stresin sağlıksız sonuçları ve etkilerinden dolayı, antioksidanların terapötik olarak uygulanmasına yönelik çok sayıda çalışma da yapılmıştır. Meyve ve sebzelerde bulunan kimyasalların radikal reaksiyonları önlediği, yavaşlattığı ya da sonlandırdığı bu çalışmalar ile ortaya konmuştur (Falowo ve ark., 2014). Bu nedenle özellikle son zamanlarda bu alanda çalışan araştırmacıların ilgisi; yüksek oranda antioksidan içeren doğal gıdalara doğru yönelmiştir. Bunların arasında da sızma zeytinyağı extra-

virgin olive oil (EVOO) önemli bir yer tutar. EVOO, akdeniz diyetinin önemli bir bileşeni olup, uzun sağlıklı bir yaşamla ilişkilendirilmiştir. Kansere ve kardiyovasküler hastalıkları önlediği ve hastalıkların insidansını düşürdüğü konuya ilişkin yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Dahası, birçok çalışmada zeytinyağının kolesterol seviyesini, kan basıncını düşürdüğü ve platelet agregasyonunu önlediği de bildirilmiştir (Dell'Agli ve ark., 2008).

EVOO, mono ve digliserollerle esterleştirilmiş %98 oranında yağ asitleri ve saponifi olmayan %2'lik bileşenlere sahip kompleks bir karışımdır (Genovese ve ark., 2015). EVOO, sature olmayan yağ asitleri ve yüksek oranda değerli biyofenolik bileşenleri nedeniyle diğer yağlardan ayrılır ve bu özellikleri ile de daha kıymetlidir (Presti ve ark., 2017). Zeytinyağının sağlığı koruyucu etkileri özellikle oleik asit başta olmak üzere sature olmayan yağ asitlerinden ve bileşiminde yoğun olarak bulunan polifenollerden kaynaklanır. Polifenollerin yaşlanma ve hastalığa bağlı olarak beyinde artan oksidatif hasarın sebep olduğu kognitif bozuklukları ve hafıza problemlerini önlediği bildirilmiştir. EVOO yaşlı sıçanlarda glutasyon redüktaz (GR) enzim aktivitesini ve salınımını azaltır (Pitozzi ve ark., 2010).

Zeytinyağında bulunan başlıca fenol aileleri basit fenoller, lignanlar, flavonoidler ve serkoidoidlerdir (Carrasco-Pancorbo ve ark., 2005). Ek olarak bu bileşenlerin çok yüksek antioksidan özelliğe sahip olduğu, oksidasyon öncesi işlemleri önleyerek bu etkilerini gösterdikleri birçok in vitro çalışma ile gösterilmiştir (Caruso ve ark., 1999; Correa ve ark., 2008). EVOO fenollerinin farklı patolojilerdeki koruyucu rolü hakkında bilgilerimize rağmen, zeytinyağının yaşam uzunluğunu nasıl etkilediğini gösteren derin moleküler mekanizmaların ifade edildiği çalışmalar oldukça azdır. Bu etkiler genellikle fenolik bileşenlerin antioksidan özelliklerine ve vitamin E gibi diğer serbest radikal temizleyicilerin etkilerine atfedilmiştir (Frankel, 2011). Rodentlerde yapılan çalışmalarda yüksek oranda polifenol içeren diyetle beslenen hayvanlarda kognitif becerinin geliştiği ve beyindeki oksidatif hasarın geri döndürüldüğü gösterilmiştir (Papandreou ve ark., 2009).

1.6. Rozmarinik Asit (RA)

Antioksidan etkileri olduğu bilinen diğerk bir fenol karboksilik asit türevi madde; rosmarinik asit (RA)'tir ve çeşitli gıdalar ile bitkilerde bulunur. Rozmarinik asit; antioksidan, anti-inflamatuar, anti-apoptotik ve nöroprotektif etki gösteren fenolik bileşikler içerir (Ono ve ark., 2012). Daha önce yapılan çalışmalarda diyetin bitkisel antioksidanlarla zenginleştirilmesinin beyin hasarı ve kognitif fonksiyonları iyileştirebileceğı gösterilmiştir (Head, 2009).

Rozmarinik asit içeren; *Melissa officinalis* ve *Salvia officinalis*'in etanol-çözünür bileşeninin, randomize çift-kör çalışmalarda hafif-orta dereceli AH yönetiminde etkili olduğı bildirilmiştir (Bandoniene ve ark., 2005; Lamaison ve ark., 1991). Yine rosmarinik asitin farelerde Aβ tarafından indüklenen nörotoksisite ve nörodejenerasyona karşı anti-amnezik aktivasyon etkisi de gösterilmiştir. Rozmarinik asitin anti-amnezik etkisini nörotransmitter metabolik enzim olan AChE'nin düzeylerini düşürerek ve öğrenme ve bellekteki ana düzenleme mekanizması olan merkezi kolinerjik nörotransmisyonunu geliştirerek yaptığı varsayılır (Iuvone ve ark., 2006; Mushtaq ve ark., 2014).

1.7. Çalışmanın Amacı

EVOO, rosmarinik asit ve donepezilin nörodejeneratif hastalıklara karşı bilinen yararlı potansiyellerine rağmen çalışmaların çoğı gözlemseldir ve bu da bulguların geçerliliğini kısıtlar. Ayrıca; EVOO, rosmarinik asit ve donepezilin kognisyonu ne derecede etkilediğı ve birbirlerine karşı üstünlüklerini ya da eksikliklerini gösteren herhangi bir çalışma da bulunmamaktadır. Özellikle, bu maddelerin kortikohippokampal bağımlı öğrenme, kognisyon ve hafıza hasarı, oksidatif redoks bozukluğuyla oluşan motor ve araştırma davranışı bozukluğu ile anksiyete şiddeti ve

hücre ölümlerinin karşılaştırılması ve bu maddelerin terapötik potansiyelleri bilinmemektedir.

Planlanan bu tez çalışmasının hipotezi; rozmarinik asit ve bitkisel yağ olarak kullanılan EVOO'nun, Alzheimer tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı bir alternatif tedavi oluşturma potansiyelinin bulunmasıdır.

Bu çalışmada; sıçanlarda $AlCl_3$ ile oluşturulacak olan Alzheimer modelinde, dejeneratif bozukluklarda EVOO, rozmarinik asit ve donepezilin davranışsal paradigmlar üzerine etkileri ve sıçanlarının prefrontal korteks ve hipokampusunda uygulanacak maddelerin terapötik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu çalışmanın gerecini Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Deneysel Araştırmalar Birimi'nden temin edilen yetişkin erkek Sprague Dawley ırkı sıçanlar (250-300 g) oluşturur. Çalışmada her grupta 7 (n=7) sıçan olacak şekilde 35 sıçan kullanılmıştır. Çalışma Ağustos-Ekim 2019 tarihleri arasında gerçekleştirilmiş ve yasal izin belgesi (Ek-1) ekte sunulmuştur. Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (TF-HADYEK) tarafından onaylanmıştır (Etik kurul onay tarihi: 14.12.2017 karar no:25/2017).

Kullanılan $AlCl_3$ Aluminum chloride Anhydrous isimli kimyasaldan elde edilmiştir. Alüminyum klorür ($AlCl_3$), metalik alüminyum ve hidrojen klorürün (HCl) 650-750 °C sıcaklık aralığında ekzotermik reaksiyonu sonucu oluşan saf bir bileşiktir. Kognitif bozukluk oluşturmak için hayvanlara günde 1 kez, ağız yoluyla 100 mg/kg dozda 15 gün boyunca $AlCl_3$ uygulaması yapılmıştır (Mathiyazahan ve ark., 2015)

Donepezil, Alzheimer hastalığının başlangıcında sıklıkla tercih edilen etken madde olarak 9.12 mg donepezile eşdeğer 10 mg donepezil hidroklorür içeren ilaçtan temin edilmiştir. Hayvanlara günde 1 kez, ağız yoluyla, 5 mg/kg dozda donepezil uygulaması yapılmıştır (Biswas ve ark., 2017).

EVOO; oral preperattan temin edilmiştir. Hayvanlara 1 gün boyunca günde 1 kez, ağız yoluyla, 1 ml EVOO uygulaması yapılmıştır (Nakbi ve ark., 2010).

Rozmarinik asit; biberiye suyundan temin edilmiştir. Biberiye bitkisinin toprak üstü kısımlarından su buharı distilasyonu yöntemi ile elde edilir. İçerisinde %15 camphor, %20 1,8-cineole ve flavonoidler bulunur. Hayvanlara kullanılacak 21 gün boyunca günde 1 kez, ağız yoluyla, 1 ml dozda rozmarinik asit uygulaması yapılmıştır (Santos ve ark., 2000).

2.2. Yöntem

2.2.1. Hayvan seçimi

Dokuz Eylül Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Deneysel Araştırmalar Birimi'nden temin edilen 35 adet sağlıklı erkek Sprague Dawley ırkı sıçan, rastgele gruplar halinde kafeslere yerleştirilmiş ve 14 gün boyunca hiçbir uygulama yapılmadan birbirlerine alışmaları sağlanmıştır. 14 günün sonunda sıçanlar çalışma grupları oluşturmak için önce kontrol ve $AlCl_3$ uygulanacak gruplar olarak ikiye ayrılmıştır. Kontrol grubuna deney süresince sadece fizyolojik tuzlu su (FTS) verilmiştir. $AlCl_3$ uygulanacak olan diğer 4 gruba ise 15 gün boyunca gavaj yardımıyla günde 1 kez 100 mg/kg dozda $AlCl_3$ uygulaması yapılmıştır. Daha sonra bu 4 gruptaki hayvanlara 21 gün boyunca günde 1 kez aşağıda belirtilen prosedüre uygun olarak, incelenecek olan maddelerin uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

Gruplar:

1. Grup: Kontrol grubu (Çalışma süresince her gün, günde 1 kez, ağız yoluyla, 1 ml dozda FTS uygulanmıştır).

2. Grup: $AlCl_3$ grubu (Günde 1 kez, ağız yoluyla 100 mg/kg dozda 15 gün boyunca $AlCl_3$ uygulaması ile histopatolojik olarak kognitif bozukluk olduğu görüldükten sonra; takip eden 21 gün boyunca günde 1 kez, ağız yoluyla, 1 ml dozda FTS uygulanmıştır).

3. Grup: Donepezil grubu (Günde 1 kez, ağız yoluyla 100 mg/kg dozda 15 gün boyunca $AlCl_3$ uygulaması ile kognitif bozukluk oluşturulduktan sonra; takip eden 21 gün boyunca günde 1 kez, ağız yoluyla, 5 mg/kg dozda donepezil uygulaması yapılmıştır).

4. Grup: EVOO grubu (Günde 1 kez, ağız yoluyla 100 mg/kg dozda 15 gün boyunca $AlCl_3$ uygulaması ile kognitif bozukluk oluşturulduktan sonra; takip eden 21 gün boyunca günde 1 kez, ağız yoluyla, 1 ml EVOO uygulaması yapılmıştır).

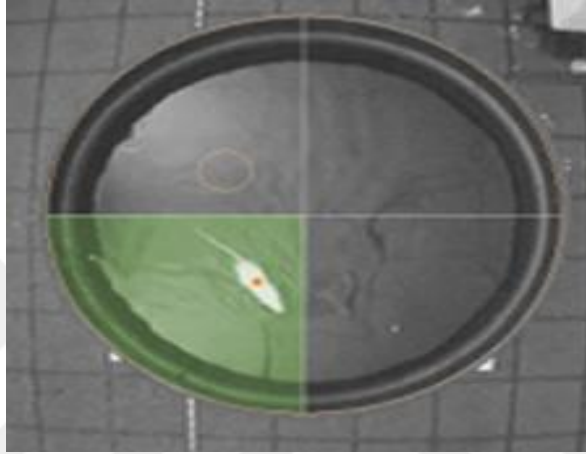
5. Grup: Rozmarinik asit grubu (Günde 1 kez, ağız yoluyla 100 mg/kg dozda 15 gün boyunca $AlCl_3$ uygulaması ile kognitif bozukluk oluşturulduktan sonra; takip eden 21 gün boyunca günde 1 kez, ağız yoluyla, 1 ml dozda rozmarinik asit uygulaması yapılmıştır).

2.2.2. Davranış Deneyleri

Çalışma süresi sonunda tüm hayvanlara Davranış ve Öğrenme Testleri uygulanmıştır.

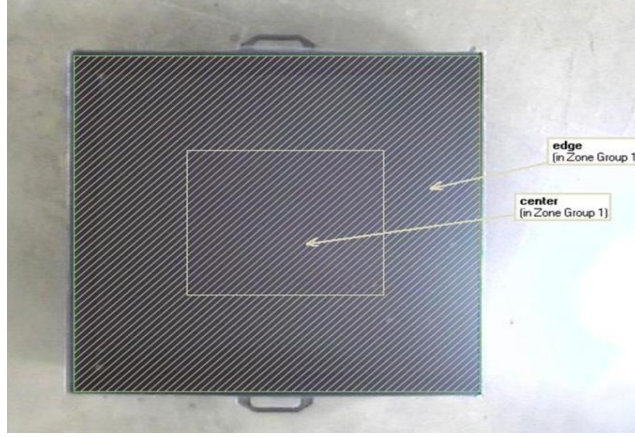
Morris Water Maze Testi (MVM): Morris su tankı kullanılarak öğrenme deneyleri yapılmıştır. Havuzun bulunduğu odanın duvarlarına saat, tablo gibi işaretler yerleştirilerek, sıçanların bu işaretleri kullanarak yönlerini belirlemesi sağlanmıştır. Tankın merkezinden ortalama 2 m yükseklikte sıçanların davranışlarını izlemek ve kaydetmek üzere bir video kamera sistemi kurulmuştur. Her test gününde sıçanlar gizli platformun bulunmadığı 3 kadrandan rastgele seçilmiş birinden yüzleri havuz kenarına dönük olarak suya bırakılmış ve gizli platformu bulana dek yüzmelerine izin verilmiştir. Maksimum yüzmeye süresi 60 saniyedir. Eğer 60 saniye içerisinde hayvan platformu bulamazsa, 15 saniye üstünde kalmasına izin verilmiştir (Morris, 1984). Her sıçan günde 5 ardışık deneye tabi tutulmuştur ve deney aralıkları 60 saniyedir. Her deneyin tamamlanmasından sonra sıçanlar platform üzerinden

alınarak kurulanmış ve kafeslerine geri yerleştirilmiştir. Bu işlemler ard arda 4 gün tekrarlanmıştır. Böylece her sıçana 4 günde toplamda 20 deney uygulanmıştır. 5. gün her sıçana bir araştırma deneyi (probe trial) uygulanmıştır. Platform havuzdan kaldırılarak sıçanın 60 saniye yüzmesine izin verilmiştir (Morris, 1984). Davranışsal veriler, yüzme mesafesi, platformu bulma süresi ve her kadranda harcadığı süre olarak HVS image video tracking sistemi kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Morris Water Maze düzeneği.

Açık Alan Testi (AAT): Lokomotor aktivite ve anksiyete seviyesinin belirlendiği bir testtir. Açık alan testi için 1×1 metrelik bir alan kullanılır ve bu alan 35 lükslük bir ışık kaynağı ile aydınlatılır. Deney hayvanı alanın tam ortasına konup, 5 dakikalık test süresince alan içindeki hareketleri kamera ile kaydedilerek analiz edilir. Açık alan testinde zemin 16 kareye bölünmüştür (12'si kenarlarda, %75; 4'ü merkezde, %25). Sistem otomatik olarak alanın kenarlarında ve ortasında geçirdiği süreleri kaydederek, verir. Test sonunda her deneğin test alanının kenarlarında ve ortasında geçirdiği süreler, yürüme süresi, toplam kat edilen mesafe ile kullanılan hücre sayısı ve yüzdesi değerlendirilir (Matt ve Shieh, 2010). Bu testin kayıt ve analizinde Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Deneysel Araştırmalar Birimi'nde bulunan HVS image video tracking sistemi kullanılmıştır (Şekil 2.2).

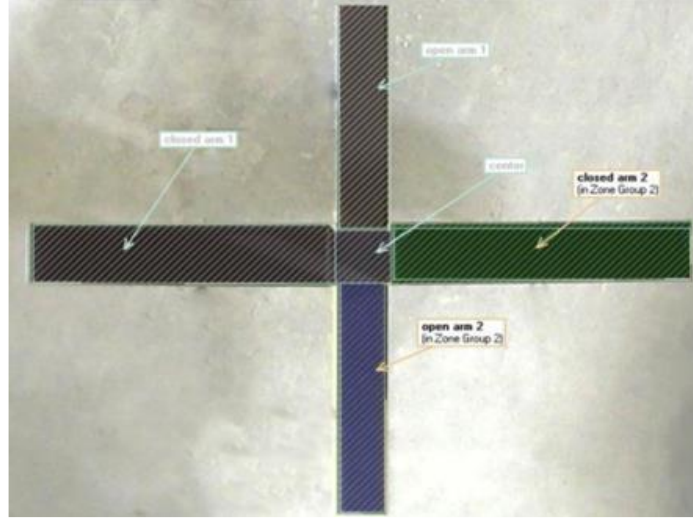


Şekil 2.2. Açık alan testi düzeneği.

Yükseltilmiş Artı Labirent Testi (YALT): Deney hayvanının anksiyete seviyesinin test edilmesine yarayan bir düzendir. Ayrıca bu test ile deney hayvanının lokomotor aktivitesi de değerlendirilebilir. Yükseltilmiş artı labirent testi için zeminden 75 cm yükseklikte, merkezde 5×5 cm’lik bir merkez platform ile yanlarda 50 cm uzunluğunda, 10 cm genişliğinde, 0,5 cm yüksekliğinde duvarları bulunan iki açık ve 50 cm uzunluğunda, 10 cm genişliğinde, 40 cm yüksekliğinde duvarları bulunan iki kapalı koldan oluşan bir düzendir kullanılır. Deney hayvanı açık kollardan birine bakacak şekilde merkez platforma bırakılarak, 5 dakika boyunca kamera ile izlenir, açık ve kapalı kollara giriş sayısı ile merkez platformda ve kollarda geçirilen süre ölçülür. Anksiyete indeksi aşağıda verilen formüle göre hesaplanır ve indeksteki artış, anksiyetede artışa işaret eder (Carter ve ark., 2015).

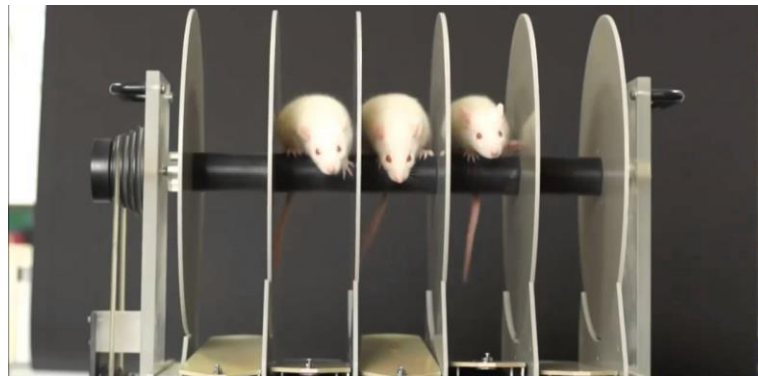
Anksiyete indeksi: 1- (açık kollarda geçirilen süre/toplam süre+açık kollara giriş sayısı/düzenekteki toplam gezme mesafesi) x 1/2.

Bu testin kayıt ve analizinde Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Deneysel Araştırmalar Birimi’nde bulunan Noldus Ethovision XT video tracking sistemi kullanılmıştır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Yükseltilmiş artı labirent testi düzeneği.

Motor Performansı testi (Rotarod testi): Rotarod test düzeneği; denge, koordinasyon ve motor kontrolün ölçülerek motor performansın değerlendirilmesini sağlar. Düzenek, deney hayvanının belirli bir hızda ya da hızı giderek artırılarak dönen bir mil üzerinde durabilme yeteneğini ölçer. Hız artırılan protokolda her denemede 4-40 rpm arasında dereceli hızlar denenir. Toplam 300 sn uygulanan testte 16 rpm hız ile başlanmış, 20-26 ve 30 rpm hızda giderek ölçümler yapılmıştır. Beş kulvarı olan düzenekte, aynı anda 2 sıçan test edilebilir. Testte; sıçanın, zemininde zamanlayıcı bulunan düzenek yardımıyla düşmeden mil üzerinde her hızda düşmeden ne kadar durabildiği ölçülmüş ve 3 kere düştüğü hız yürüyebildiği maksimum hız olarak kaydedilmiştir (Şekil 2.4) (Bazrgar ve ark., 2015).



Şekil 2.4. Motor performansı testi düzeneği

2.2.3. Sakrifikasyon ve Doku Ayrımı

Davranış ve öğrenme deneylerinin bitiminde; karbondioksit anestezisi altında kalbin sol ventrikülünden deneğin tüm kanı alınarak yaşamları sonlandırılmış ve hızla beyin dokuları çıkartılmıştır.

Beynin sağ hemisferi histolojik inceleme amacıyla %10'luk formol içerisine konmuş, diğer hemisferin ise hipokampus ve prefrontal korteksi ayrılmıştır. Ayrılan bu parçalardan biyokimyasal inceleme için homojenat ve süpernatant hazırlanmıştır. Sıçanların ayrıca timus ve adrenal bez dokuları çıkarılmış ve ağırlıkları kaydedilmiştir. Relatif adrenal ve timus ağırlıkları adrenal ağırlık/vücut ağırlığı oranı; timus ağırlığı/vücut ağırlığı oranı ile hesaplanmıştır. Beyin dokuları biyokimyasal analizler yapılana kadar -80°C'de saklanmıştır.

2.2.4. Biyokimyasal Analizler

Hipokampus, prefrontal korteks bölge homojenatları ve serumda spektrofotometrik yöntem ile AChE, laktat dehidrojenaz (LDH) enzim ölçümleri, ELISA yöntemi ile malondialdehit seviyesi (MDA) ölçümü, A β -42 precursor protein birikimi, protein ve serum kortikosteron seviyeleri ölçülmüştür.

2.2.4.1. Serum ve Doku Homejenatlarının Hazırlanması

Sakrifikasyon sırasında kalbin sol ventrikülünden alınan kan örnekleri 1000xg'de 15 dakika +4°C'de santrifüje edilerek, serumları ayrılmıştır. Ayrılan serumlar kortikosteron ölçümleri yapılana kadar -80°C'de saklanmıştır.

Sakrifikasyon sonrası -80°C'de saklanan hipokampus ve prefrontal korteks dokuları öncelikle hassas doku tartısı ile tartılmış ve phosphate buffered saline (PBS)

(0,01 M; pH: 7,4) solüsyonu buz üzerinde soğutulmuştur. Doku ağırlığı (g): PBS hacmi (ml) oranı 1:9 olacak şekilde PBS eklenmiştir. Sonrasında buz üzerinde ultrasonik homojenizatör ile dokular homojenize edilmiştir. Homojenatlara 5000xg'de 10 dk süresince soğutmalı santrifüj işlemi uygulanarak, süpernatantlar elde edilmiş ve homojenizasyon işlemi tamamlanan dokular ELISA ölçümleri yapılana kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.4.2. AchE Enzim Aktivitesi Ölçümü

Serumlar ve doku homojenatlarında Asetilkolin esteraz enzim aktivitesi tam otomatize Roche/Hiatchi cobas c 501 cihazıyla ölçülmüştür.

Testin prensibi: Kolinesteraz bütiriltiyokolinin tiyokolin ve bütirata hidrolizini katalize eder. Tiyokolin sarı renkli heksasiyanoferrata (III) hemen hemen renksiz heksasiyanoferrata (II) indirger. Renkteki bu azalma fotometrik olarak ölçülür.

2.2.4.3. LDH Enzim Aktivitesi Ölçümü

Serumlar ve doku homojenatlarında Laktat dehidrojenaz enzim aktivitesi tam otomatize Roche/Hiatchi cobas c 501 cihazıyla ölçülmüştür.

Testin prensibi: UV testi; LDH, L-laktatın piruvata dönüşümünü katalize eder; işlem sırasında NAD NADH'ye indirgenir. NADH oluşumunun başlangıç hızı katalitik LDH aktivitesiyle doğru orantılıdır. Absorbanstaki artış fotometrik olarak ölçülerek tayin edilir.

2.2.4.4. Malondialdehit (MDA) Ölçümü

Total MDA seviyesi analizleri Bioassay Technology Laboratory Rat MDA ELISA Kiti (katalog no: E0156Ra, Shangai, China) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kitin duyarlılığı 0,01 nmol/ml, tespit edilebilir aralığı ise 0,05-10 nmol/ml'dir.

Kit içeriğinin hazırlanması:

- 1- Kullanım öncesi tüm reaktifler oda ısısına (18-25°C) getirildi.
- 2- Standart çalışma solüsyonu: Referans standardın üzerine 120µl referans standart&örnek diluenti eklenip 6.4 nmol/ml standart stok solüsyonu elde edildi. Dilüsyon yapılmadan önce standart hafifçe çalkalanarak 15 dk beklenildi. Sonrasında seri dilüsyonlar yapıldı.
- 3- Yıkama solüsyonu: Konsantre yıkama solüsyonundan 20 ml alınarak 500 ml distile su içerisinde seyreltilerek hazırlandı.

Analizin yapılışı:

Tüm reaktifler, standart çözeltiler ve numuneler talimatlara uygun şekilde hazırlandı, kullanım öncesi tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Test için gerekli olan şerit sayısı belirlendi, şeritler kullanılmak üzere kuyucuklara yerleştirildi ve standart kuyucuğuna 50 µl standart eklendi. Numune kuyucuklarına 40µl numune, üzerine 10µl anti-MDA antikoru ve daha sonra numune ve standart kuyucuklarına 50µl streptavidin-HRP eklendi. Plak iyice karıştırıldı, üzeri sızdırmaz madde ile örtüldü ve 37°C de 60 dakika inkubasyona bırakıldı. Sızdırmaz madde çıkarıldı, plak 5 kere yıkama solüsyonuyla yıkandı. Her yıkama için kuyucuklar 30 saniye ile 1 dakika arasında en az 0.35 ml yıkama solüsyonu ile yıkandı. Otomatik yıkama için tüm kuyucuklar aspire edildi ve 5 kere yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her kuyucuğa 50µl sustrat solüsyon A ve daha sonra 50µl substrat solüsyon B eklendi. Plak yeni bir kapatıcı ile 10 dakika boyunca 37°C de karanlıkta inkübe edildi. Her kuyucuğa 50µl stop solüsyonu eklendi. Mavi rengin hemen sarıya döndüğü gözlemlendi. Stop solüsyonu eklendikten 10 dakika sonra kuyucukların optik dansitesinin belirlenmesi için 450 nm'ye ayarlanmış mikropalak okuyucu kullandı.

2.2.4.5. A β -42 Precursor Protein Ölçümü

Total amiloid precursor protein birikimi seviyesi analizleri Bioassay Technology Laboratory Rat Soluble Amyloid Precursor Protein Beta ELISA Kiti (katalog no: E01010Ra, Shangai, China) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kitin duyarlılığı 0,053 ng/ml, tespit edilebilir aralığı ise 1-40 ng/ml'dir.

Kit içeriğinin hazırlanması:

1- Kullanım öncesi tüm reaktifler oda ısısına (18-25°C) getirildi.

2- Standart çalışma solüsyonu: Referans standardın üzerine 120µl referans standart&örnek diluenti eklenip 24 ng/ml standart stok solüsyonu elde edildi. Dilüsyon yapılmadan önce standart hafifçe çalkalanarak 15 dk beklenildi. Sonrasında seri dilüsyonlar yapıldı.

3- Yıkama solüsyonu: Konsantre yıkama solüsyonundan 20 ml alınarak 500 ml distile su içerisinde seyreltilerek hazırlandı.

Analizin yapılışı:

Tüm reaktifler, standart çözeltiler ve numuneler tailmatlara uygun şekilde hazırlandı. Kullanım öncesi tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Test için gerekli olan şerit sayısı belirlendi, şeritler kullanılmak üzere kuyucuklara yerleştirildi ve standart kuyucuğuna 50 µl standart eklendi. Numune kuyucuklarına 40µl numune, üzerine 10µl anti-SAPPB antikoru ve daha sonra numune ve standart kuyucuklarına 50µl streptavidin-HRP eklendi. Plak iyice karıştırıldı, üzeri sızdırmaz madde ile örtüldü ve 37°C de 60 dakika inkubasyona bırakıldı. Sızdırmaz madde çıkarıldı, plak 5 kere yıkama solüsyonuyla yıkandı. Her yıkama için kuyucuklar 30 saniye ile 1 dakika arasında en az 0.35 ml yıkama solüsyonu ile yıkandı. Otomatik yıkama için tüm kuyucuklar aspire edildi ve 5 kere yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her kuyucuğa 50µl sustrat solüsyon A ve daha sonra 50µl substrat solüsyon B eklendi. Plak yeni bir kapatıcı ile 10 dakika boyunca 37°C de karanlıkta inkübe edildi. Her kuyucuğa 50µl stop solüsyonu eklendi. Mavi rengin hemen sarıya döndüğü gözlemlendi. Stop solüsyonu

eklendikten 10 dakika sonra kuyucukların optik dansitesinin belirlenmesi için 450 nm'ye ayarlanmış mikropalak okuyucu kullandı.

2.2.4.6. Kortikosteron Ölçümü

Serum kortikosteron analizleri Bioassay Technology Laboratory (Corticosterone) Rat ELISA kiti (katalog no: E0496Ra, Shanghai, China) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kitin duyarlılığı 0,24 ng/ml, tespit edilebilir aralığı ise 0,5 ng/ml-100 ng/ml'dir.

Kit içeriğinin hazırlanması:

- 1- Kullanım öncesi tüm reaktifler oda ısısına (18-25°C) getirildi.
- 2- Yıkama solüsyonu: Konsantre yıkama solüsyonundan 20 ml alınarak 500 ml distile su içerisinde seyreltilerek hazırlandı.
- 3- Standart çalışma solüsyonu: 56 ng/ml standart stok çözeltisi oluşturmak için 120 µl referans standartın üstüne 120 µl standart seyreltici eklendi. Dilüsyonlara başlamadan önce standart solüsyon hafifçe çalkalanarak 15 dakika beklendi. Sonrasında seri dilüsyonlar yapıldı.

Dilüsyon metodu: 28 ng/ml, 14 ng/ml, 7 ng/ml ve 3,5 ng/ml çözeltileri üretmek için standart stok çözeltisini (56 ng/ml) 1:2 standart seyreltici ile seri olarak seyrelterek çift standart noktaları hazırlandı. Standart seyreltici, sıfır standart (0 ng/ml) olarak değerlendirildi.

Analizin yapılışı:

ELISA plağındaki ilk sütuna standartlar ve kör yerleştirildi. Diğer kuyucuklara örnekler konuldu. Standart kuyucuklarına 50 µl standart, örnek kuyucuklarına 40 µl örnek konuldu. Örnek kuyucuklarına önce 10 µl anti-CORT antikoru, daha sonra tüm kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP koyuldu. Daha sonra plağın üzeri örtülerek

37°C de 60 dakika inkubasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki solüsyon dikkatlice döküldü. Yıkama işlemi için tüm kuyucuklara 0.35 ml yıkama solüsyonu eklenerek bu şekilde 1-2 dk bekletildi ve sonrasında dikkatlice döküldü. Plak temiz bir kurutma kâğıdına vurularak kuyucuklarda kalan solüsyon uzaklaştırıldı. Bu yıkama işlemi beş kez tekrarlandı. Her kuyucuğa 50 µl sustrat solüsyon A ve 50 µl sustrat solüsyon B eklendi. Plakın üzeri kaplanarak 37 °C’de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi. Mavi rengin hızlı bir şekilde sarıya dönmesi gözlemlendi. Stop solüsyon eklendikten 10 dakika sonra plak 450 nm’de Biotek marka ELX800 ELISA cihazında (USA) okutuldu. Değerler pg/ml olarak hesaplandı.

2.2.5. Histolojik Analizler

2.5.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

Tüm gruptaki beyin doku örneklerinden Hematoksilen-Eozin (HE) boyaması için Rotary mikrotom (Leica RM2125RT, Nussloch; Germany) aracılığı ile alınan 5µm’luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C’lik etüve bırakıldıktan sonra, 30’ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için 2’şer dakika %95’den %60’a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akarsu altında yıkandı. 2 dakika hematoksilen (HX86017674, Merck Hematoksilen, Darmstadt, Germany) ile boyamanın ardından, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akarsuda yıkanan kesitler asit alkola batırılıp çıkarıldıktan sonra tekrar 5 dakika akarsuda yıkandı ve 30 saniye eozin (HX87833544, Merck Eosin, Darmstadt, Germany) boyası ile boyandı. Aynı şekilde 5 dakika akarsu altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95’lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30’ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

2.5.2. Congo Red Boyama Protokolü

Tüm gruptaki beyin doku örneklerinden Hematoksilen-Eozin (HE) boyaması için Rotary mikrotom (Leica RM2125RT, Nussloch; Germany) aracılığı ile alınan 5µm'luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüve bırakıldıktan sonra, deparafinizasyon işlemi için 10 dakika ksilende bekletildi. Ardından %70'lik alkolde 5 dakika tutuldu ve 5 dakika distile su ile yıkandı. Daha sonra her bir kesitin üzerine dokuyu örtecek kadar congo red (ChemBio laboratory research) damlatıldı ve 30-60 dakika arası bekletildi. Distile su ile 5 dakika boyunca yıkandıktan sonra kesitlerin üzerine hematoksin eklenerek 2 dakika bekletildi. Sonrasında distile su ile 5 dakika boyunca yıkandı, kesitler havada kurutuldu ve 5 dakika ksilende bekletildi. Entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kesitlerin üzerine lamel kapatıldı.

2.2.6. Verilerin Değerlendirilmesi

İstatistiksel analiz SPSS 23.0 programı ile yapılmıştır. Davranış testleri, ELISA ve spektrofotometrik yöntemle elde edilen verilerde gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi ANOVA ve Post-hoc Bonferroni testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar "Ortalama $\pm$ Standart sapma" şeklinde sunulmuştur. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı sınır değer olarak değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

Bu tez çalışmasında Sprague Dawley ırkı erişkin erkek sıçanlara 15 gün boyunca 100 ml/kg dozda $AlCl_3$ uygulaması yaptıktan sonra, 3 farklı gruba 21 gün boyunca tedavi protokolleri uygulanarak donepezil, EVOO ve rozmarinik asit uygulaması yapılmıştır. $AlCl_3$ uygulamaları ve tedavilerin bitiminde hayvan ağırlıkları, rölatif adrenal ve timus ağırlıkları, davranış testleri, motor performans testi, öğrenme bellek testi, histolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler yapılarak istatistiksel anlamlılıklar değerlendirilmiştir.

Stres parametresi olarak değerlendirilen rölatif timus ağırlığında $AlCl_3$ grubunda kontrol grubuna göre anlamlı azalma, tedavi gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı artış görülmüştür. Açık alan ve yükseltilmiş artı labirent testinde gruplar arası anlamlı fark görülmemiştir. Motor performans testinde 26 ve 30 rpm hızlarda donepezil grubunda $AlCl_3$ grubuna göre anlamlı artış görülmüştür. Öğrenme ve belleğin araştırıldığı Morris Water Maze testinde, 3. ve 4. öğrenme günlerinde $AlCl_3$ grubunda kontrol grubuna göre stres parametresi olarak değerlendirilen yüzme artışı görülmüş, deneyin 5.gününde ise donepezil grubunda platformun bulunduğu alanda geçirilen sürede $AlCl_3$ grubuna göre anlamlı bir artış görülmüştür.

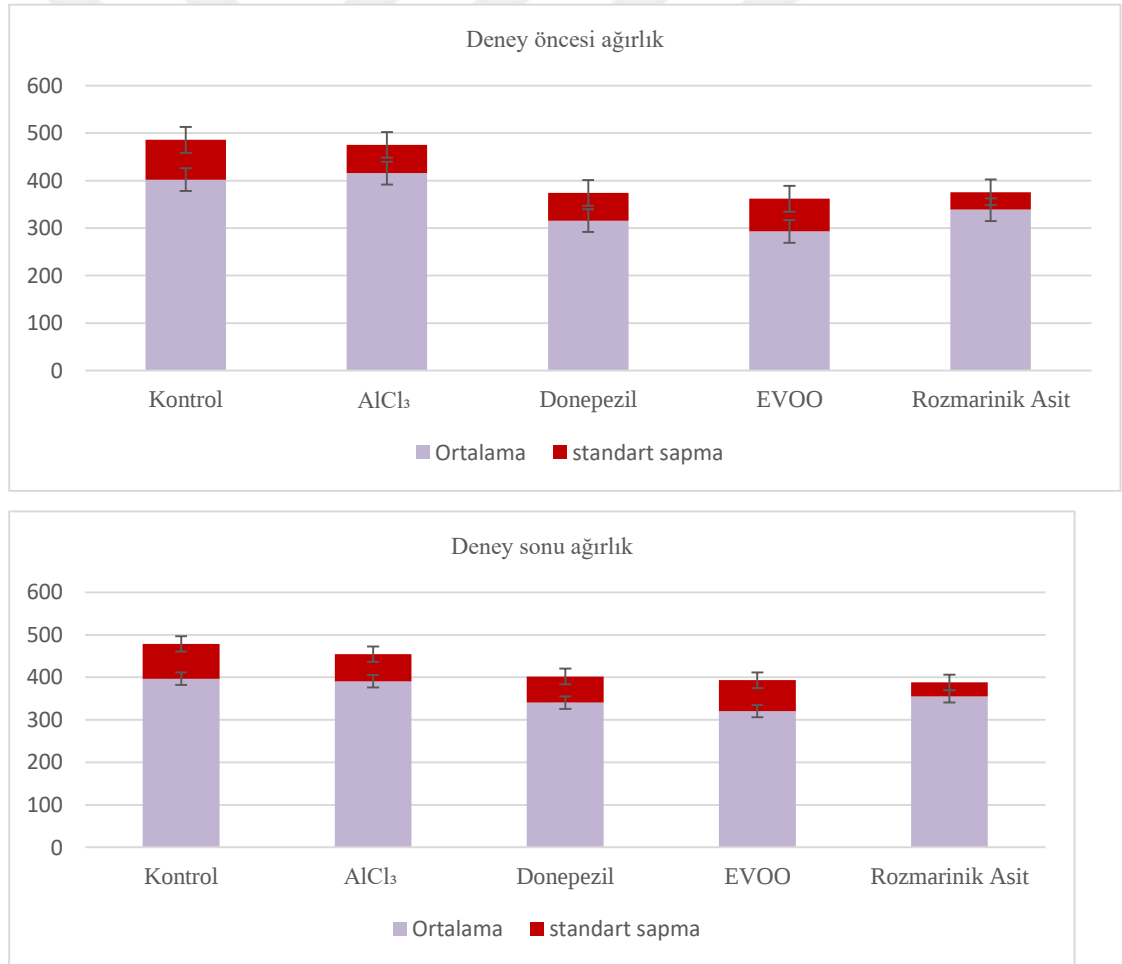
Prefrontal korteks MDA, LDH, kolinesteraz ve beta-amiloid prekürsör protein analizlerinde gruplar arası anlamlı fark görülmemiştir. Hipokampus LDH seviyesi $AlCl_3$ grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur. Serum kortikosteron seviyesinde gruplar arası anlamlı fark görülmemiş, serum MDA seviyesi $AlCl_3$ grubunda kontrol grubuna göre, serum LDH seviyesi $AlCl_3$ grubunda tüm gruplara göre anlamlı yüksek bulunmuştur.

Histopatolojik olarak hematoksilin&eozen boyamada prefrontal kortekste Alzheimer grubunda kontrol grubuna göre atrofi, nöronal hücre yoğunluğunun azalması ve gliosis görülmüştür. Benzer şekilde hipokampusta hematoksilin&eozen boyamada Alzheimer grubunda kontrol grubuna göre nöronal hücre yoğunluğunun

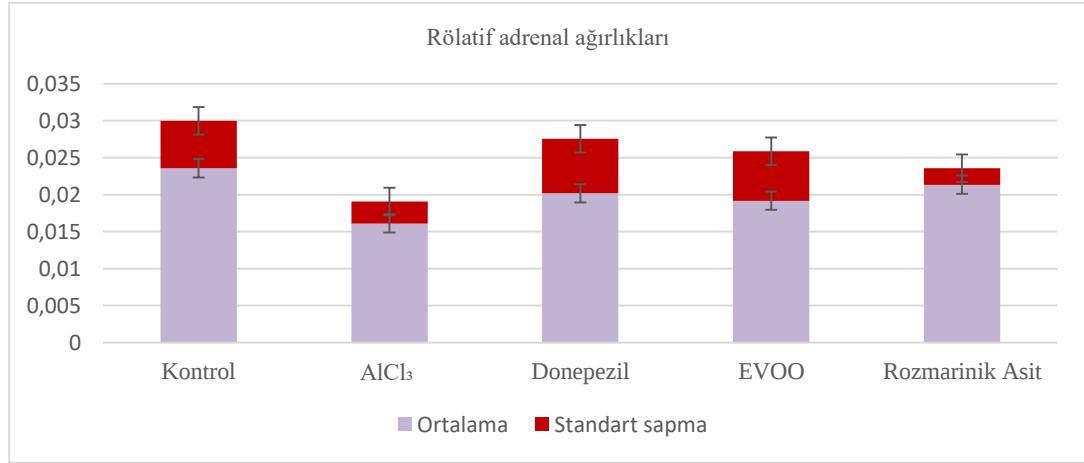
azalması ve gliosis görülmüştür. Aynı zamanda Alzheimer grubunda bazofilik boyamada hücre sitoplazmasında nörofibriler yumaklara rastlanmıştır. Congo red boyamada Alzheimer grubunun hipokampus ve prefrontal korteksinde pozitif boyanmış hücre sitoplazması, bozulmuş hücre bütünlüğü görülmüştür. Kontrol ve tedavi gruplarında hücrelerde hasara rastlanmamıştır.

3.1. İzlem Sonuçları

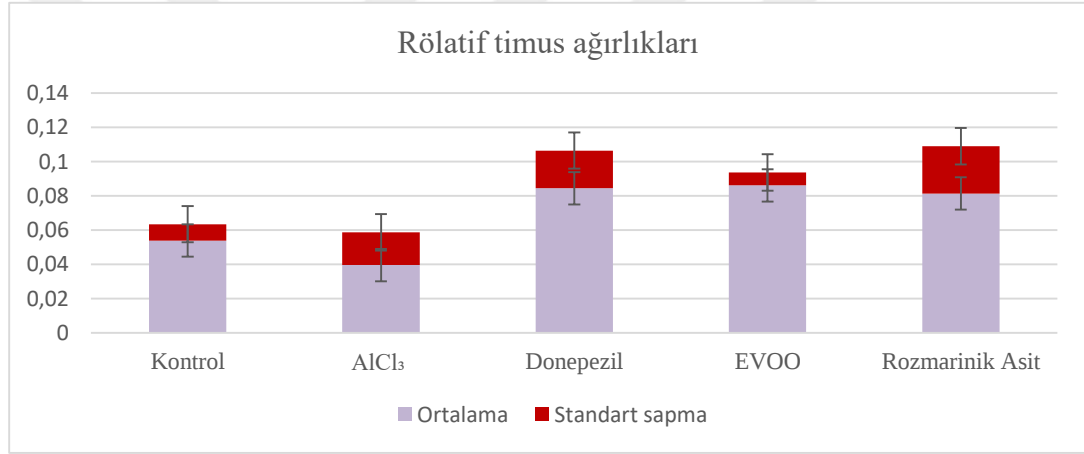
Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Çizelge 3.1’de sıçanların deney öncesi-sonrası ağırlık değişimleri, rölatif adrenal ve timüs ağırlıkları gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Grupların deney öncesi ve sonrası ağırlık değişimleri (g).



Şekil 3.2. Grupların rölatif adrenal ağırlıkları (g).



Şekil 3.3. Grupların rölatif timus ağırlıkları (g).

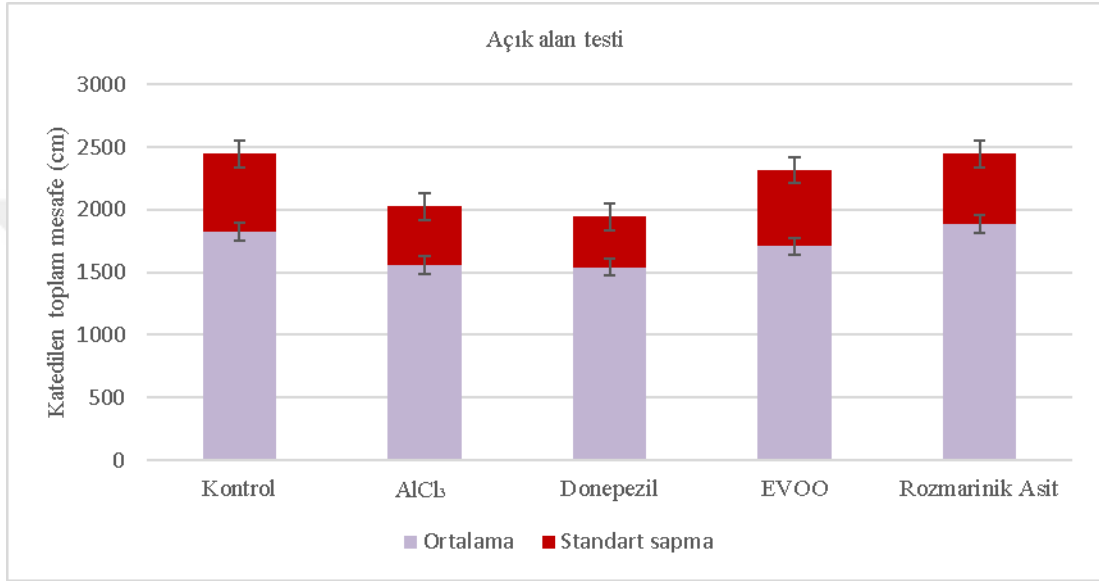
Çizelge 3.1. Sıçanların deney öncesi-sonrası ağırlık değişimleri, rölatif timus ve adrenal ağırlıkları (g).

Gruplar	Deney öncesi ağırlık	Deney sonu ağırlık	Rölatif adrenal ağırlık	Rölatif timüs ağırlık
Kontrol	401,86±83,93	396,91±81,86	,023±,006	,053±,009 ^a
AlCl ₃	415,71±59,58	390,71±63,68	,0260±,002	,039±,019 ^b
Donepezil	315,86±68,54	340,43±61,67	,020±,007	,084±,021 ^{b,c}
EVOO	293,17±36,62	320,50±72,71	,019±,002	,086±,027 ^{b,c}
Rozmarinik asit	354,88±83,93	355,14±81,86	,021±,002	,081±,027 ^{b,c}

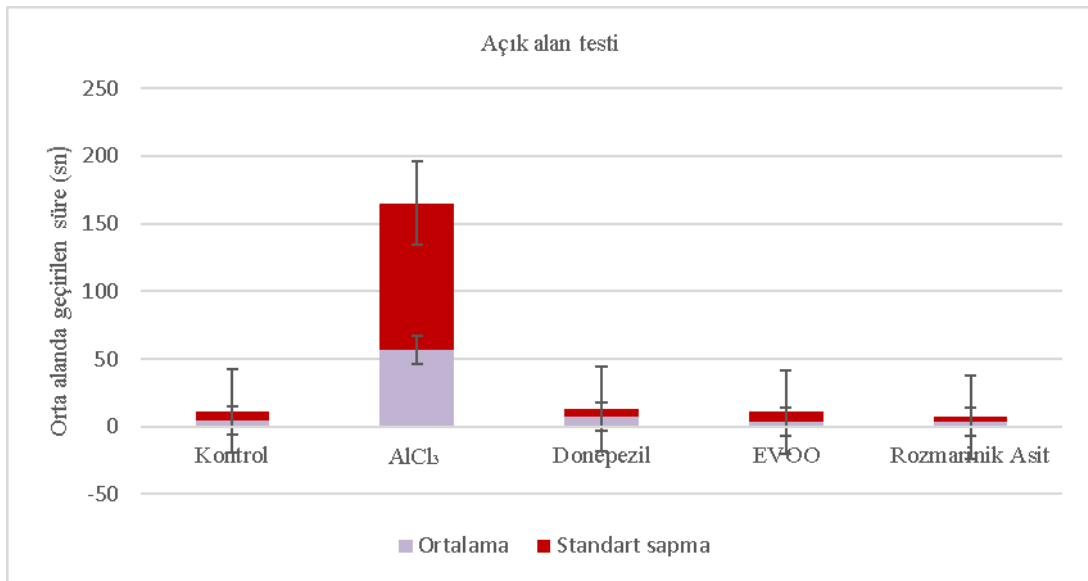
^{a,b,c}: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade eder (p< 0,05). Değerler ortalama±standart sapma.

3.2. Davranış Testi Sonuçları

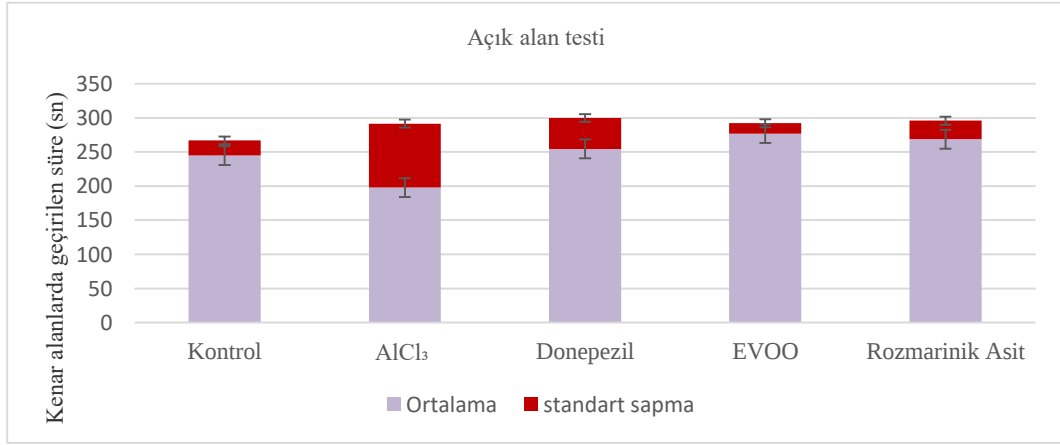
Sıçanların açık alan testi, yükseltilmiş artı labirent testi, rotarod motor performans testi ve Morris water maze testi sonuçları, Şekil 3.4 – Şekil 3.25 ve Çizelge 3.2 – Çizelge 3.9’da gösterilmiştir.



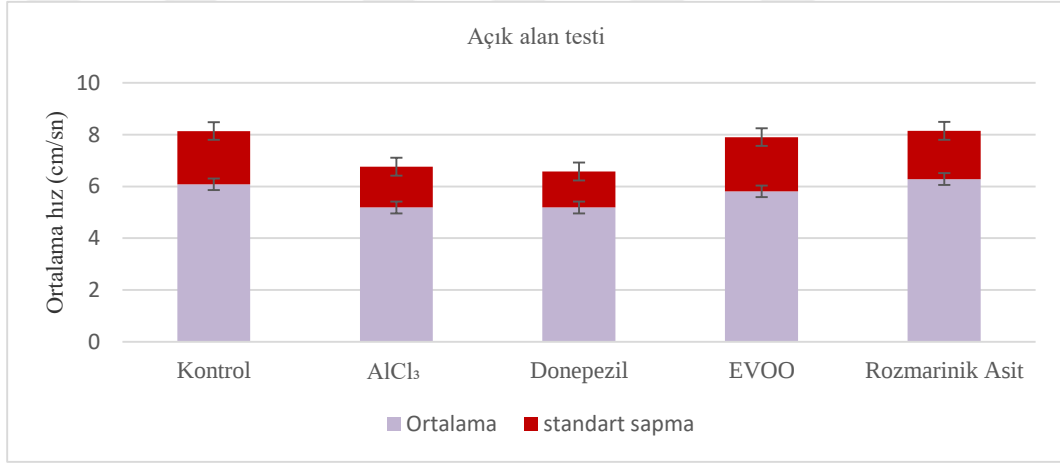
Şekil 3.4. Açık alan testinde katedilen toplam mesafe.



Şekil 3.5. Açık alan testinde orta alanda geçirilen süre.



Şekil 3.6. Açık alan testinde kenar alanlarda geçirilen süre.

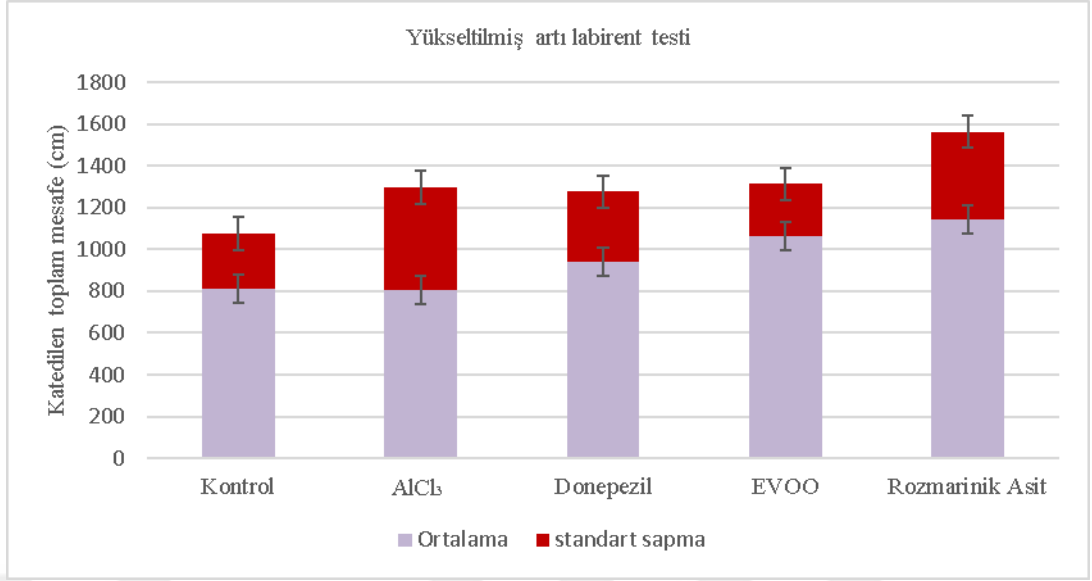


Şekil 3.7. Açık alan testinde ortalama hızlar.

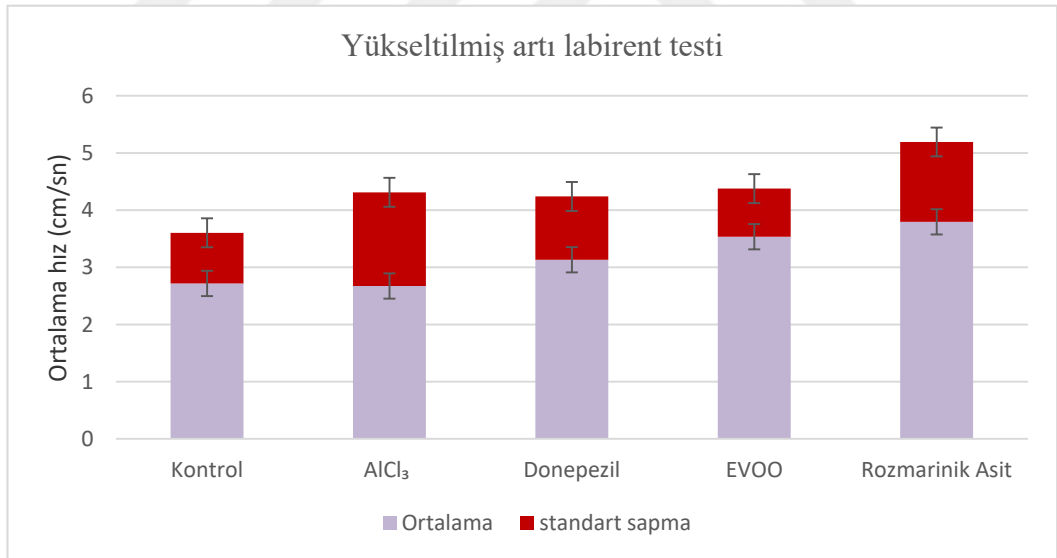
Çizelge 3.2. Açık alan testi sonuçları.

Gruplar	Katedilen toplam mesafe (cm)	Orta alanda geçirilen süre (s)	Kenar alanlarda geçirilen süre (s)	Hız (cm/s)
Kontrol	1824,51±621,81	4,86±6,67	244,72±58,91	6,078±2,05
AlCl₃	1556,66±468,85	57,01±108,19	197,96±197,96	5,18±1,57
Donepezil	1541,01±401,96	7,28±7,28	254,53±254,53	5,18±1,38
EVOO	1706,82±608,49	3,52±7,16	276,94±276,94	5,80±2,09
Rozmarinik asit	1885,32±561,62	3,23±3,75	268,64±268,64	6,28±1,85

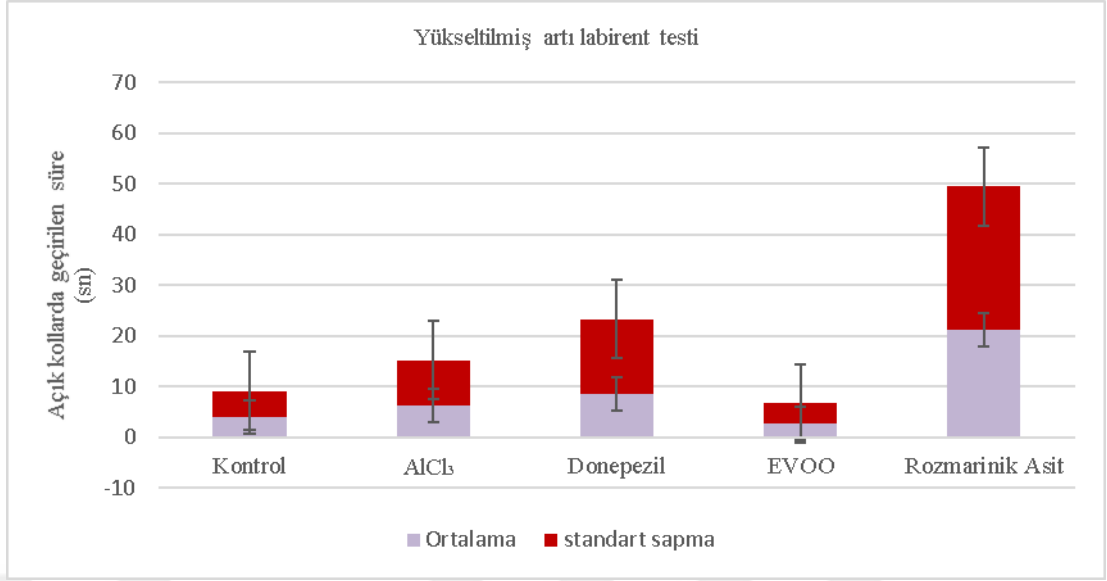
Açık alan testinde katedilen toplam mesafe, orta-kenar alanlarda geçirilen süre ve ortalama hızlarda gruplar arası anlamlı fark görülmemiştir.



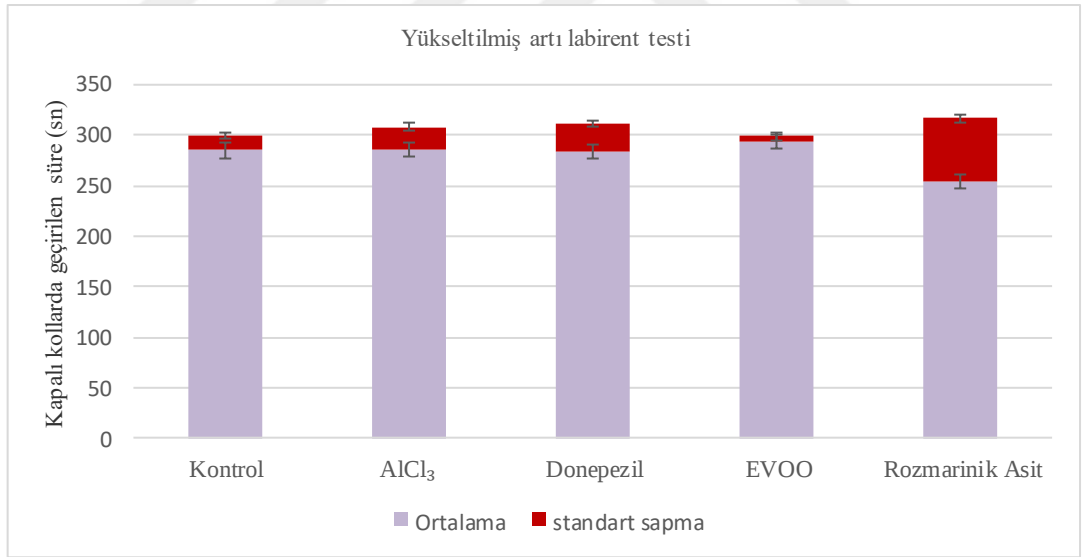
Şekil 3.8. Yükseltilmiş artı labirent testinde katedilen toplam mesafe.



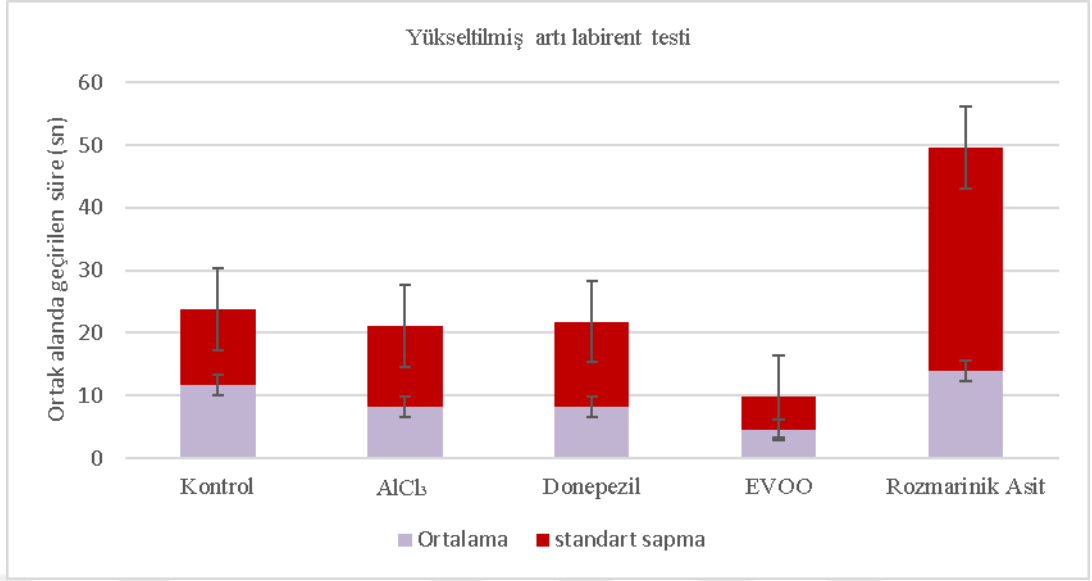
Şekil 3.9. Yükseltilmiş artı labirent testinde ortalama hız.



Şekil 3.10. Yükseltilmiş artı labirent testinde açık kollarda geçirilen toplam süre.



Şekil 3.11. Yükseltilmiş artı labirent testinde kapalı kollarda geçirilen toplam süre.

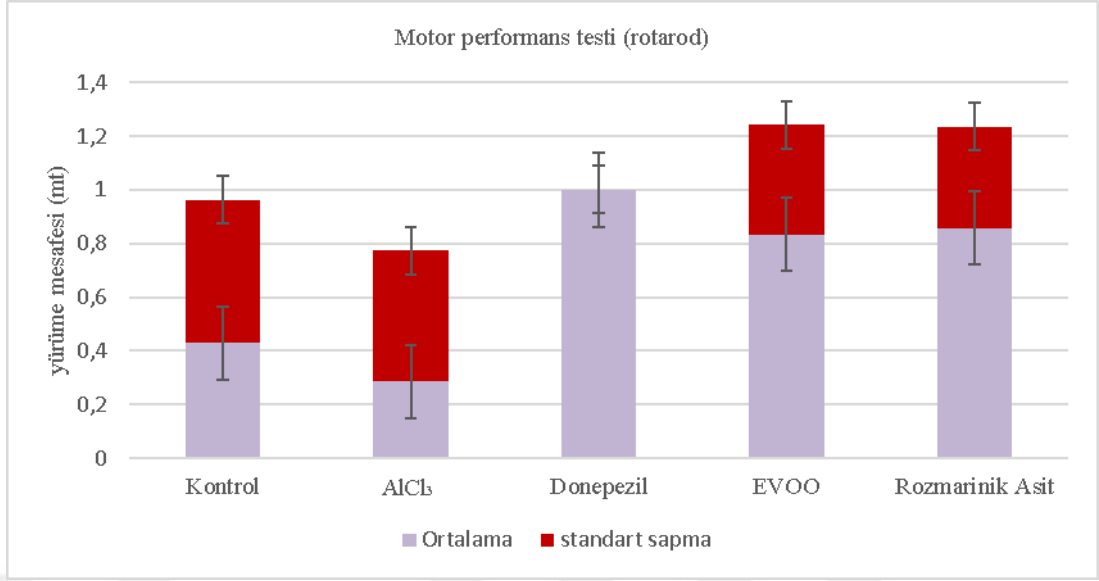


Şekil 3.12. Yükseltilmiş artı labirent testinde ortak alanda geçirilen toplam süre.

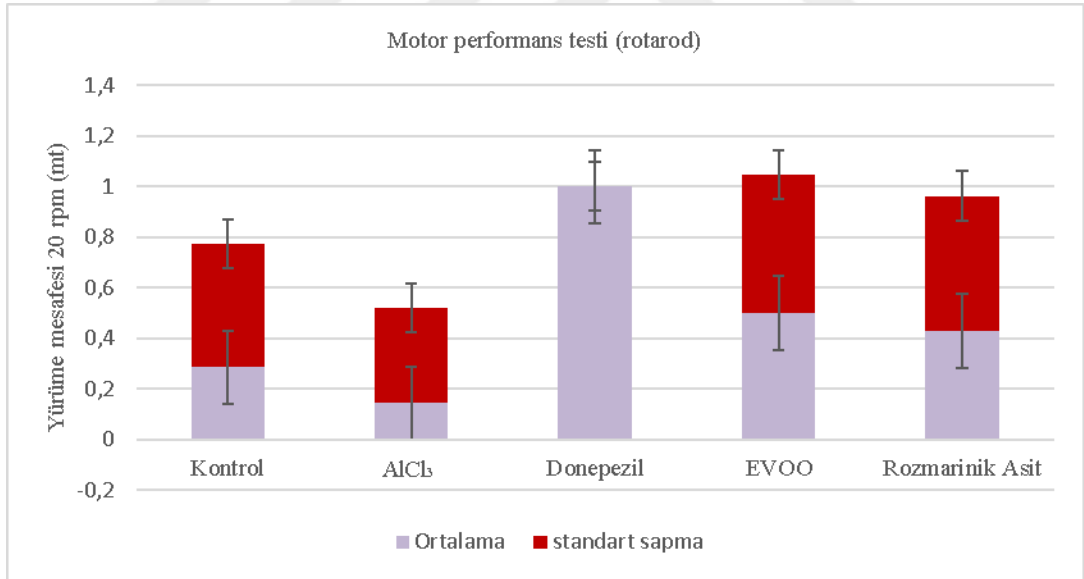
Çizelge 3.3. Yükseltilmiş artı labirent testi sonuçları.

Gruplar	Katedilen toplam mesafe (cm)	Açık kollarda geçirilen süre (s)	Kapalı kollarda geçirilen süre(s)	Orta alanda geçirilen süre (s)	Hız (cm/s)
Kontrol	813,41±262,71	4,12±5,06	284,74±14,58	11,62±12,19	2,71±,88
AlCl₃	804,67±492,86	6,20±8,97	286,58±21,83	8,25±12,88	2,67±1,63
Donepezil	942,47±333,59	8,54±14,74	284,32±26,80	8,13±13,70	3,13±1,10
EVOO	1062,43±250,96	2,80±3,94	293,72±5,09	4,50±5,37	3,53±,84
Rozmarinik asit	1141,78±420,57	21,22±28,23	253,29±63,39	26,52±35,53	3,79±1,39

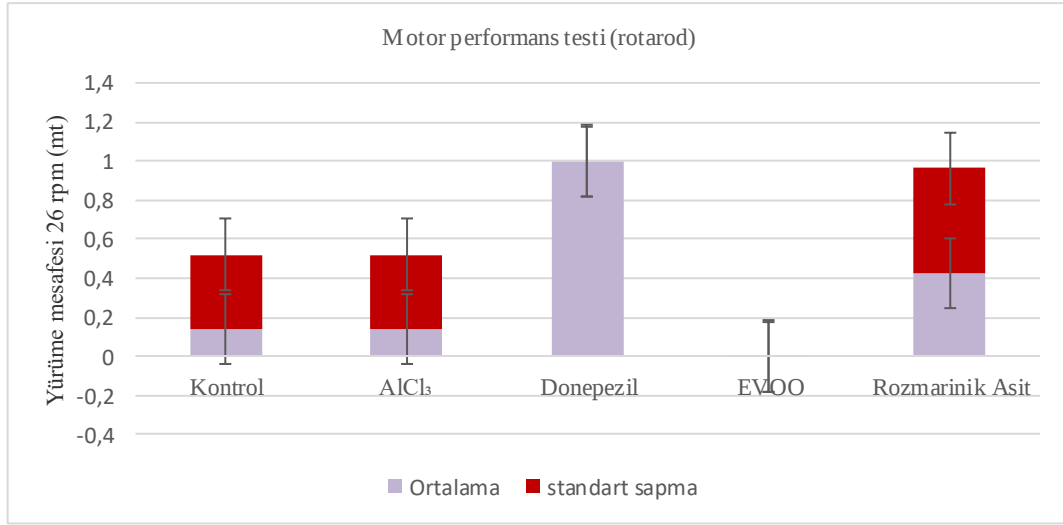
Yükseltilmiş artı labirent testinde katedilen toplam mesafe, açık-kapalı kollar, orta alanda geçirilen süre ve ortalama hızlarda gruplar arası anlamlı fark görülmemiştir.



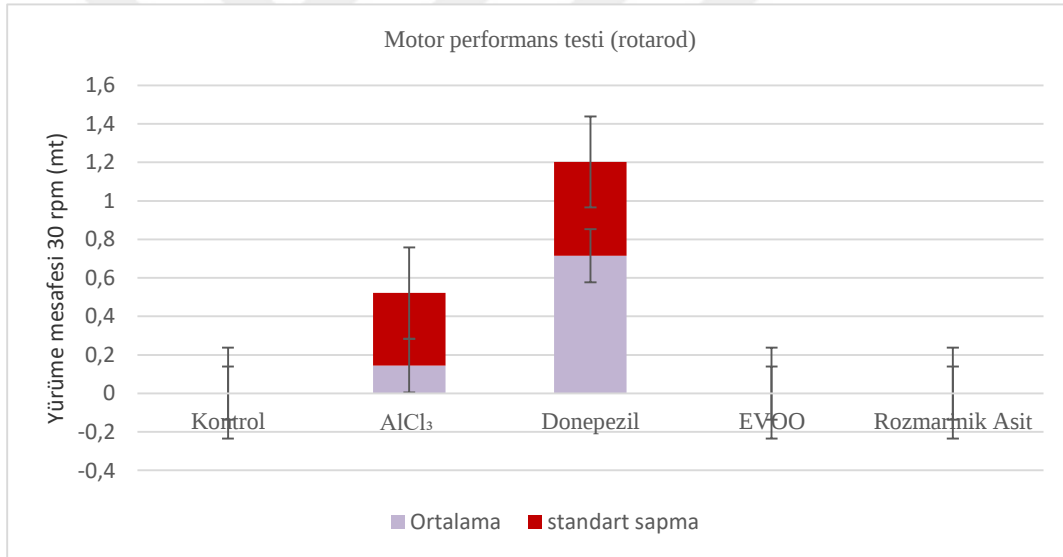
Şekil 3.13. Motor performans testinde 16 rpm hızda toplam yürüme mesafesi.



Şekil 3.14. Motor performans testinde 20 rpm hızda toplam yürüme mesafesi.



Şekil 3.15. Motor performans testinde 26 rpm hızda toplam yürüme mesafesi.

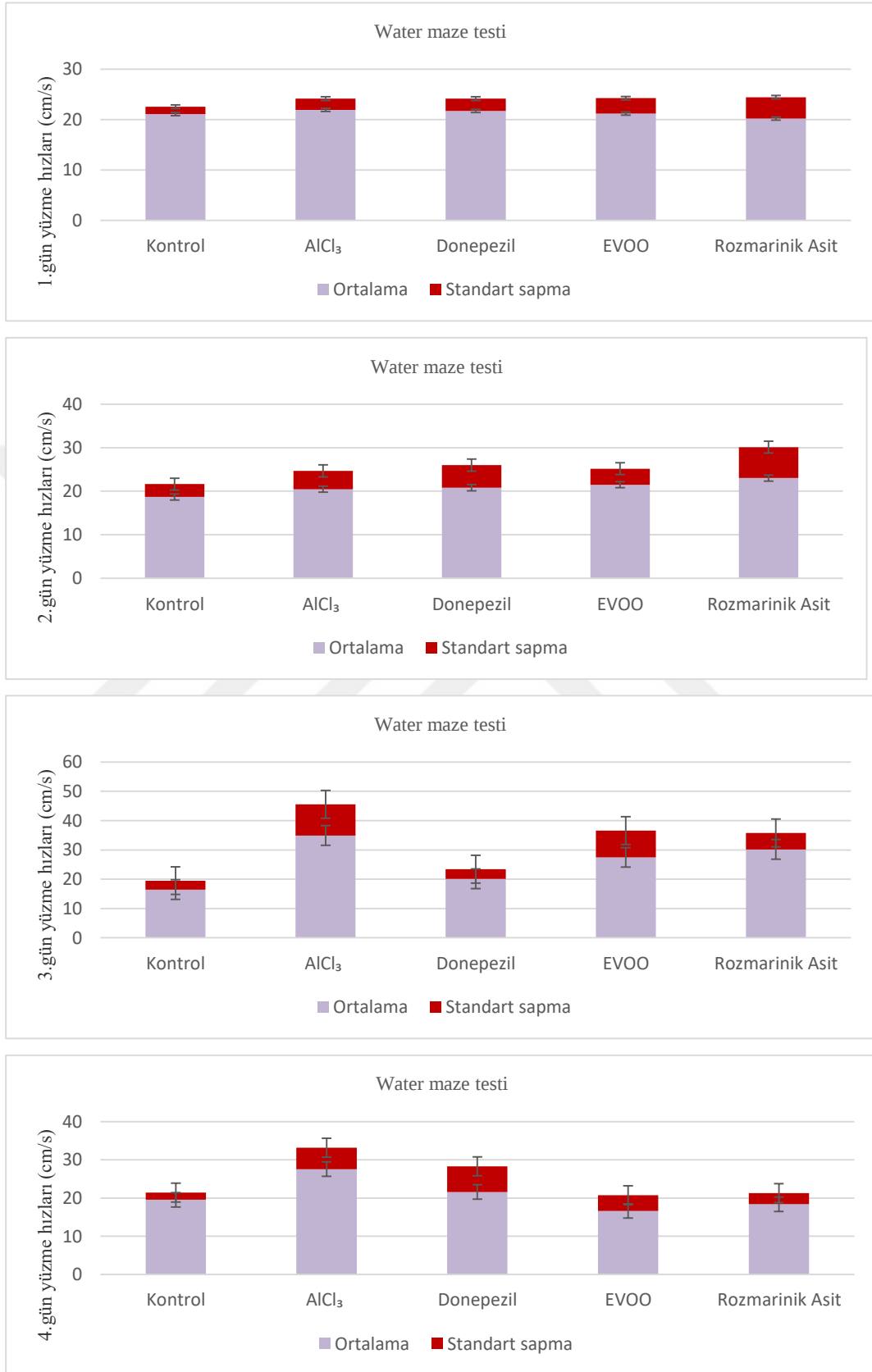


Şekil 3.16. Motor performans testinde 30 rpm hızda toplam yürüme mesafesi.

Çizelge 3.4. Rotarod Motor Performans Testi sonuçları.

Gruplar	16 rpm	20 rpm	26 rpm	30 rpm
Kontrol	,42±,53	,28±,48	,14±,37 ^{a, b}	,00±,00 ^a
AlCl ₃	,28±,48	,14±,37	,14±,37 ^a	,141±,37 ^a
Donepezil	1,00±,00	1,00±,00	1,00±,00 ^b	,71±,481 ^b
EVOO	,83±,40	,50±,54	,001±,00 ^{a, b}	,00±,00 ^a
Rozmarinik asit	,85±,37	,42±,53	,42±,533 ^{a, b}	,00±,00 ^a

^{a, b}: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade eder ($p < 0,05$). Değerler ortalama±standart sapma.

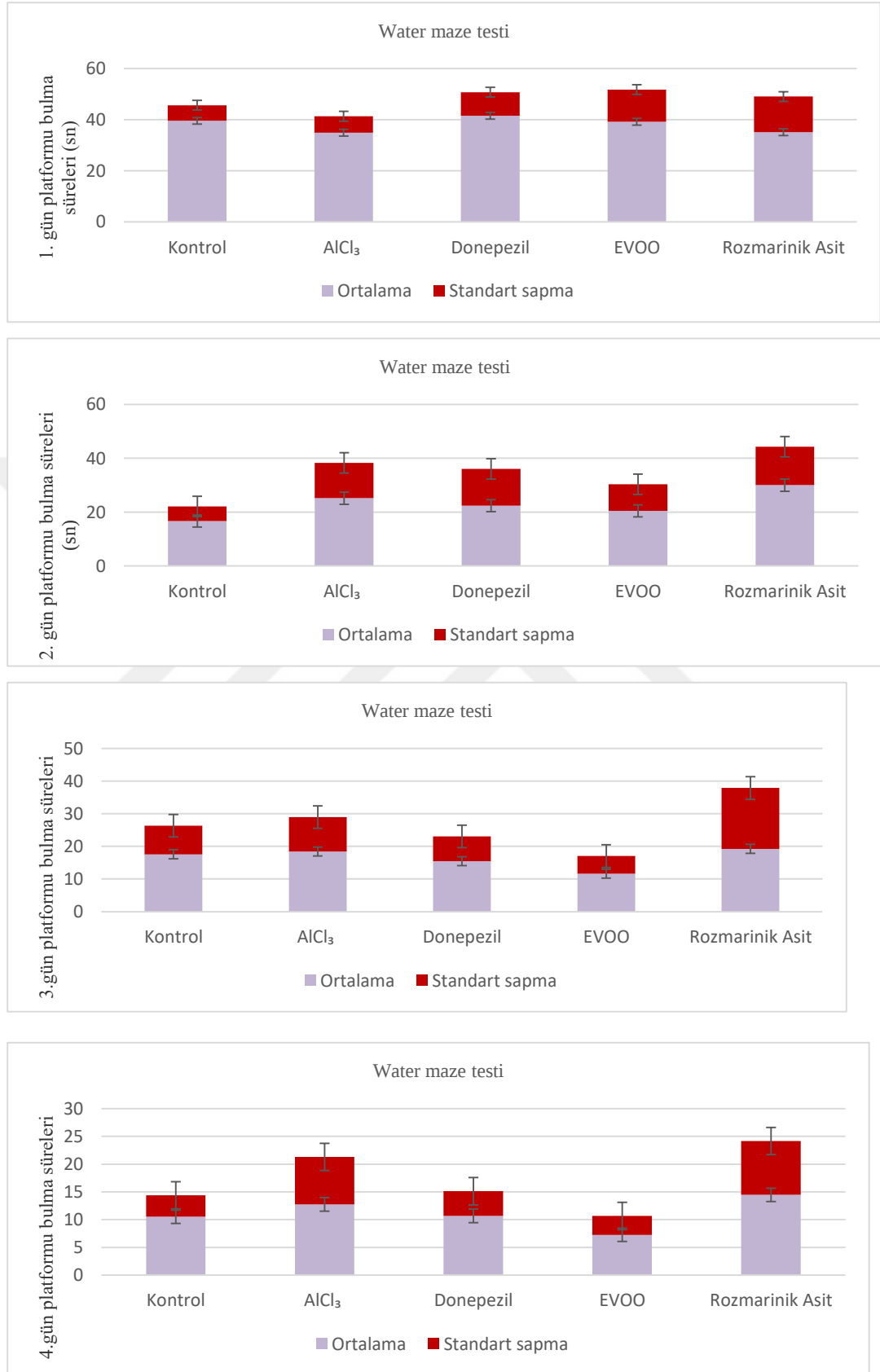


Şekil 3.17. Morris water maze testinde deneyin ilk 4.gününde yüzme hızları.

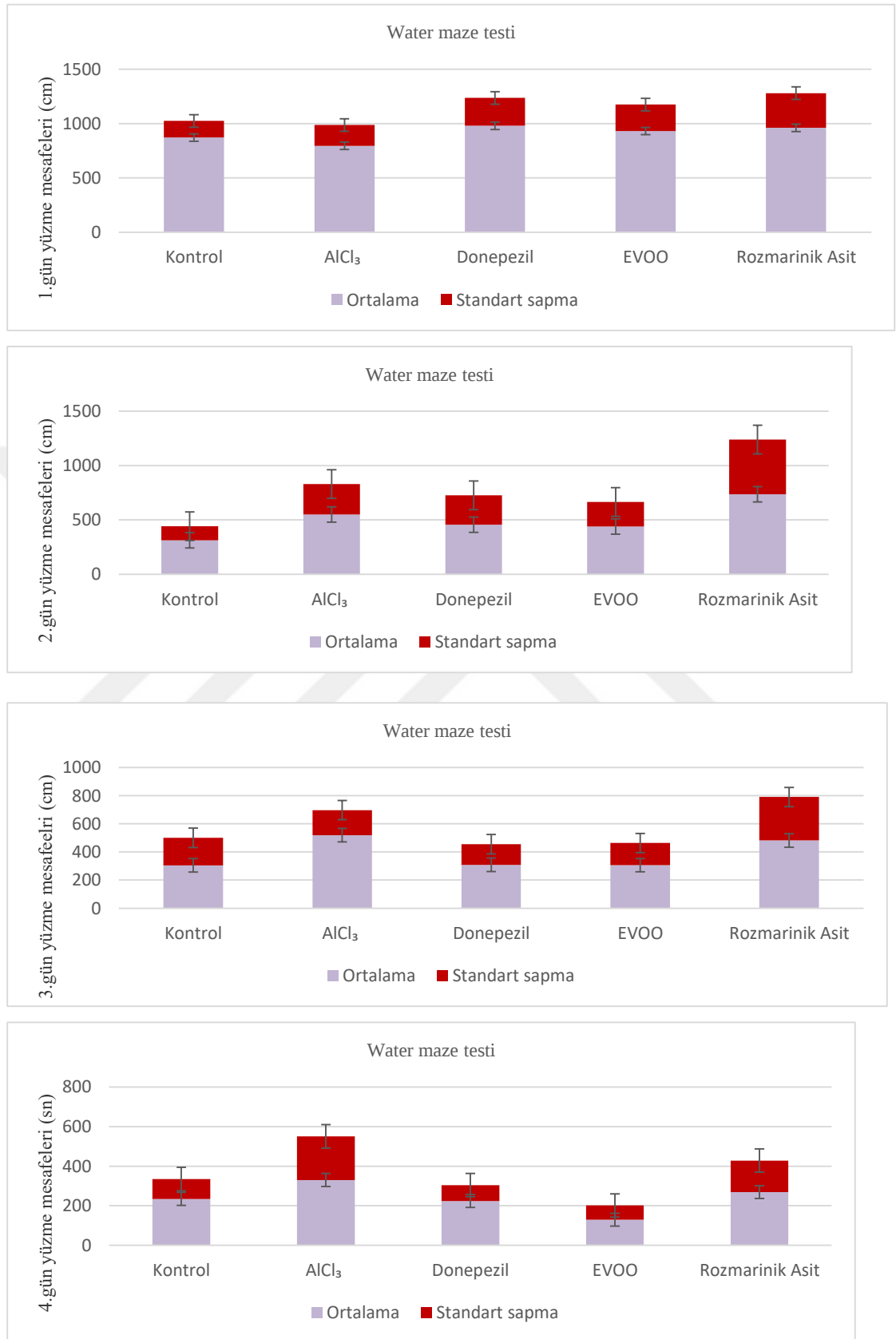
Çizelge 3.5. Morris water maze testinde ilk 4.gün yüzme hızları.

Gruplar	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün
Kontrol	21,07±1,47	18,67±2,95	16,44±3,079 ^a	19,56±1,89 ^a
AlCl₃	21,92±2,23	20,47±4,20	34,93±10,64 ^b	27,55±5,62 ^b
Donepezil	21,69±2,46	20,79±5,19	20,12±3,29 ^{a, b}	21,58±6,71 ^{a, b}
EVOO	21,19±3,05	21,49±3,66	27,45±9,12 ^{a, b}	16,62±4,092 ^{a, b}
Rozmarinik asit	20,18±4,24	23,01±7,09	30,16±5,64 ^{a, b}	18,37±2,88 ^{a, b}

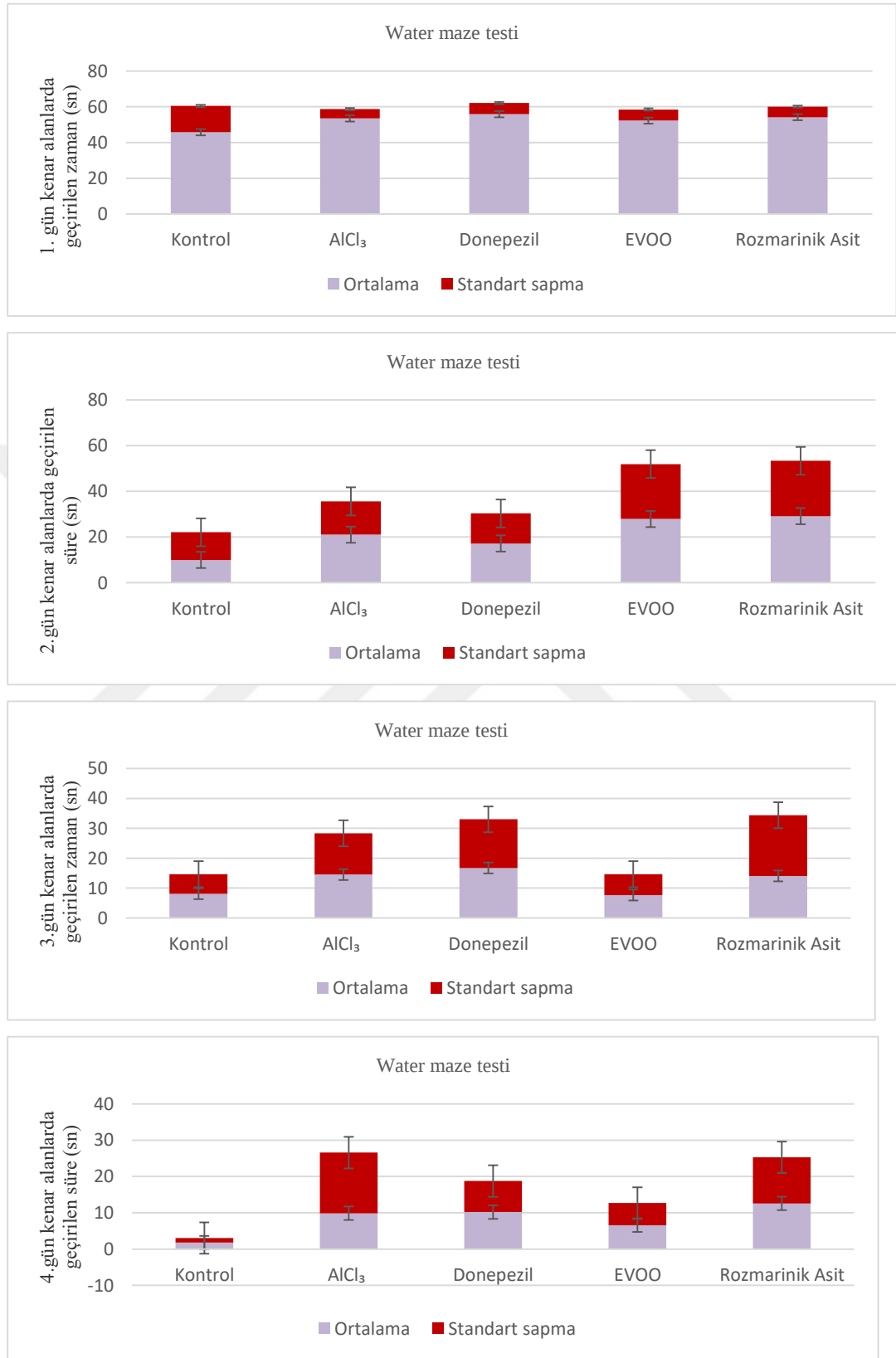
^{a, b}: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade eder (p< 0.05). Değerler ortalama±standart sapma.



Şekil 3.18. Morris Water Maze testinin ilk 4 gününde platform bulma süreleri.



Şekil 3.19. Morris water maze testinin ilk 4 gününde yüzme mesafeleri.



Şekil 3.20. Morris water maze testinde ilk 4 gününde kenar alanlarda geçirilen zaman.

Çizelge 3.6. Water maze testinin ilk 4 gününde platform bulma süreleri (sn).

Gruplar	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün
Kontrol	39,53±6,11	16,69±5,43	17,58±8,71	10,51±3,86
AlCl ₃	34,91±6,39	25,16±13,15	18,40±10,58	12,74±8,54
Donepezil	41,51±9,22	22,42±13,62	15,44±7,64	10,67±4,45
EVOO	39,18±12,57	20,49±9,84	11,60±5,42	7,25±3,39
Rozmarinik asit	35,11±13,91	30,01±14,25	19,25±18,63	14,45±9,71

Morris Water Maze testinin ilk 4 gününde platformu bulma sürelerinde gruplar arası anlamlı fark görülmemiştir.

Çizelge 3.7. Water maze testinin ilk 4 gününde yüzme mesafeleri (cm).

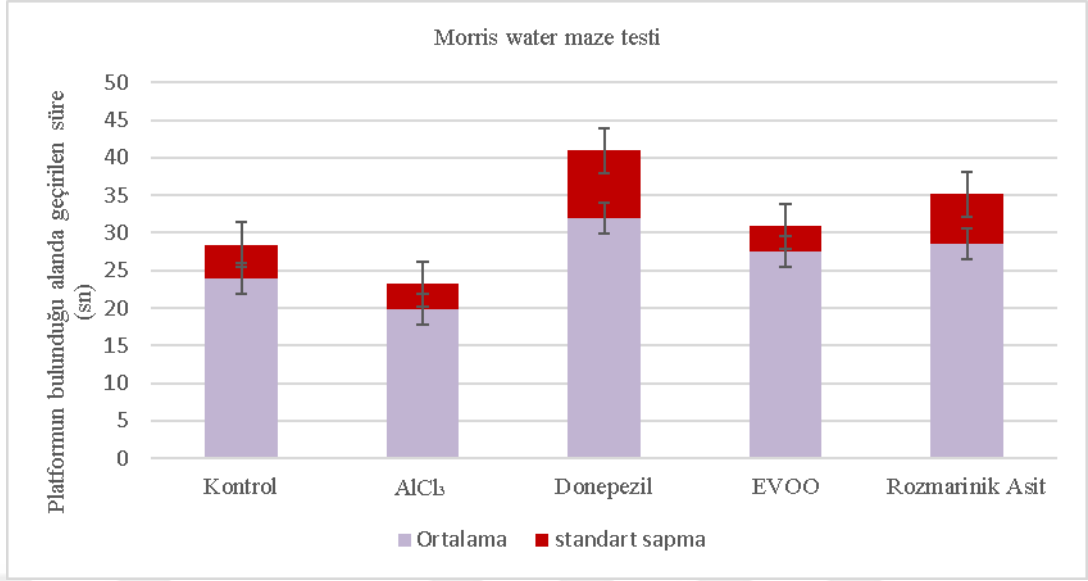
Gruplar	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün
Kontrol	871,20±153,10	312,36±129,21	304,54±195,95	234,59±100,19
AlCl ₃	795,61±191,53	549,92±280,17	519,36±177,64	330,07±220,67
Donepezil	979,46±256,36	456,64±269,72	308,78±146,41	224,36±79,97
EVOO	931,31±243,71	439,35±226,09	306,17±157,32	129,73±71,56
Rozmarinik asit	960,58±318,98	736,78±502,59	481,51±309,09	269,21±159,28

Morris Water Maze testinin ilk 4 gününde yüzme mesafelerinde gruplar arası anlamlı fark görülmemiştir.

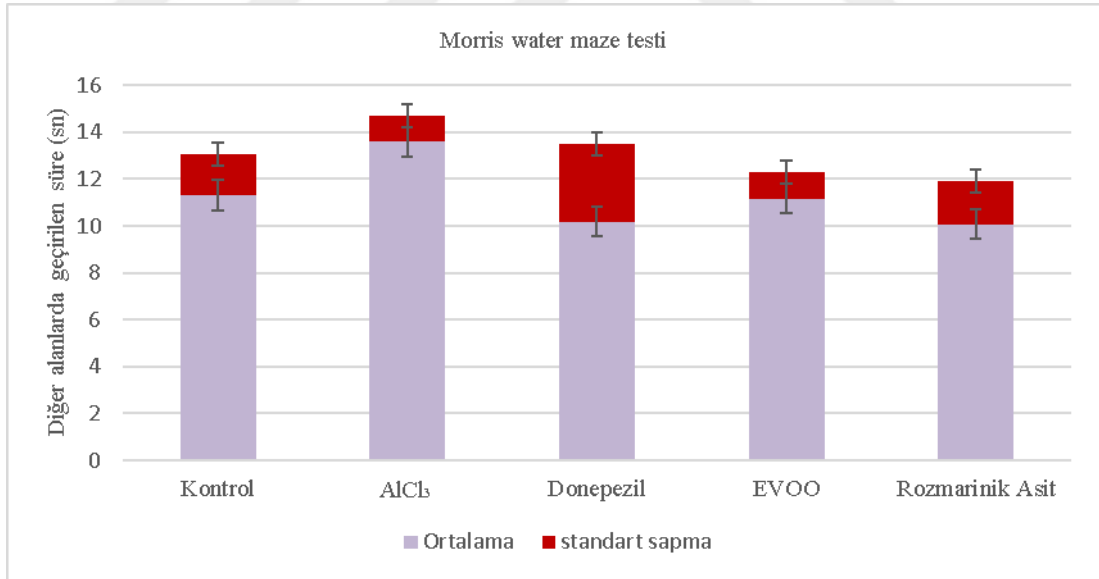
Çizelge 3.8. Morris Water maze testinin ilk 4 gününde kenar alanlarda geçirilen zaman.

Gruplar	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün
Kontrol	45,80±14,69	9,90±12,14	8,10±6,51	1,78±1,28
AlCl ₃	53,54±5,13	21,04±14,53	14,53±13,81	9,86±16,72
Donepezil	55,87±6,21	17,12±13,17	16,70±16,279	10,21±8,54
EVOO	52,28±6,20	27,86±24,03	7,66±7,010	6,60±6,07
Rozmarinik asit	54,18±5,89	29,12±24,22	14,06±20,28	12,58±12,71

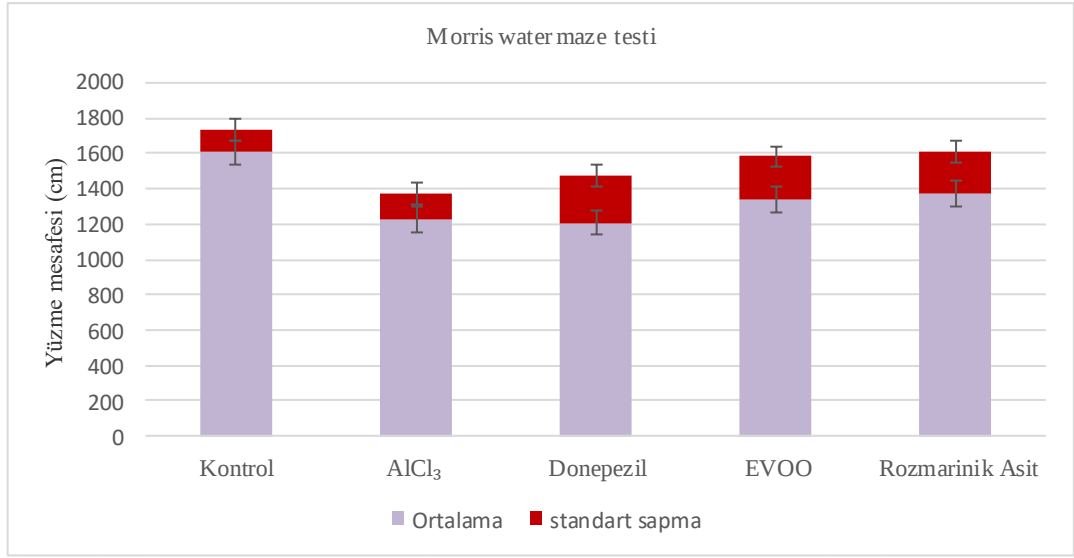
Morris water maze testinde ilk 4 gününde kenar alanlarda geçirilen zamanda gruplar arası anlamlı fark görülmemiştir.



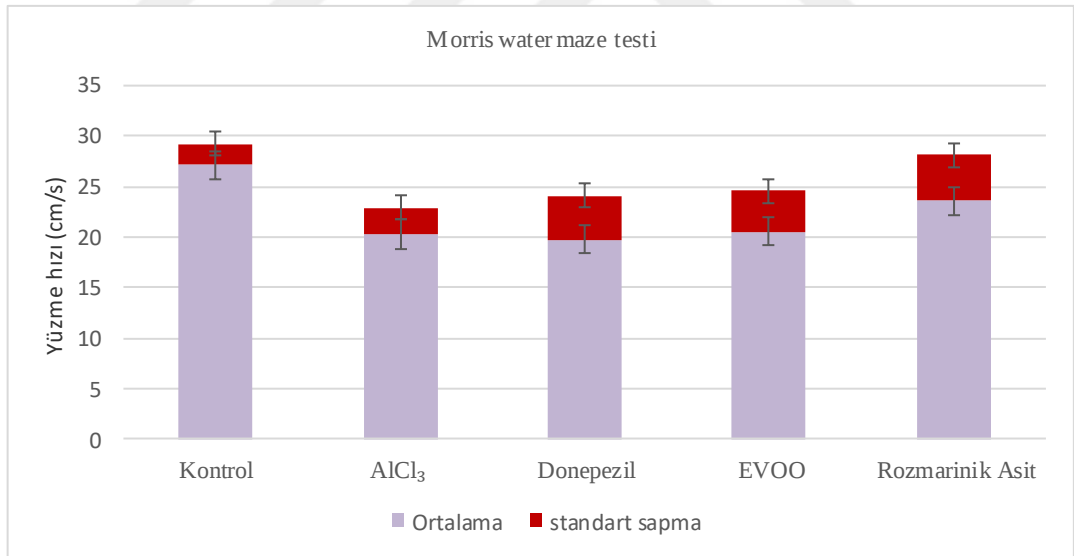
Şekil 3.21. Morris water maze testinin 5.gününde platformun bulunduğu alanda geçirilen süre.



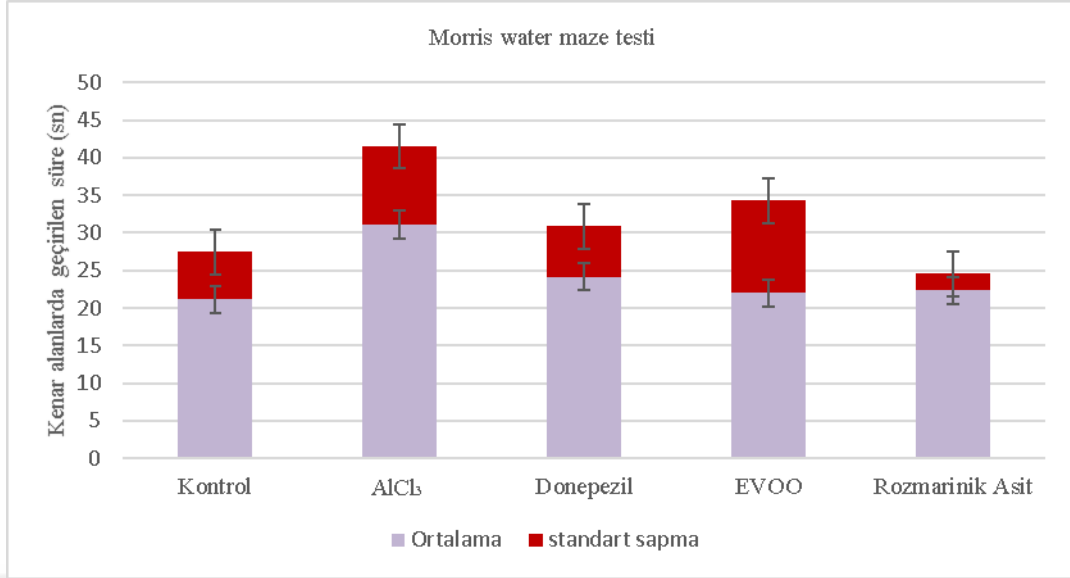
Şekil 3.22. Morris water maze testinin 5.gününde diğer alanlarda geçirilen süre.



Şekil 3.23. Morris water maze testinin 5.gününde yüzme mesafeleri.



Şekil 3.24. Morris water maze testinin 5.gününde yüzme hızları.



Şekil 3.25. Morris water maze testinin 5.gününde kenar alanlarda geçirilen süre.

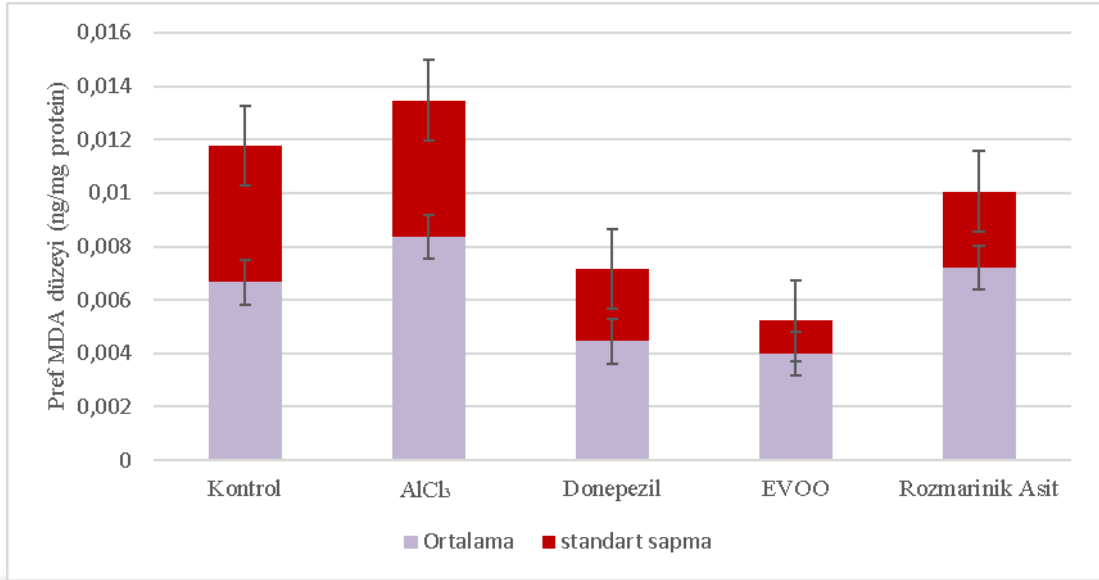
Çizelge 3.9. Morris Water Maze testinin 5.gün sonuçları.

Gruplar	Platformun bulunduğu alanda geçirilen süre (s)	Diğer platformlarda geçirilen süre (s)	Yüzme mesafesi (cm)	Yüzme hızı (cm/s)	Kenar alanlarda geçirilen süre (s)
Kontrol	23,89±4,52 ^{a, b}	11,31±1,73	1604,82±128,51	27,10±2,10	21,15±6,28
AlCl ₃	19,80±3,37 ^a	13,59±1,09	1227,42±148,53	20,27±2,63	31,08±10,40
Donepezil	31,89±9,05 ^b	10,19±3,31	1207,30±263,33	19,77±4,31	24,11±6,73
EVOO	27,52±3,32 ^{a, b}	11,17±1,10	1335,89±246,51	20,51±4,03	21,98±12,28
Rozmarinik asit	28,49±6,62 ^{a, b}	10,06±1,84	1376,38±230,69	23,57±4,53	22,29±2,25

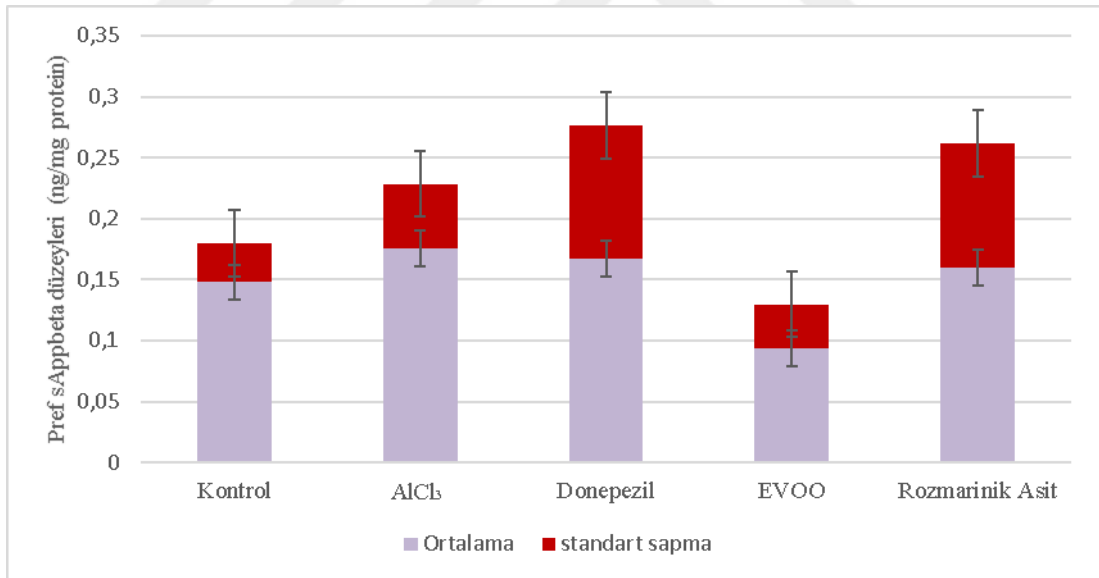
^{a, b}: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade eder ($p < 0,05$). Değerler ortalama±standart sapma.

3.3. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

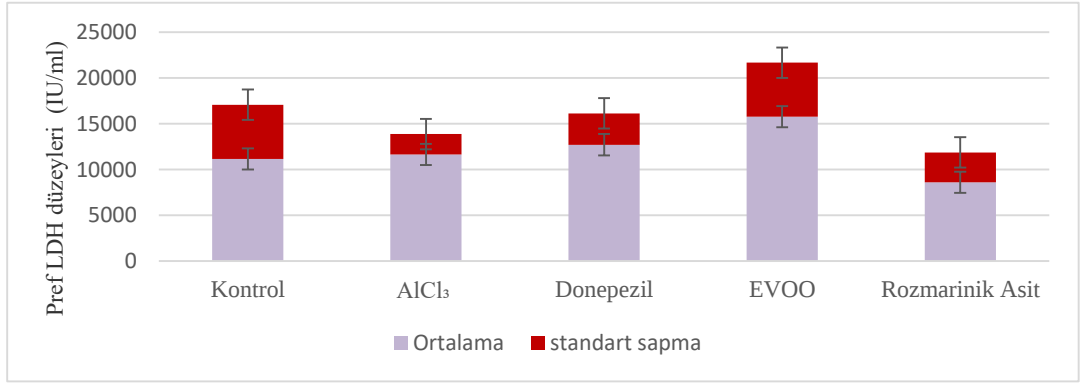
Sıçanların prefrontal korteks, hipokampus ve serum biyokimyasal analiz sonuçları Şekil 3.26 – Şekil 3.38 ve Çizelge 3.10 – Çizelge 3.12’de verilmiştir.



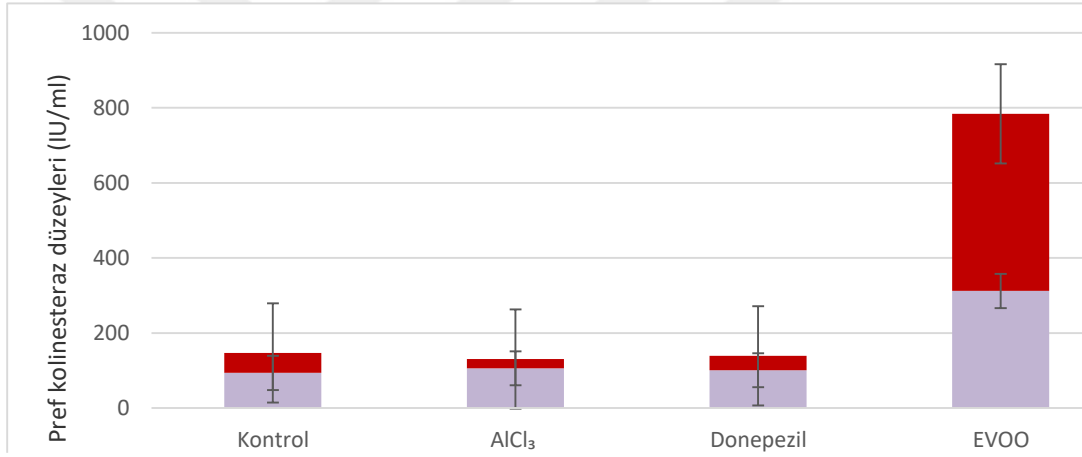
Şekil 3.26. Prefrontal korteks MDA düzeyleri.



Şekil 3.27. Prefrontal korteks sAppbeta protein düzeyleri.



Şekil 3.28. Prefrontal korteks LDH enzim düzeyleri.

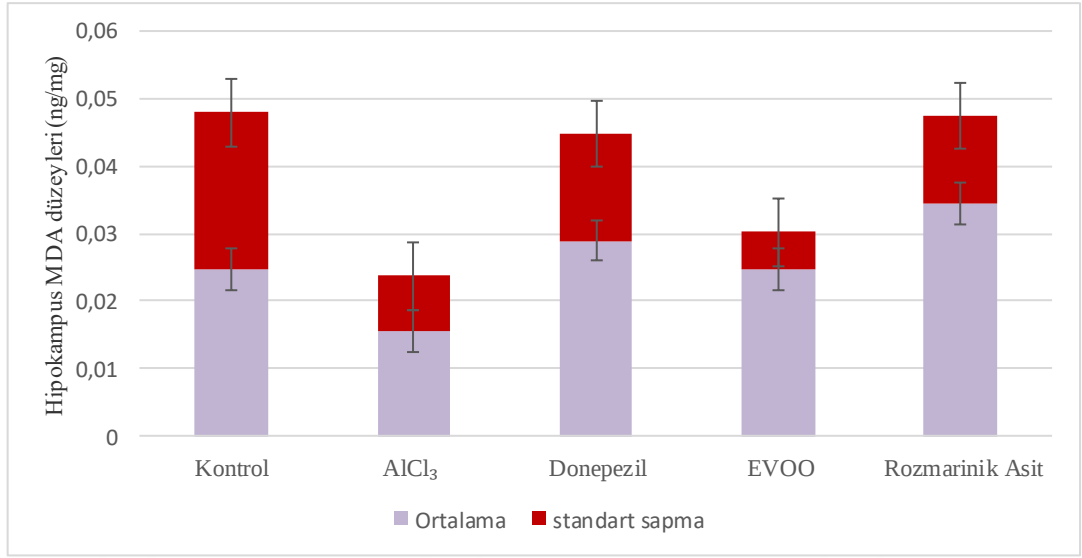


Şekil 3.29. Prefrontal korteks kolinesteraz enzim düzeyleri.

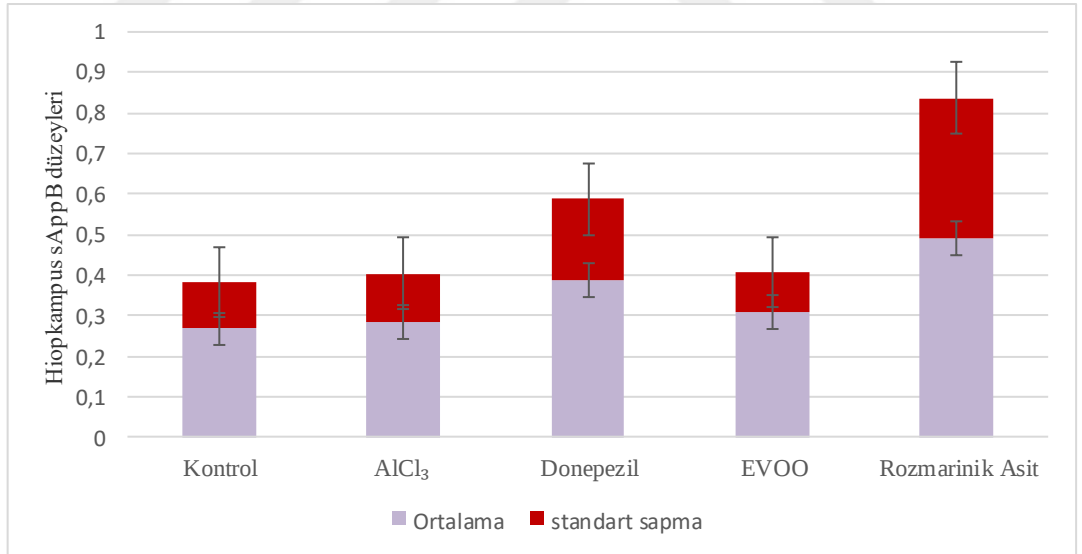
Çizelge 3.10. Prefrontal korteks biyokimya analiz sonuçları.

Gruplar	MDA ng/mg protein	sAppbeta ng/mg protein	LDH	Kolinesteraz
Kontrol	,006±,001	,1477±,0322	11148,33±5924,61	94,00±52,78
AlCl ₃	,008±,005	,175±,053	11643,33±2221,60	106,17±24,95
Donepezil	,0044±,002	,167±,109	12704,25±3425,95	101,00±38,02
EVOO	,004±,001	,0933±,0364	15763,20±5902,21	312,40±471,62
Rozmarinik asit	,007±,002	,1596±,101	8603,20±3251,96	55,60±29,21

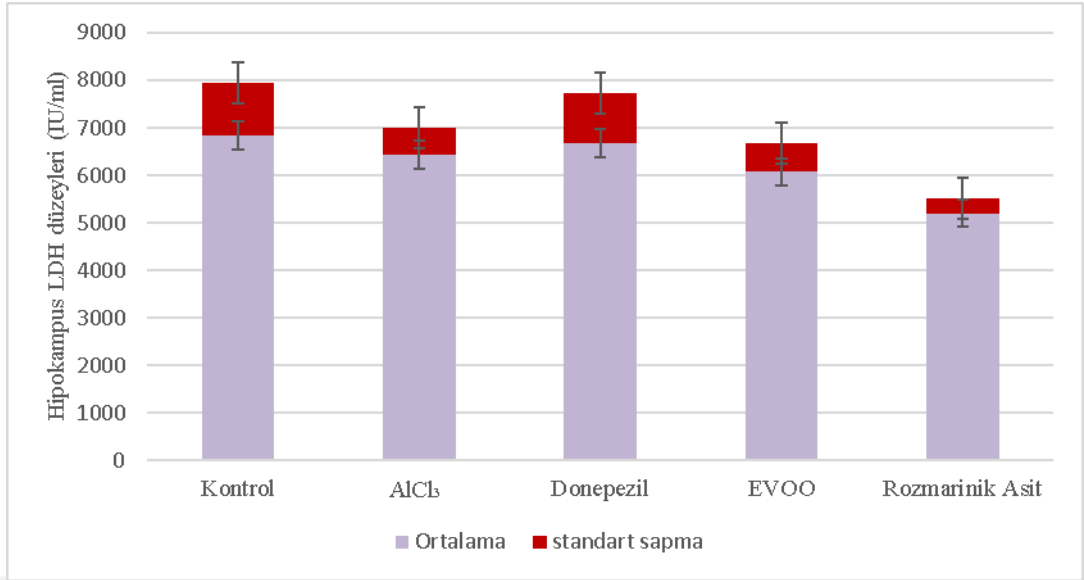
Prefrontal korteks MDA, sAppbeta, LDH ve Kolinesteraz analiz sonuçlarında gruplar arası anlamlı fark bulunamamıştır.



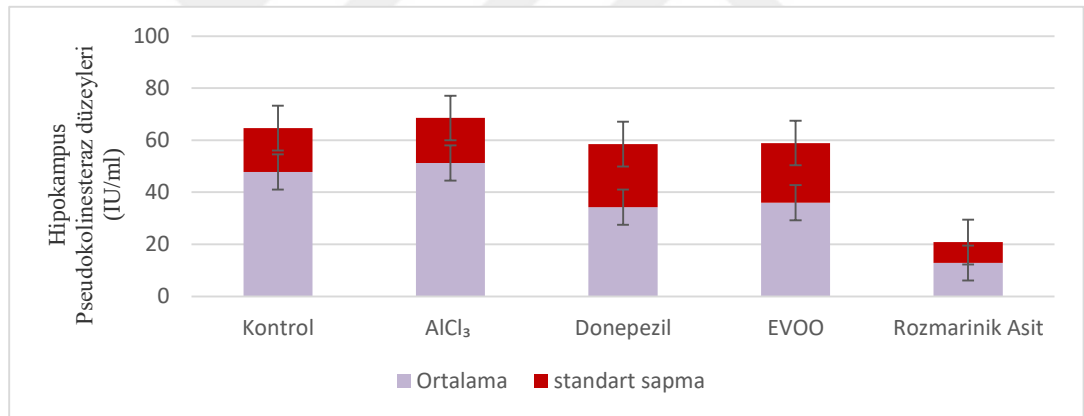
Şekil 3.30. Hipokampus MDA düzeyleri.



Şekil 3.31. Hipokampus sAppbeta protein düzeyleri.



Şekil 3.32. Hipokampus LDH enzim düzeyleri.

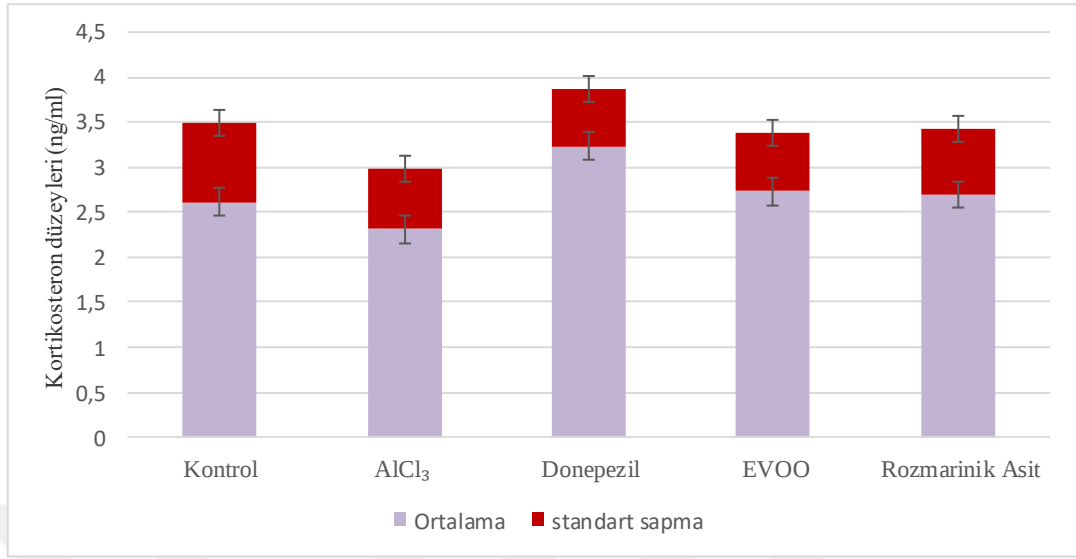


Şekil 3.33. Hipokampus kolinesteraz enzim düzeyleri.

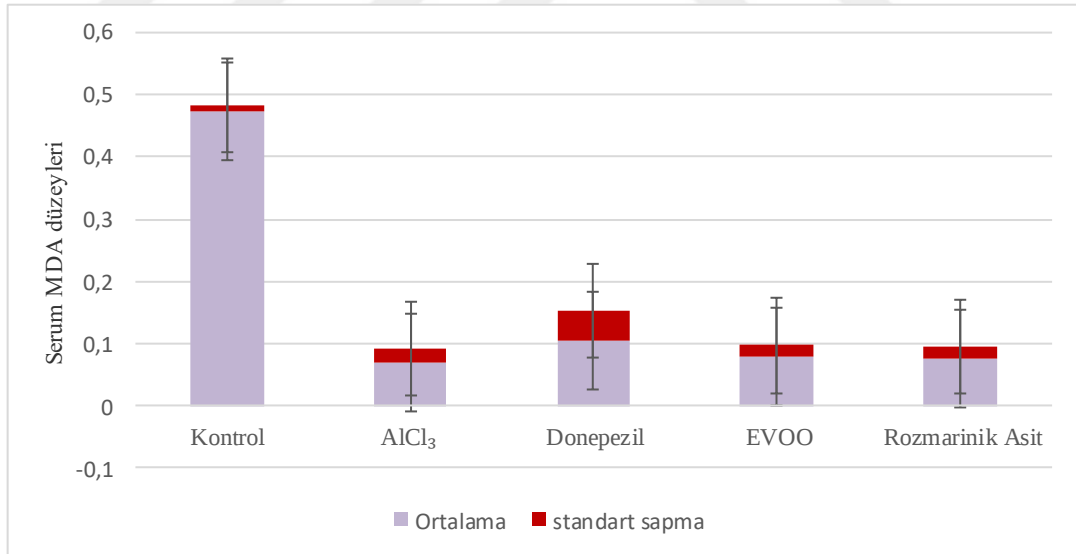
Çizelge 3.11. Hipokampus biyokimya analiz sonuçları

Gruplar	MDA ng/mg protein	sAppbeta ng/mg protein	LDH	Kolinesteraz
Kontrol	,0156±,007	,282±,122	6433,2±568,85 ^a	51,20±14,97
AlCl ₃	,0174±,008	,294±,098	5119,0±664,03 ^b	20,80±12,19
Donepezil	,0271±,014	,352±,190	6635,±887,59 ^{a, b}	35,60±21,20
EVOO	,0258±,005	,330±,094	6030,±646,52 ^{a, b}	35,00±25,45
Rozmarinik asit	,0253±,015	,491±,346	5200±305,997 ^{a, b}	12,80±8,04

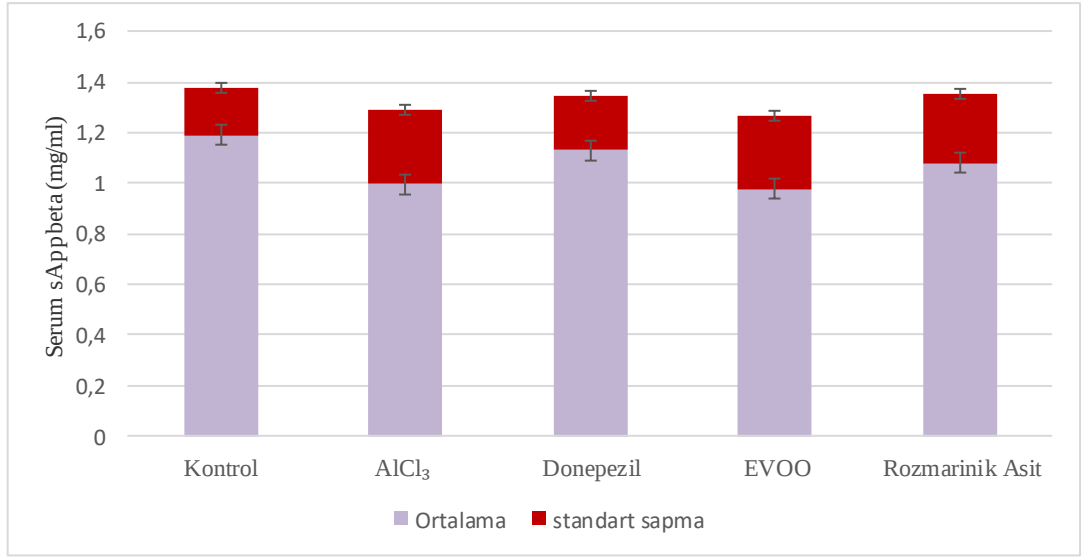
^{a, b, c}: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade eder (p< 0,05). Değerler ortalama±standart sapma.



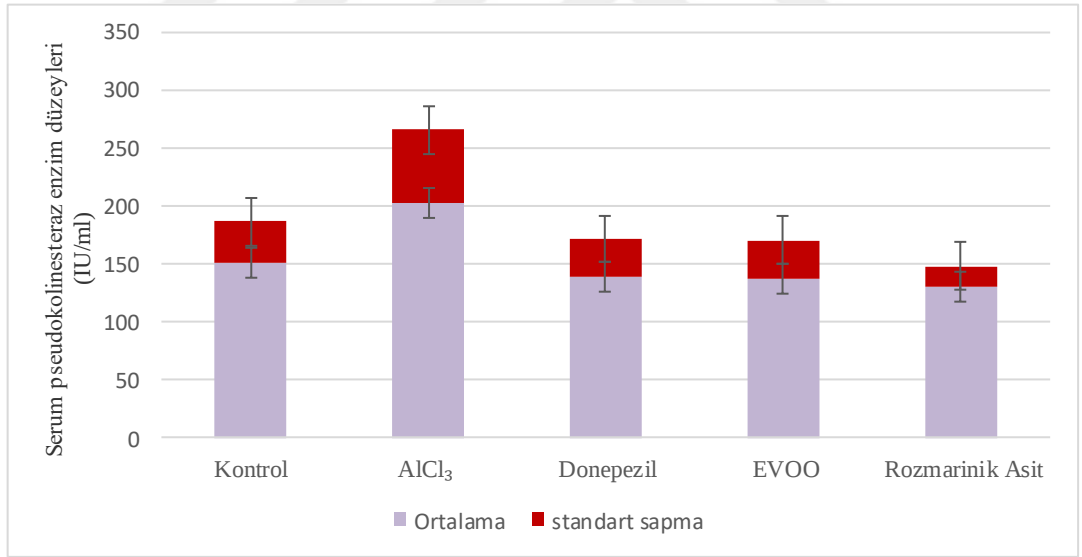
Şekil 3.34. Serum kortikosteron düzeyleri.



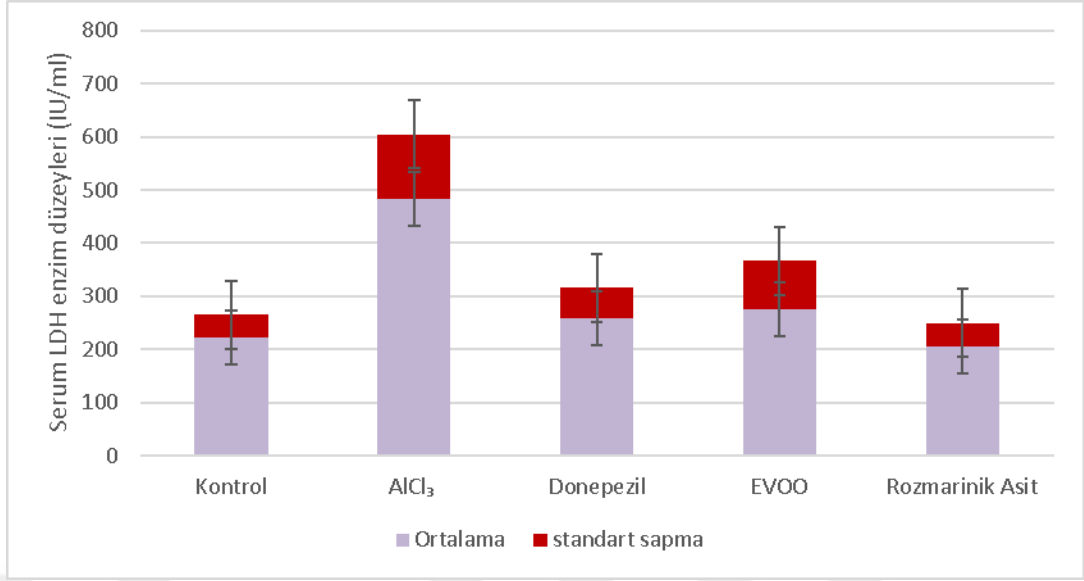
Şekil 3.35. Serum MDA düzeyleri.



Şekil 3.36. Serum sAppbeta protein düzeyleri.



Şekil 3.37. Serum kolinesteraz enzim düzeyleri.



Şekil 3.38. Serum LDH enzim düzeyleri.

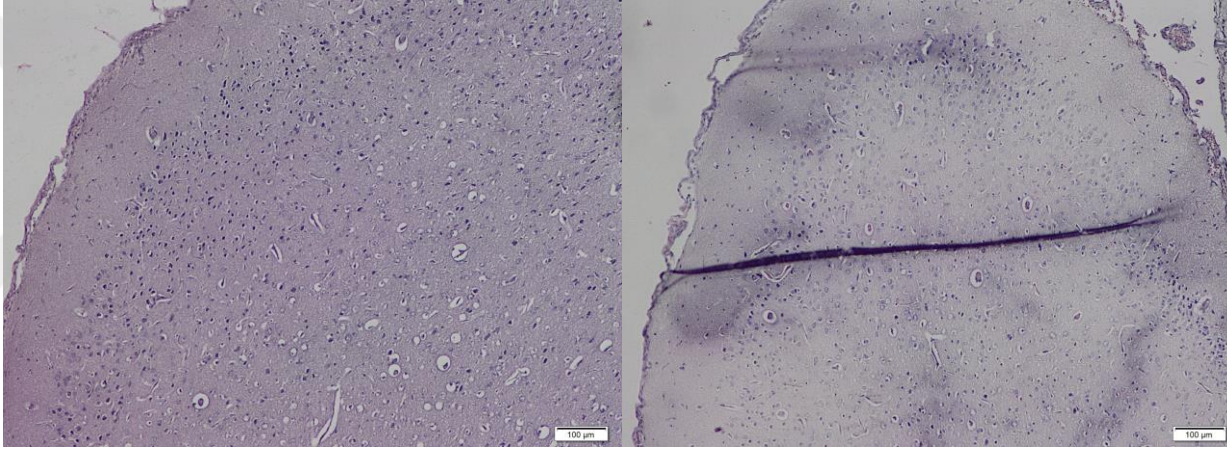
Çizelge 3.12. Serum biyokimyasal analiz sonuçları.

Gruplar	Kortikosteron	MDA ng/ml protein	sAppbeta ng/ml protein	LDH	Kolinesteraz
Kontrol	2,61±,88	,034±,001 ^a	1,18±,188	221,75±43,56 ^a	150,60±36,35
AlCl ₃	2,31±,66	,070±,021 ^b	,996±,295	484,00±121,29 ^b	202,40±63,76
Donepezil	3,23±,64	,104±,047 ^{a, b}	1,12±,212	258,00±57,98 ^a	139,80±31,87
EVOO	2,73±,65	,077±,019 ^{a, b}	,976±,292	275,80±90,83 ^a	137,20±33,63
Rozmarinik asit	2,70±,72	,075±,020 ^{a, b}	1,07±,27	205,00±44,98 ^a	130,40±17,77

^{a, b, c}: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade eder ($p < 0,05$). Değerler ortalama±standart sapma

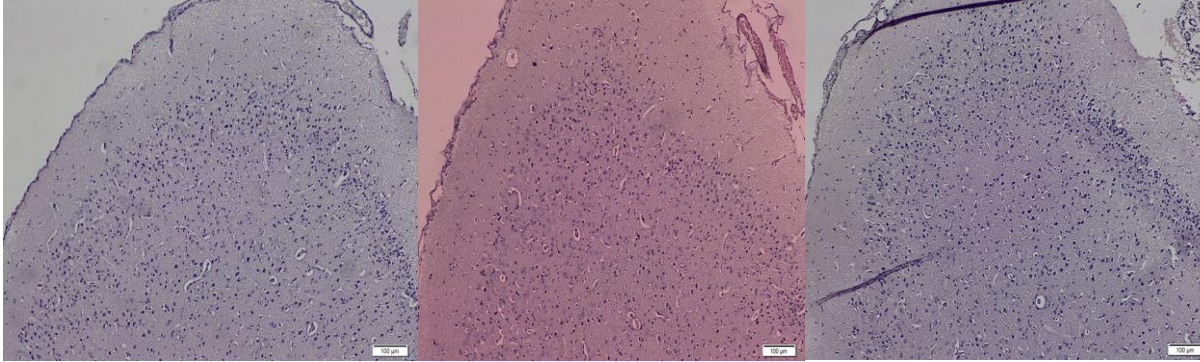
3.4. Histopatoloji Analiz Sonuçları

Sıçanların prefrontal korteks ve hipokampus histopatoloji analiz sonuçları Şekil 3.39 – Şekil 3.44’de verilmiştir.



Kontrol grubu

AlCl₃ grubu

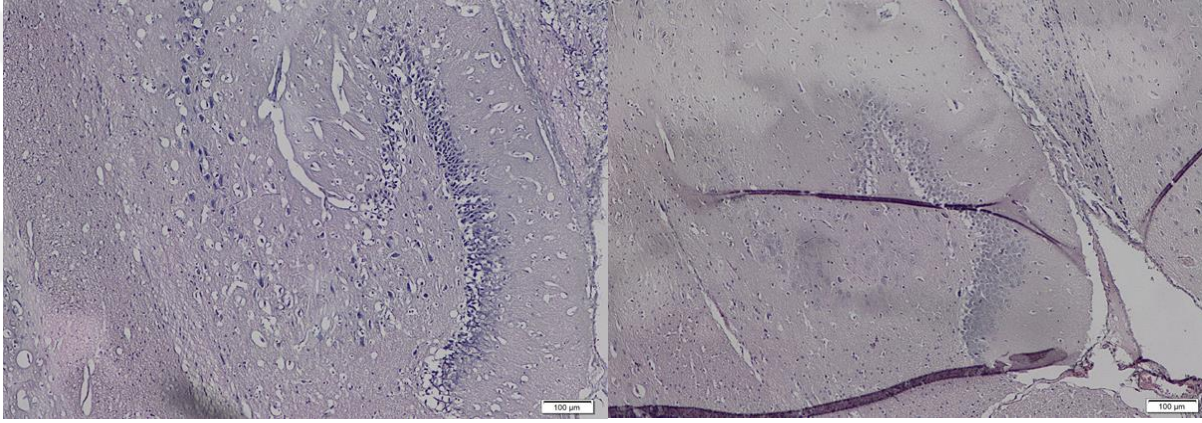


Donepezil grubu

EVOO grubu

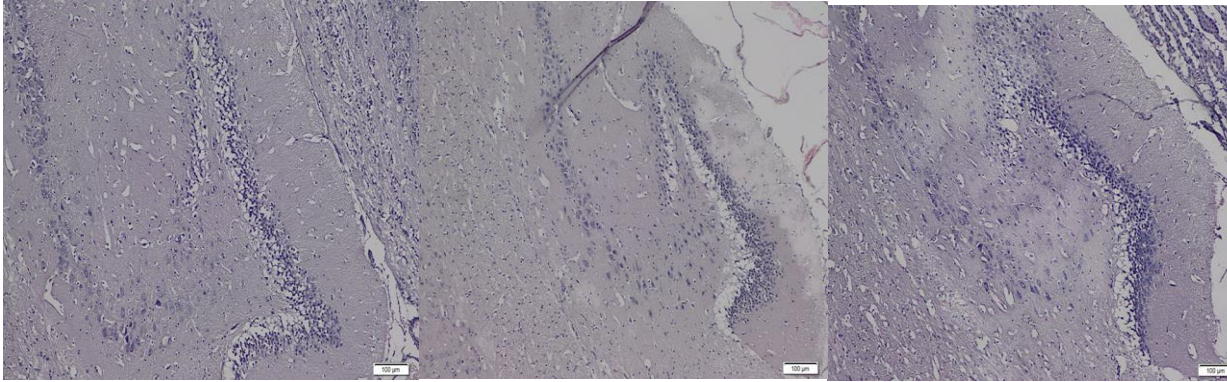
Rozmarinik asit grubu

Şekil 3.39. Kontrol, AlCl₃, donepezil, EVOO ve rozmarinik asit gruplarının prefrontal korteks dokularının Hematoksilen&Eozin ile boyanmış görünümü. AlCl₃ grubunda kortekte atrofi, nöronal hücre yoğunluğunun azalması ve gliosis görülmektedir (x100).



Kontrol grubu

AlCl₃ grubu

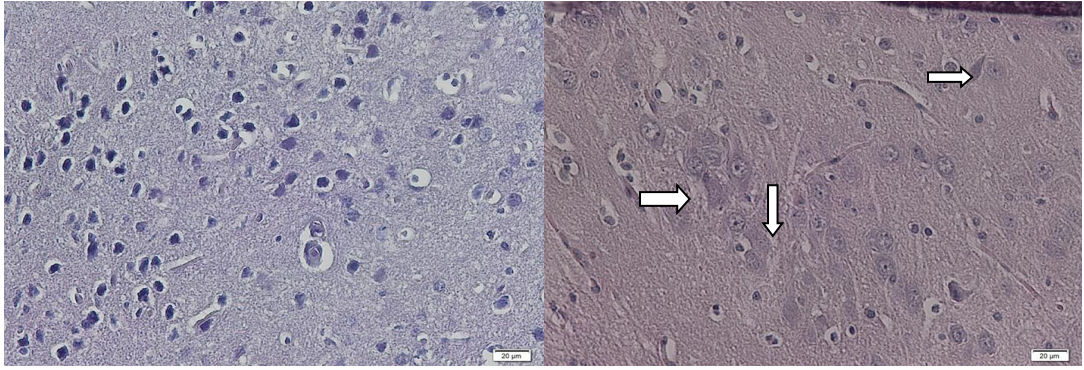


Donepezil grubu

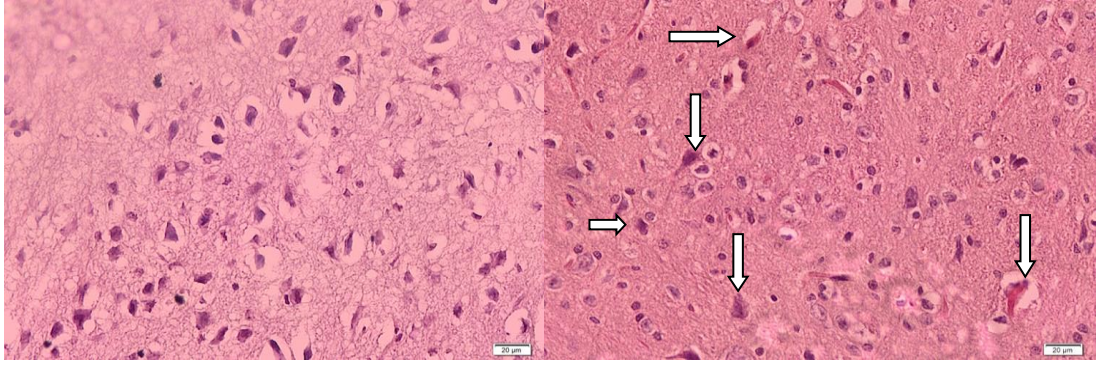
EVOO grubu

Rozmarinik asit grubu

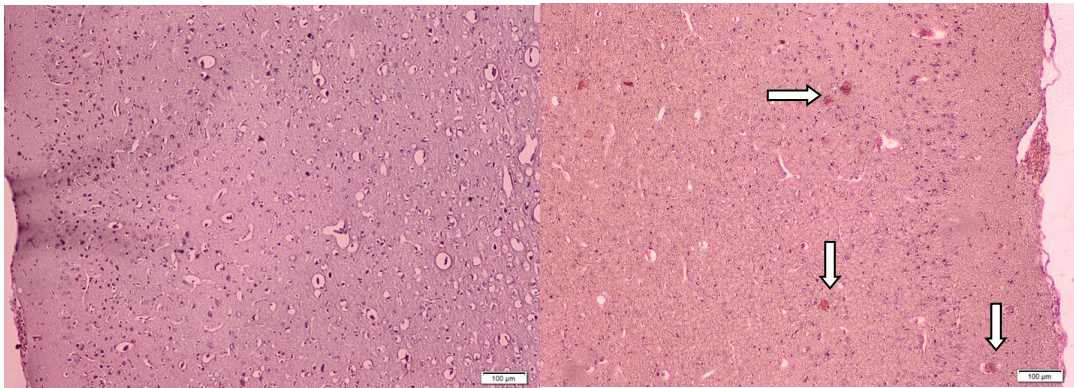
Şekil 3.40. Kontrol, AlCl₃, donepezil, EVOO ve rozmarinik asit gruplarının hipokampus dokularının Hematoksilen&Eozin ile boyanmış görünümü. AlCl₃ grubunda nöronal hücre yoğunluğunun azalması ve gliosis görülmektedir (x100).



Şekil 3.41. Kontrol ve AlCl_3 gruplarının hipokampus dokularının Hematoksilen&Eozin ile boyanmış görünümü. Alzheimer grubunda hücre sitoplazmasında bazofilik boyanma şeklinde nörofibriler yumak görülmektedir (x400).



Şekil 3.42. Kontrol ve AlCl_3 gruplarının hipokampus dokularının Congo Red ile boyanmış görünümü. AlCl_3 grubunda congo red ile pozitif boyanmış hücre sitoplazması görülmektedir (x400).



Şekil 3.43. Kontrol ve AlCl_3 gruplarının prefrontal korteks dokularının Congo Red ile boyanmış görünümü. AlCl_3 grubunda congo red ile pozitif boyanmış hücreler görülmektedir (x100).

4. TARTIŞMA

4.1. İzlem Sonuçları

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, deney öncesi ağırlıkları homojen olan hayvanlara 15 gün boyunca günde oral 100 mg/kg $AlCl_3$ uygulaması sonunda hayvanların ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı saptanmıştır (Şekil 1, Çizelge 1). Aynı şekilde 15 gün $AlCl_3$ maruziyeti ve 21 günlük donepezil, EVOO ve rozmarinik asit tedavi uygulamaları sonunda da hayvanların ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemiştir (Şekil 1, Çizelge 1). Kilo kaybı ve yetersiz beslenme, 1907'de Alois Alzheimer tarafından tanımlanan AH'nın bir parçası olarak açıklanan özelliklerdir. O zamandan beri, bir dizi çalışmada Alzheimer hastalarının diğer demans çeşitlerine sahip hastalara (SINGH ve ark., 1988), diğer hasta gruplarına (Cronin-Stubbs ve ark., 1997) ya da aynı yaş grubundaki sağlıklı insanlara kıyasla daha sık kilo verdiklerini göstermişlerdir (Stewart ve ark., 2005). Ayrıca araştırmalar AH'nda kilo kaybının sadece ağır hastalarla sınırlı olmadığını, aynı zamanda ılımlı vakalarda da ortaya çıkabileceğini göstermiştir (Cronin-Stubbs ve ark., 1997). Fakat bu çalışmada; kontrol, Alzheimer ve tedavi gruplarımız arasında istatistiksel olarak anlamlı ağırlık değişikliği gözlenmemiştir. Bunun sebebi; $AlCl_3$ uygulamasının 15 gün tercih edilmesi sonucu orta-şiddetli düzeyde Alzheimer patolojisi oluşturacak değişikliklerin gerçekleşmemesine bağlı olabilir ve yine bu kadar kısa sürede belirgin bir ağırlık kaybının oluşmamasının da normal olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda organ ağırlığının vücut ağırlığına oranının stresle indüklenen organ ağırlığı değişikliklerini göstermede en yaygın olarak kullanılan endeks olduğu kabul edilir. Stresli sıçanlarda timusun sadece rölatif değil, aynı zamanda mutlak ağırlığının da azaldığı bilinmektedir. Buna göre, mutlak timus ağırlığı, strese tepki olarak oluşturulan biyolojik göstergeler olarak

kullanılabilir (Hara ve ark., 1981). İç ya da dış stres faktörleriyle karşılaşıldığında bu durumlarla başa çıkabilmek için adrenal korteksten insanlarda ve köpeklerde kortizol (Carballo ve ark., 2020), kemirgenlerde kortikosteron salgınır (Axelrod ve ark., 1984). Kortikosteronun immun sistem fonksiyonu üzerinde sayısız etkisi olduğu bilinmektedir ve timus bezi de bu etkilerin oluşmasında merkezi bir rol oynar (Dougherty ve ark., 1964; Munck ve ark., 1984). Yüksek plazma glukokortikoid düzeyleri çoğunlukla stresin göstergesi olarak kabul edilir; artan adrenokortikal aktivite strese karşı gerçekleşen fizyolojik bir yanıttır (Izadi ve ark., 2018). Timus bezi ağırlığı ise glukokortikoidlerin timus hücreleri üzerine apoptotik etkilerini gösteren en önemli belirteçlerden biridir (Safaeian ve ark., 2014). Bir başka çalışmada, tekrarlayan dozda toksikasyona maruz kalmanın timus ağırlığını azalttığı bildirilmiştir (Feuston ve ark., 1994). Aynı zamanda strese maruz kalmak da timus bezinde atrofiye sebep olur (Akana ve ark., 1985). Kronik stres modellerinde de timus atrofisi adrenokortikotropik hormon (ACTH) ya da kortikosteron seviyesindeki artıştan bağımsız atrofiye uğrayabilir, bu da 7. gün başlayıp 28. güne kadar sürer (Paskitti ve ark., 2000).

Bu çalışmanın sonuçlarına göre kontrol, Alzheimer ve tedavi gruplarının rölatif adrenal ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 6, Çizelge 1); fakat rölatif timus ağırlıklarında kontrol grubuna göre AlCl₃ grubunda anlamlı bir azalma, donepezil ve EVOO tedavi gruplarında ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür (Şekil 7, Çizelge 1). İnsan, hayvan ve in vitro çalışmalarda EVOO'da bulunan fenolik bileşiklerin serbest radikal oluşumu gibi oksijen metabolizmasının toksik etkilerini temizleyebilen ve böylece hücreleri oksidatif hasara karşı koruyabilen antioksidan moleküller olduğu gösterilmiştir (Montedoro ve ark., 1992). Aynı zamanda diyetle EVOO tüketilmesinin davranış ve kognisyona olumlu etkileri olduğu da öne sürülmüştür (Tripoli ve ark., 2005). Donepezil de, hafif ve orta şiddette Alzheimer hastalığında nöropsikiyatrik semptomların şiddetini azaltmada önemli etkinlik gösterir (Doody ve ark., 2001). Sadece bilişsel bozukluğun iyileşmesine katkıda bulunmakla kalmayıp, aynı zamanda arzu edilen yaşam kalitesini koruma, hatta artırma gibi olumlu etkileri de bulunur (Feldman ve ark., 2001). Bu çalışmada, EVOO ve donepezil tedavi

gruplarında kontrol grubuna göre rölatif timus ağırlığının arttığı ve AlCl₃ grubunda kontrol grubuna göre rölatif timus ağırlığının azaldığı görülmüştür. Bu sonuç, literatürde EVOO ve donepezil kullanımının stresin negatif etkilerini azalttığı sonucuyla tutarlıdır.

4.2. Davranış Testi

Çalışmamızda açık alan testinin orta alanında ve kenarlarda geçirilen sürede ve katedilen toplam mesafede gruplar arası anlamlı fark görülmemiştir ( ekil 8-11,  izelge 2). Benzer şekilde yükseltilmiş artı labirent testinde de açık ve kapalı kollarda geçirilen s relerde gruplar arası anlamlı fark görülmemiştir ( ekil 12-16,  izelge 3). Açık alan testi, koşullanma olmayan anksiyeteyi ölçmek amacıyla ilk olarak 1936 yılında tanımlanmış ve kullanılmıştır (Hall, 1936). Süresi değişkenlik göstermekle birlikte çoğunlukla 5 ya da 10 dk boyunca yapılmaktadır. Açık alan testi sonuçlarının değerlendirilmesinde kemirgenlerin açık ve geniş alanda gezinmekten kaçınma davranışları temel alınır (Candland ve ark., 1969).

Açık alan testinde hayvanın orta alandan kaçınması anksiyetenin bir göstergesi olarak kabul edilir. Thigmotaksis, duvara yakın bölümlerde zaman geçirme isteği olarak tanımlanmakta ve anksiyete benzeri davranış gösteren hayvanların bu davranışı daha sık gösterdiği kabul edilir (Pruet ve ark., 2003). Yükseltilmiş artı labirent testi koşullanma olmayan anksiyeteyi ölçmek amacıyla ilk olarak 1985 yılında tanımlanmış ve kullanılmıştır (Pellow ve ark., 1985). Test; karşılıklı iki kolu duvarla çevrili, karşılıklı diğer iki kolu ise duvarsız ve açık olmak üzere artı şeklinde dört yoldan oluşan, yerden yüksek bir düzenek kullanılarak yapılır (Hogg, 1996). Sıçanların normal eğilimi açık kollarda gezinmekten kaçınıp kapalı kollardaki köşelerde oturmaktır (Rodgers ve ark., 1997). Çevreyi tanıma davranışı gösteren, açık kollarda daha uzun süre zaman geçiren deneğin anksiyete seviyesi düşük olarak değerlendirilir (Carobrez ve ark., 2005). Açık kollardan çekinme davranışının anksiyete benzeri davranışı gösterdiği kabul edilir (Lister, 1990). Sıçanların düzeneğe ilk bırakıldıkları bölge olan orta alanda fazla zaman geçirmesi, sıçanın

kapalı kollar ile açık kollara gitmek arasında karar veremediğini, bunun da yüksek anksiyete benzeri davranış nedeniyle gerçekleştiğini işaret etmektedir (De Visser ve ark., 2011; Miu ve ark., 2008). Testin aynı zamanda lokomotor aktiviteyi ölçmek için de kullanılabileceği tartışılmaktadır (Belzung ve ark., 2001). Bu tez çalışmasında açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent testinde orta alanda ve açık-kapalı kollarda geçirilen sürede gruplar arası fark görülmemiştir (Çizelge 2-3). Bu durum, tüm gruplara 6 hafta boyunca uygulanan hastalık oluşturma ve tedavi protokollerinin, gruplar arasında davranışsal olarak benzer ölçüde anksiyete oluşturabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Motor performans (rotarod) testi, denge, koordinasyon ve motor kontrolün ölçülerek motor performansın değerlendirilmesini sağlar. Düzenek deney hayvanının belirli bir hızda ya da hızı giderek artırılarak dönen bir mil üzerinde durabilme yeteneğini ölçer (Bazrgar ve ark., 2015). Alzheimer hastalığı ve kognitif disfonksiyon sendromu nörodejeneratif hastalıklardır ve demansın en yaygın türleridir. Alzheimer hastalığının ana klinik semptomu kognitif bozukluklardır. Fakat özellikle motor disfonksiyonlar gibi kognitif olmayan problemler de hastalıkla ilişkilidir. Gözlenen motor bozukluklar, denge ve yürüme problemlerinden, bozulmuş aktivite seviyelerine kadar değişiklik gösterir (Camicioli ve ark., 2006; Pettersson ve ark., 2002). Alzheimer hastalığında motor bozukluklar hastalığın klinik semptomların önüne geçebilir, bu durum Alzheimer hastalığının gelişimi ve motor fonksiyonlar arasında bağlantı olduğunu gösterir (Henneman ve ark., 1965). Motor belirtiler, yaşla ve hastalığın şiddetinin artmasıyla azalır. En çok etkilenen motor belirtiler konuşma, yüz ifadeleri, duruş, yürüyüş ve daha az sıklıkla titremedir (Scarmeas ve ark., 2004). Hafif ile orta derece Alzheimer hastalarında motor becerilerdeki düşüş, orta ve şiddetli dönemdeki hastalardan daha güçlüdür (Zidan ve ark., 2012) ve motor kabiliyetlerinde azalma olan hastaların ciddi bilişsel bozukluklara sahip olma ve hatta daha erken ölme olasılığı da yüksektir (Waite ve ark., 2005). Klinik bulgularla tutarlı olarak, çeşitli Alzheimer hayvan modellerinde de motor bozukluklar geliştiği gösterilmiştir (Kobayashi ve ark., 2005).

Kolinesteraz enzim inhibitörlerinin tedavide kullanımı, biliş ve hafızanın kuvvetlendirilmesini amaçlanır; ancak, Alzheimer hastalığı bilindiği gibi biliş ve bozukluklarından çok daha fazlasıdır. Hastalar normal günlük aktivitelerini sürdürmelerinde zorluk yaşatan duygu durum ve davranışsal değişiklikler de yaşarlar. Yakın zamanda yapılan çalışmalar kolinesteraz enzim inhibitörlerinin bu değişikliklerin bazılarını iyileştirebileceğini öne sürmektedir (Birks, 2006). Başka bir çalışmada Alzheimer hastalarında donepezil kullanımının motor fonksiyonlara herhangi bir olumlu etkisi bulunmadığı bildirilmiştir (Hegerl ve ark., 2003). Fakat bu tez çalışmasında; rotarod motor performans testinde donepezil tedavi grubunun daha iyi performans gösterdiği, 26 ve 30 rpm hızlarda diğer gruplarla arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu ve daha iyi yürüme performansı sergilediği görülmüştür (Şekil 19-20, Çizelge 4). Literatürde donepezilin motor performansa etkisi ile ilgili araştırmalar sınırlıdır ve bu konuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Morris water maze (MWM) deneyi; hipokampal-bağımlı öğrenme ve hafızayı test etmekte kullanılan bir davranış deneyidir. Morris water maze testi, mekânsal öğrenmeyi ve hafızayı değerlendirmek için kullanılan en yaygın ve standart testlerden biridir. Deneyde hayvanların suda gizlenmiş bir platformu bulmayı öğrenmesi amaçlanır. Minimal eğitim gerektirmesi, vücut ağırlığından bağımsız olması, farklı türlerde uygulanabiliyor olması ve tekrarlanabilmesi gibi avantajları, kognitif fonksiyonların değerlendirilmesi açısından en iyi ve en çok tercih edilen yöntem olmasını sağlar. Alzheimer hastalığı kognitif işlevlerde bozuklukla karakterize bir hastalıktır ve Morris water maze testi Alzheimer modeli oluşturulan deney hayvanlarında öğrenme ve belleği değerlendirmek için kullanılabilecek en önemli yöntemlerden biridir (Tian ve ark., 2019). Alzheimer hastalığı medikal bir problem olmasının yanı sıra sosyal problemler de teşkil eder ve donepezil hidroklorid Alzheimer hastalığında en yaygın kullanılan ilaçtır (Nakano ve ark., 2001). Birçok çalışmada donepezil hidrokloridin Alzheimer hastalığının klinik semptomlarını iyileştirdiği bildirilmiştir (Mehta ve ark., 2012). Jianbo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (Jiangbo ve ark., 2018) araştırmacılar aerobik egzersizle birlikte donepezil kullanımının Alzheimer modeli oluşturulan sıçanlarda platformu bulma süresini kısalttığını ve platformu bulmak için yüzdüğü mesafenin azaldığını göstermişlerdir.

Bu çalışmada aerobik egzersizle birlikte donepezil kullanımının hafıza ve öğrenmeye olumlu etkilerinden bahsedilmiştir. Benzer şekilde scopolamin uygulaması yapılarak Alzheimer modeli oluşturulan farelerde, donepezille tedavi edilen farelerin Alzheimer ve kontrol gruplarına göre platform bulma süresi ve yüzme mesafesinin azaldığı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2019). Yine başka bir çalışmada sıçanlarda d-galaktoz ve $AlCl_3$ kullanılarak oluşturulan Alzheimer modelinde, donepezil grubunun saklanmış platformu bulma süresinin ve yüzme mesafesinin $AlCl_3$ grubundan anlamlı derecede kısa olduğu belirtilmiştir (Chiroma ve ark., 2019). Benzer şekilde insanlardaki tau ve β -amiloid patolojisi oluşturulan triple transjenik fare Alzheimer modeli (3xTg-AD) kullanılan bir çalışmada, Alzheimer grubunun kontrol grubuna göre platform bulma süresinde gecikme olduğu gösterilmiştir (Sah ve ark., 2017). Bu tez çalışmasında, literatürdeki sonuçlarla tutarlı şekilde deneyin 5. gününde platformda geçirilen sürede donepezil grubunun $AlCl_3$ grubundan anlamlı şekilde yüksek olduğunu ve platform bulma süresinin donepezil grubunda $AlCl_3$ grubundan anlamlı şekilde düşük olduğu görülmüştür (Şekil 25, Çizelge 9).

Morris Water Maze testinde artmış yüzme hızı, artmış anksiyetenin göstergelerinden biri olarak kabul edilir. Transjenik 3xTg-AD farelerinin kullanıldığı bir çalışmada, Alzheimer patolojisi gösteren farelerin platform bulma süresinin kontrol grubuna göre daha uzun sürdüğü ve aynı zamanda yine kontrol grubuna göre yüzme hızının arttığı gösterilmiştir (Kapadia ve ark., 2016). Benzer şekilde yine 3xTg-AD farelerinin kullanıldığı bir çalışmada, kontrol farelerinin daha rahat yüzdüğü; Alzheimer'lı farelerin daha stresli ve daha hızlı olduğu görülmüştür. Fakat araştırmacılar yüzme hızı değerlendirmesini yapmadıklarını ve dolayısıyla istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını bilmediklerini belirtmişlerdir (Davis ve ark., 2017). Deprem stresine maruz kalan farelerin stres düzeylerinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise strese maruz kalan farelerin anksiyetelerinin daha yüksek olduğu ve buna paralel olarak Morris Water Maze testinin öğrenme günlerinde, strese maruz kalmayan kontrol farelerine göre hızlı yüzdüğü gösterilmiştir (Yanai ve ark., 2012). Literatürde de gösterildiği gibi Morris Water Maze, sadece mekânsal öğrenmeyi değil, aynı zamanda anksiyete ve sensorimotor becerileri de ölçmektedir (Abbas ve ark., 2009). Bu çalışmada, öğrenme deneyinin 3 ve 4.günlerinde $AlCl_3$ grubunun

kontrol grubuna göre yüzme hızının anlamlı şekilde artmış olduğu (Şekil 21, Çizelge 5) ve deneyin 5.gününde, öğrenme günlerine paralel olarak platform bulma süresinin $AlCl_3$ grubunda kontrol grubuna göre daha uzun olduğu görülmüştür. Bu durum, literatürde de belirtildiği gibi, ılımlı Alzheimer patolojisi gösteren hayvanlarda anksiyete artışı ve uzamış platform bulma süresi sonuçlarıyla tutarlıdır.

4.3. Biyokimyasal Bulgular

Glukokortikoid hormonlar, merkezi sinir sistemi de dahil olmak üzere, tüm memeli fizyolojik sistemlerinin güçlü düzenleyicileridir (Joëls ve ark., 2009). Glukokortikoid hormon üretimi ve salınımı hipotalamo-hipofiz-adrenal nöroendokrin sistem (HPA aksı) tarafından kontrol edilir. Birçok patolojik biyomedikal durum, HPA aksındaki değişikliklerle ilişkilidir. HPA aks aktivitesindeki düzensizlikler güçlü bir şekilde depresyon, anksiyete, şizofreni gibi mental bozukluklarla ve tip 2 diyabet, hipertansiyon gibi diğer biyomedikal bozukluklarla ilişkilendirilir (Bruehl ve ark., 2007; Heim ve ark., 2009). Değişen glukokortikoid hormon düzeyleri kalıcı psikolojik ya da fizyolojik stres oluşumuna katkıda bulunabilir (Hammen, 2005). HPA aksisi ve glukokortikoid fizyolojisi önemli bilimsel biyomedikal belirteç olarak değerlendirilir (Spencer ve ark., 2017). Glukokortikoid hormonlar HPA aksının sistemik efektör hormonlarıdır. İnsanlarda, köpeklerde, hamsterlarda ve birçok balıkta bulunan steroid molekül kortizoldür. Sıçan ve farelerde ve sürüngenlerin çoğunda ise aktif molekül kortikosterondur (CORT) (Norris ve ark., 2013). HPA aksis aktivitesi ve CORT sekresyonu çevresel ve deneysel olaylara yanıt olarak oluşturulur ve kontrolümüzde değildir. Özellikle stresli deneyimler kortikosteron salınımı için uyarıcıdır, bu nedenle kortikosteron stres hormonu olarak nitelendirilir. Bunun yanında stresle ilişkili olmayan egzersiz, anksiyolitik ilaçlar ya da ödül gibi deneyimler de kortikosteron salınımını tetikleyebilmekte ya da stres sebebi olduğu düşünülen kronik nöropatik ağrı ya da uzun süren anksiyete gibi durumlarda akut kortikosteron salınımı görülmeyebilir (Allen ve ark., 1985; Bomholt ve ark., 2005). Kortikosteron sekresyonunun çok belirgin diurnal ritmi vardır ve kortikosteron

fizyolojik fonksiyonların sirkadiyan düzenlenmesinde anahtar mediyatördür (Dickmeis ve ark., 2013). Kortikosteron molekülü yağda çözünbilmekte ve kan beyin bariyerini geçer. Bu nedenle diğer stres ilişkili hormonlardan (adrenalin) farklı olarak beyin, kortikosteronun doğrudan hedef bölgesidir (Weil-Malherbe ve ark., 1959).

Stres mazuriyeti, vucüt homestazındaki değişikliklere uyum sağlamak için birçok davranışsal, fizyolojik ve hücresele tepkilerin ortaya çıkmasına sebep olur (Herman ve ark., 2016). HPA aksisi, strese karşı oluşturulan otonomik, davranışsal ve kognitif reaksiyonları düzenler (Blank ve ark., 2002). Adrenal korteksten CORT salınması, HPA aksisi aktivasyonunu azaltmak ve stres tepkisini sonlandırmak için negatif feedback mekanizmasını glukokortikoid reseptörleri aracılığıyla düzenler (Burke ve ark., 2014). Glukokortikoid reseptörlerinin feedback mekanizmasını düzenlediği ve HPA aksisi fonksiyonların korunmasında kilit rol oynadığı düşünülmektedir (De Kloet ve ark., 2005). Bir çalışmada 14 gün boyunca intraserebroventriküler olarak β -amiloid uygulanan grupta, kontrol grubuna göre yükselmiş kortikosteron seviyesi görülmüştür (Chellammal ve ark., 2019). Benzer şekilde Alzheimer patolojisi oluşturulan transjenik fare modellerinde kortikosteron seviyesi sağlıklı hayvanlara göre yüksek bulunmuştur (Stuart ve ark., 2017). Yine 5-6 aylık yaşta transjenik 3xTg-AD fareler ve kontrolleriyle yapılan başka bir çalışmada ise her iki gruba da 8 haftalık stres uygulanmış ve bu 8 haftanın sonunda gruplar arası serum kortikosteron seviyelerinde anlamlı fark görülmemiştir (Baglietto-Vargas ve ark., 2015). Normal koşullarda Alzheimer hastalığı görülen bireylerin serum kortizol seviyeleri, ya da kemirgenlerde serum kortikosteron seviyeleri sağlıklı kontrollere göre genellikle daha yüksek seyretmektedir, fakat bu çalışmada 6 hafta boyunca tüm gruplara benzer stres uygulaması serum kortikosteron seviyelerinde anlamlı fark görülmemesine sebep olmuş olabilir (Şekil 38, Çizelge 12).

Normal fizyolojik koşullar altında tüm hücreler çeşitli endojen ve ekzojen oksidanlara maruz kalmaktadır (Circu ve ark., 2012). Oksidatif stres; reaktif oksijen/

azot türleri (ROS/RNS) ve hücrelerin anti-oksidatif koruma sistemlerinin bu reaktifleri nötralize etme kapasitesi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır (Persson ve ark., 2014). Mitokondrinin iç zarındaki elektron taşıma zinciri (ETZ) enerjinin üretildiği ROS'un ana kaynağıdır. Elektronlar nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ve Flavın Adenin Dinükleotitten (FADH₂) dört membran kompleksi yardımıyla oksijene verilir (Koopman ve ark., 2010). Bazı elektronlar iç zardan sızar ve bu elektronlar oksijenle reaksiyona girerek ROS ve NOS'un farklı formları olan süperoksit anyonları oluştururlar (Persson ve ark., 2014). Artan ROS/NOS üretimi ya da anti-oksidan üretiminin bozulması, oksidatif saldırıya karşı savaşmak için endojen sistem kapasitesinin azaldığını gösteren oksidatif stresin ortaya çıkma nedenidir (López-Alarcón ve ark., 2013). ROS/NOS; RNA, DNA, proteinler ve lipitler gibi hücredeki farklı makromolekül tiplerine zarar verebilir ve bunları değiştirebilir; bu durum daha güçlü reaktiflerin üretilmesine de sebebiyet verebilir (Doorn ve ark., 2003). Oksidatif stresin çeşitli bozukluklar ve hastalıklarla ilişkisi olduğu doğrulanmıştır. Yani reaktif türlerin aktivitesi hücre ölümlerine kadar ilerleyen patolojik sonuçlar meydana getirebilir (Athar, 2002; Rice-Evans ve Diplock., 1993).

Endojen antioksidan savunma sistemi süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi bazı enzimleri, enzimatik olmayan seruloplazmin, ferritin, transferrin ve albümin gibi proteinleri ve koenzim Q, lipolik asit ve ürik asit gibi bazı radikal temizleyicileri içerir (Poljsak ve ark., 2013). Ek olarak ekzojen antioksidanlar da dikkate değer role sahiptir. Örneğin polifenollerin antioksidan ve antienflamatuar etkileri olduğu doğrulanmıştır (Yoon ve ark., 2005). Çalışmalar, bitki polifenollerinin kimyasal yapısının reaktif türlerin uzaklaştırılması için uygun olduğu ve in vitro çalışmalarda polifenollerin antioksidan etkilerinin askorbat ve tokoferollerden fazla olduğu gösterilmiştir (Vertuani ve ark., 2004). Son kanıtlar, bazı oksidasyon ürünlerinin bazı nörodejeneratif hastalıklarda biyobelirteç olarak hareket ettiğini belirtmektedir ve lipit peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) da bunlardan biridir. Alzheimer hastalarında korteks ve hippokampusta artmış MDA seviyeleri görülür (Bhat ve ark., 2015), fakat bu çalışmada doku düzeyinde gruplararası anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 30, Şekil 34, Çizelge 10-11) . Bunun sebebi AlCl₃ uygulamasının 15 gün süreyle yapılması ve bu süre uygulamanın doku düzeyinde

oksidatif stres oluşumuna sebep olmaması olabilir. Fakat serum MDA seviyesi, $AlCl_3$ grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksektir (Şekil 39, Çizelge 12) ve bu da $AlCl_3$ grubunda oksidatif stres değişikliklerinin görülmeye başladığı şeklinde yorumlanabilir.

Laktat dehidrojenaz (LDH), vücudun hemen her hücre ve dokusunda bulunan enzimdir. Bu enzimin temel amacı vücutta bulunan şekerden enerji elde etmektir. Kalp, karaciğer, akciğer ve kaslarda yüksek miktarda bulunan laktat dehidrojenaz enzimi, pek çok hastalığın araştırılmasında kullanılır. LDH enziminde oluşan total aktivite yüksekliği, vücutta oluşan doku hasarlanması ya da hücre yıkımının varlığını işaret eder. Bunun sebebi, oluşan hasarlanma ya da yıkım sırasında hücrelerden salınan bol miktardaki LDH enziminin kana karışmasıdır. Vücuttaki bütün hücreler LDH üretir ancak sırasıyla yağ doku, beyin ve miyokarda en yüksek oranda bulunur. Artmış LDH seviyesi, özellikle hemoliz başta olmak üzere, birçok hastalığın sonucu olarak görülebilir. Doku yıkımına sebep olan hastalıkların seyrinde takip edilecek enzimlerden biridir; fakat ayırıcı tanıda değerlendirilmez (Livesey ve ark., 2019). Çalışmalarda, ağır metallere maruziyetle nörolojik hastalıkların oluşumunda kuvvetli ilişki olduğu gösterilmiştir. Ağır metaller serbest radikallerin ve pro-inflamatuar sitokinlerin birikimine yol açarak nörotoksik etki oluşturmakta ve $A\beta$ ve tau-hiperfosforilasyonuna neden olarak hücre ölümüne sebep olmaktadır (Hussien ve ark., 2018). Sıçanlarda hipokampal bölgeye intraserebroventriküler olarak 1 μ L $A\beta$ 1-40 enjekte edilen ve 21 gün Tetrahedral DNA nanopartiküllerin (TDNs) Alzheimer patolojisine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, Alzheimer gurubu sıçanların hipokampus hücre sayısı, kontrol sıçanlarına göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Shao ve ark., 2020). Ağız yoluyla 90 gün boyunca alüminyum, kadmiyum ve flörür karışımı uygulanan ve Berberinin etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada, karışım uygulanan sıçanların hipokampusunda nöronal dejenerasyon, hücreler etrafında ödem, vakuol hücre yapıları görülmüştür (Hussien ve ark., 2018). *Crataegus pinnatifida* meyvesinin Alzheimer patolojisine etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada intraserebroventriküler olarak $A\beta$ enjekte edilen farelerde serum LDH seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur (Lee ve ark., 2019). Benzer şekilde Çin’de bitkisel takviye Goutengsanın Alzheimer hastalığına

etkilerinin araştırıldığı ve $AlCl_3$ 'le indüklenen modelin kullanıldığı bir çalışmada $AlCl_3$ grubunun serum LDH seviyesi kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmüştür (Huang ve ark., 2008). İlginç bir şekilde, bazı Alzheimer fare modeli kullanılan çalışmalarda beyinde aerobik glikoliz kaybının Alzheimer hastalığı ile ilişkili olduğundan bahsedilir. Bir transjenik fare modeli olan APP/PS1 fareleriyle yapılan çalışmada 12 aylık yaşta aynı yaş grubu kontrol farelerine göre, aerobik glikoliz başlatıcısı olan piruvat dehidrojenaz kinaz izoenzim 1 (PDK1) de ve frontal kortekste LDH enzim ekspresyonunda azalma olduğu gösterilmiştir (Newington ve ark., 2012). Ek olarak sıçan merkezi sinir sistemi hücre kültürü kullanılarak yapılan başka bir çalışmada LDHA ya da PDK eksikliğinin, hücrelerin A β ve diğer nörotoksinlere duyarlılığının artmasına sebep olmuştur (Newington ve ark., 2012). A β birikimi, mitokondri disfonksiyonuna, ROS oluşumunun artmasına ve sonuç olarak hücre ölümlerine sebep olur. PDK1 ve LDHA ekspresyonuyla beraber glikoliz başlatılmakta ve böylelikle de beyin korunmaktadır (Newington ve ark., 2012). Ayrıca insanlarda yapılan beyin görüntüleme çalışmalarında beynin amiloid toksisitesine en duyarlı bölgelerinin aerobik glikolizin en yüksek düzeyde olduğu bölgelerde olduğu gösterilmiştir (Vlassenko ve ark., 2010). Bu durum A β birikimine karşı koruyucu bir mekanizma olarak tanımlanır ve bu mekanizmanın kaybedilmesinin, Alzheimer hastalığını tetiklediği kabul edilir (Valvona ve ark., 2016). Bu tez çalışmasında da literatürdeki sonuçlarla tutarlı olarak, $AlCl_3$ grubunun serum LDH seviyesinin kontrol ve tedavi gruplarına göre anlamlı derecede yüksek (Şekil 42, Çizelge 12) ve hipokampusta LDH aktivitesinin $AlCl_3$ grubunda diğer gruplardan anlamlı derecede düşük olduğu (Şekil 36, Çizelge 11) görülmüştür. Bu sonuç, ılımlı düzeyde Alzheimer patolojisi oluşmaya başladığının göstergesi olarak değerlendirilebilir.

4.4. Histopatolojik Bulgular

Alzheimer Hastalığı, yaşa bağlı en yaygın nörodejeneratif bozukluktur ve bu durum bilişsel fonksiyonlarda hafıza kaybı, öğrenme bozuklukları, kişilik ve davranış

değişiklikleri ve nihayetinde ölümle sonuçlanan ilerleyici kognitif bozukluklara yol açar. Alzheimer Hastalığı genetik mutasyonlarla ilişkilendirilmiş olsa da, sebebi kesin olarak bilinmeyen sporadik etkilerin sebep olduğu görülmüştür. Nöropatolojik olarak hücre dışı β -amiloid plak birikimi, hücre içi nörofibriler yumak birikimi, nöron ve sinaps kaybı, bazal ön beyin, hipokampus ve öğrenme ilişkili bölgelerde gliosis Alzheimer hastalığı ve kognitif disfonksiyon sendromunda tanımlanmış histopatolojik bulgulardır (Cotman ve ark., 2008). Sporadik Alzheimer modeli olan intraserebroventriküler olarak streptozotosin uygulaması yapılan ve farelerle yürütülen bir çalışmada, hipokampal bölgede belirgin nöron kaybı gösterilmiştir (Cevik ve ark., 2017). Transjenik farelerle yapılan bir başka çalışmada benzer şekilde hipokampusta başlayan ve kortikal bölgelere yayılan diffuz plaklar ve bozulmuş hücre bütünlüğü tespit edilmiştir (Games ve ark., 1995). Sıçanlara ağız yoluyla 100 mg/kg $AlCl_3$ uygulanan ve selenyumla tedavinin araştırıldığı bir başka çalışmada, kontrol grubunda patolojik değişiklikler görülmezken, $AlCl_3$ grubunda vakuole sitoplazma, nörodejenerasyon ve inflamasyon gösterilmiştir (Lakshmi ve ark., 2015). Literatürdeki çalışmalarla tutarlı olarak bu tez çalışmasında, $AlCl_3$ grubunda kontrol grubuna göre hematoksilen&eoizin boyamada sıçanların prefrontal kortekste ve hipokampusta atrofi, nöronal hücre yoğunluğunun azalması ve gliosis görülmüştür. Hipokampusta ayrıca $AlCl_3$ grubunda kontrol grubundan farklı olarak bazofilik boyanma şeklinde nörofibriler yumaklar tespit edilmiştir. Congo red boyamada $AlCl_3$ grubunda kontrol grubundan farklı olarak prefrontal korteks ve hipokampusta pozitif boyanan hücre sitoplazmaları ve dejenerasyonlara rastlanmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Sprague Dawley ırkı erişkin erkek sıçanlara 15 gün $AlCl_3$ uygulamasının ardından, 21 gün boyunca donepezil, EVOO ve rozmarinik asit uygulamaları yapılarak Alzheimer hastalığı patolojisine etkileri ve olası tedavi etkinlikleri araştırılmıştır. Literatürde 15 gün 100 ml/kg dozda $AlCl_3$ uygulamasının Alzheimer patolojisi oluşturmak için yeterli olduğu gösterilmiş olsa da, bu çalışmanın sonuçlarına göre orta ve şiddetli hastalık patolojisi oluşturmak için yeterli olmadığı görülmüştür. İnsanlarda Alzheimer Hastalığı ve köpeklerde Kognitif Disfonksiyon Sendromu, yaşa bağlı nörodejeneratif değişikliklerle karakterize olan ve patolojileri oldukça benzeyen iki hastalıktır. Henüz her iki hastalığın da tedavi edecek ilaç ya da yöntem bulunmamakla beraber, her araştırma insan-hayvan sağlığı ve refahı için oldukça önem taşır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, alüminyum maruziyetinin ılımlı patoloji oluşmasına etkili olduğu, fakat orta ve şiddetli patoloji oluşturmak için kronik çalışmaların ve daha uzun süreli alüminyum maruziyetinin uygulanması gerektiği görülmüştür. EVOO ve rozmarinik asit uygulamasının ise; donepezil ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı ölçekte etkili bir tedavi sağlayamadığı görülse de; özellikle EVOO uygulamasının timus ağırlığı üzerindeki protektif ve anti-oksidan özellikleri açısından olumlu etkilerinin olabileceği ve bu alanda özellikle kronik çalışmaların daha fazla araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

ÖZET

Sıçanlarda $AlCl_3$ İle Oluşturulan Alzheimer Modelinde EVOO, Rozmarinik Asit ve Donepezil'in Etkilerinin Araştırılması

Son yıllarda sağlık ve teknoloji alanındaki gelişmeler ışığında, gerek insan gerekse hayvanların yaşam kalitesinde ve süresinde olumlu yönde iyileşmeler olmuştur. Fakat yaşam süresinin uzaması da beraberinde, yaşa bağlı kognitif bozuklukların yaygınlığında artış meydana getirmiştir. İnsanlarda Alzheimer hastalığı (AH), hayvanlarda ise Kognitif Disfonksiyon Sendromu (KDS), en yaygın görülen hastalıklardır. Bu rahatsızlığın artması; özellikle de yaşlı köpeklerin bakımı yönüyle, günümüz modern veteriner hekimliğinde giderek önem kazanan bir sorun haline gelmiştir. Metallerin nörotoksik etkilerinin olduğu bilinse de; alüminyumun, AH'nın önemli nedenlerinden biri ve hastalığın gelişiminde en büyük risk faktörlerinden biri konumunda olduğu bildirilmiştir. Alüminyum beyinde hafıza ve kognisyonla sorumlu olan korteks, serebellum ve hippokampusta birikir ve bu bölgelerde β -amiloid birikimi, oligomerizasyon, hiperfosforile tau yığılması, lipid peroksidasyonu, bozulmuş kalsiyum iyon değişimi ve apoptozis gibi Alzheimer patolojisiyle ilişkili patolojik olguları meydana getirir. Bu sebeple de deneysel olarak Alzheimer modeli oluşturmak için de sıklıkla tercih edilir. Günümüzde henüz AH ya da KDS'yi tam anlamıyla tedavi edecek bir ilaç ya da yöntem yoktur; ancak, hastalığa yakalanan insan ve hayvanların refahını artırmaya yönelik diyet ve ilaç tedavi programları uygulanır. İlaçla tedavide kullanılan gruplardan biri de AchEI (asetilkolinesteraz enzim inhibitör) grubu ilaçlardır. Asetilkolinesteraz inhibitörleri enzimatik bozulmayı önleyerek etki göstermekte ve AH için birinci basamak tedavi seçeneği olarak görülmektedir. AH tedavisi için hala ilk seçenek olarak kullanılan donepezil, düşük toksisitesi ve iyi tolere edilebilen AchE inhibe edici etkinliği ile popülerliğini korumaktadır. AH'nın diyetle tedavisinde ise, serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltabilecek antioksidanlar ve mitokondriyal kofaktörlerin kullanımı esas alınır ve bu yönde yapılan çalışmalarda da ilgi daha ziyade yüksek oranda antioksidan içeren gıdalara doğru yönelmiştir. Bunların arasında sızma zeytinyağı, extra-virgin olive oil (EVOO) önemli bir yer tutar. EVOO, sature olmayan yağ asitleri ve yüksek oranda değerli biyofenolik bileşenleri içermesi nedeniyle diğer yağlardan ayrılır. Yine antioksidan, anti-inflamatuar, anti-apoptotik ve nöroprotektif etkileri olduğu bilinen diğer bir madde ise Rosmarinik asit (RA)'tır ve RA, çeşitli gıdalarda ve şifalı otlarda bulunan doğal bir fenol karboksilik asittir.

Çalışmamızda Sprague Dawley ırkı erişkin erkek sıçanlara 15 gün boyunca 100 ml/kg dozda $AlCl_3$ uygulaması yaptıktan sonra, 3 farklı gruba 21 gün boyunca tedavi protokolleri uygulanarak donepezil, EVOO ve rozmarinik asit uygulaması yapılmıştır. $AlCl_3$ uygulamaları ve tedavilerin bitiminde hayvan ağırlıkları, rölatif adrenal ve timus ağırlıkları, davranış testleri, motor performans testi, öğrenme bellek testi, histolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler yapılarak istatistiksel anlamlılıklar değerlendirilmiştir. Stres parametresi olarak değerlendirilen rölatif timus ağırlığında $AlCl_3$ grubunda kontrol grubuna göre anlamlı azalma, tedavi gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı artış görülmüştür. Açık alan ve yükseltilmiş artı labirent

testinde gruplar arası anlamlı fark görülmemiştir. Motor performans testinde 26 ve 30 rpm hızlarda donepezil grubunda $AlCl_3$ grubuna göre anlamlı artış görülmüştür. Öğrenme ve belleğin araştırıldığı Morris Water Maze testinde, 3.ve 4.öğrenme günlerinde $AlCl_3$ grubunda kontrol grubuna göre stres parametresi olarak değerlendirilen yüzme artışı görülmüş, deneyin 5.gününde ise donepezil grubunda platformun bulunduğu alanda geçirilen sürede $AlCl_3$ grubuna göre anlamlı artış görülmüştür. Prefrontal korteks MDA, LDH, pseudokolin esterase ve beta-amiloid prekürsör protein analizlerinde gruplar arası anlamlı fark görülmemiştir. Hipokampus LDH seviyesi $AlCl_3$ grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur. Serum kortikosteron seviyesinde gruplar arası anlamlı fark görülmemiş, serum MDA ve LDH seviyesi $AlCl_3$ grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Histopatolojik olarak hematoksilin&eozen boyamada prefrontal kortekste Alzheimer grubunda kontrol grubuna göre atrofi, nöronal hücre yoğunluğunun azalması ve gliosis görülmüştür. Benzer şekilde hipokampusta hematoksilin&eozen boyamada Alzheimer grubunda kontrol grubuna göre nöronal hücre yoğunluğunun azalması ve gliosis görülmüştür. Aynı zamanda Alzheimer grubunda bazofilik boyamada hücre sitoplazmasında nörofibriler yumaklara rastlanmıştır. Congo red boyamada Alzheimer grubunun hipokampus ve prefrontal korteksinde pozitif boyanmış hücre sitoplazması, bozulmuş hücre bütünlüğü görülmüştür. Kontrol ve tedavi gruplarında hücrelerde hasara rastlanmamıştır.

Literatürde 15 gün $AlCl_3$ uygulamasının Alzheimer patolojisi oluşturmak için yeterli olduğu gösterilmiş olsa da, orta ve şiddetli hastalık patolojisi oluşturmak için yeterli olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar, alüminyum maruziyetinin ılımlı Alzheimer patolojisi oluşmasında etkili olduğunu göstermektedir fakat rozmarinik asit ve EVOO'nun tedavide kullanılabilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: $AlCl_3$, Alzheimer, Donepezil, EVOO, Rozmarinik Asit, Sıçan.

SUMMARY

Investigation of the effects of EVOO, Rosmarinic acid and Donepezil in $AlCl_3$ Rat Model of Alzheimer's Disease

In the last century, the advances in health and technology have resulted in the expansion of human and animal life span. However, with the lifespan expansion, an increase is observed in the prevalence of age related cognitive disorders with cognitive dysfunction disorder in dogs and especially Alzheimer's disease in humans being in the first place. Because of this, the maintenance of old dogs has gained importance in modern veterinary sciences. When the effect of cognitive disorders on quality of life and on the society are taken into consideration, the need for intervention and treatment methods that can stop, reverse or prevent the progressive cognitive disorder seems urgent. Even though metals cause neurotoxicity, the highest risk factor for cause and development of AD was reported to be aluminum metal. Aluminum reaches the brain and accumulates in cortex responsible for memory and cognition, cerebellum and hippocampus. Aluminum causes pathologies related to Alzheimer's pathology such as β -amyloid accumulation, oligomerisation, build-up of hyperphosphorylated tau, lipid peroxidation, change of degenerate calcium ions and apoptosis in these regions. Yet no medicine can provide permanent treatment of AD, but drugs that improve symptoms in patients or temporarily slow the progression of the disease have been developed. One of these medicine groups is AchEI (acetylcholine esterase enzyme inhibitor). Acetylcholine esterase inhibitors act by preventing enzymatic degradation and are seen as a first-line treatment for AD and CCDS. The AchEI group of medicines is called "symptomatic medicines" and act on relieving symptoms and increasing quality of life of the patient without altering the development of the pathology underlying the disease. Donepezil, which is still used as the first choice for AD therapy, maintains its popularity with its low toxicity and good tolerable AchE inhibitory activity. The diet treatment of CCDS and AD depends on the use of mitochondrial cofactors and antioxidants which may decrease the detrimental effects of free radicals. For this reason, the interest of researchers has turned to investigation of foods including antioxidants. Among these, extra-virgin olive oil (EVOO) has an important place. EVOO is separated from other oils due to its non-saturated fatty acids and its highly biodegradable biophenolic components, and has a more valuable place. Another material researched for Alzheimer's treatment is Rosmarinic acid (RA) is a natural phenol carboxylic acid found in different foods and medicinal herbs. It is known to have antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic and neuroprotective effects. In studies conducted on mice, positive effects on cognition increase have been shown.

In our study, after administering 100 ml / kg dose of $AlCl_3$ to Sprague Dawley adult male rats for 15 days, donepezil, EVOO and rosmarinic acid were applied to 3

different groups by applying treatment protocols for 21 days. At the end of AlCl_3 treatments; animal weights, relative adrenal and thymus weights, behavioral tests, motor performance test, learning memory test, histological and biochemical evaluations were made and statistical significance was evaluated. There was a significant decrease in the relative thymus weight, which was evaluated as a stress parameter, in the AlCl_3 group compared to the control group and a significant increase in the treatment groups compared to the control group. There was no significant difference between groups in open area and elevated plus maze test. In the motor performance test, a significant increase was observed in the donepezil group at 26 and 30 rpm compared to the AlCl_3 group. In the Morris Water Maze test, in which learning and memory were investigated, the increase in swimming, which was evaluated as a stress parameter in the AlCl_3 group compared to the control group, was observed on the 3rd and 4th learning days, and a significant increase was observed in the period in the donepezil group compared to the AlCl_3 group. There was no significant difference between the groups in the prefrontal cortex MDA, LDH, pseudocoline esterase and beta-amyloid precursor protein analysis. The hippocampus LDH level was significantly lower in the AlCl_3 group than in the control group. There was no significant difference between serum corticosterone levels, serum MDA and LDH levels were significantly higher in the AlCl_3 group compared to the control group. Histopathologically, hematoxylin and eosin staining showed that atrophy, decreased neuronal cell density and gliosis in the prefrontal cortex compared to the control group in the Alzheimer's group. Similarly, in the hippocampus, hematoxylin and eosin staining showed that decreased the neuronal cell density and gliosis in the Alzheimer's group compared to the control group. Also, in the Alzheimer's group, neurofibrillary tangles were found in the cell cytoplasm in basophilic staining. Congo red staining showed positively stained cell cytoplasm and impaired cell integrity in the hippocampus and prefrontal cortex of the Alzheimer's group. No damage to the cells was observed in the control and treatment groups.

Although it has been shown in the literature that 15 days of AlCl_3 administration is sufficient to create Alzheimer's pathology, it has not been found to be sufficient to create moderate and severe disease pathology. These results show that aluminum exposure is effective in creating a moderate Alzheimer's pathology, but more research is needed to use rosmarinic acid and EVOO in treatment.

Keywords: AlCl_3 , Alzheimer, Donepezil, EVOO, Rosmarinic acid, Rat.

KAYNAKLAR

- ABBAS T, FAIVRE E, HÖLSCHER C (2009). Impairment of synaptic plasticity and memory formation in GLP-1 receptor KO mice: Interaction between type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Behavioural brain research*. **1 (205)**: 265-271.
- ADAMS B, CHAN A, CALLAHAN H, MILGRAM NW (2000). The canine as a model of human cognitive aging: recent developments. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. **5 (24)**: 675-692.
- AKANA SF, CASCIO CS, SHINSAKO J, DALLMAN MF (1985). Corticosterone: narrow range required for normal body and thymus weight and ACTH. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. **5 (249)**: R527-R532.
- AKASOFU S, KOSASA T, KIMURA M, KUBOTA A (2003). Protective effect of donepezil in a primary culture of rat cortical neurons exposed to oxygen-glucose deprivation. *European journal of pharmacology*. **1 (472)**: 57-63.
- ALLEN P, BATTY K, DODD C, HERBERT J, HUGH C, MOORE G, SEYMOUR M, SHIERS H, STACEY P, YOUNG S (1985). Dissociation between emotional and endocrine responses preceding an academic examination in male medical students. *Journal of Endocrinology*. **2 (107)**: 163-170.
- ARAI H, FURUYA T, YASUDA T, MIURA M, MIZUNO Y, MOCHIZUKI H (2004). Neurotoxic effects of lipopolysaccharide on nigral dopaminergic neurons are mediated by microglial activation, interleukin-1 β , and expression of caspase-11 in mice. *Journal of Biological Chemistry*. **49 (279)**: 51647-51653.
- ARAUJO JA, STUDZINSKI CM, HEAD E, COTMAN CW, MILGRAM NW (2005). Assessment of nutritional interventions for modification of age-associated cognitive decline using a canine model of human aging. *Age*. **1 (27)**: 27-37.
- ATHAR M (2002). Oxidative stress and experimental carcinogenesis.
- ATRI A. Current and future treatments in Alzheimer's disease. *Seminars in neurology*. Vol 39: Thieme Medical Publishers; 2019:227-240.
- AXELROD J, REISINE TD (1984). Stress hormones: their interaction and regulation. *Science*. **4648 (224)**: 452-459.

- AZKONA G, GARCÍA-BELENGUER S, CHACÓN G, ROSADO B, LEÓN M, PALACIO J (2009). Prevalence and risk factors of behavioural changes associated with age-related cognitive impairment in geriatric dogs. *Journal of Small Animal Practice*. **2 (50)**: 87-91.
- BAGLIETTO-VARGAS D, CHEN Y, SUH D, AGER RR, RODRIGUEZ-ORTIZ CJ, MEDEIROS R, MYCZEK K, GREEN KN, BARAM TZ, LAFERLA FM (2015). Short-term modern life-like stress exacerbates A β -pathology and synapse loss in 3xTg-AD mice. *Journal of neurochemistry*. **5 (134)**: 915-926.
- BAIN MJ, HART BL, CLIFF KD, RUEHL WW (2001). Predicting behavioral changes associated with age-related cognitive impairment in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. **11 (218)**: 1792-1795.
- BALES KR, VERINA T, DODEL RC, DU Y, ALTSTIEL L, BENDER M, HYSLOP P, JOHNSTONE EM, LITTLE SP, CUMMINS DJ (1997). Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid β -peptide deposition. *Nature genetics*. **3 (17)**: 263.
- BANDONIENE D, MURKOVIC M, VENSKUTONIS PR (2005). Determination of rosmarinic acid in sage and borage leaves by high-performance liquid chromatography with different detection methods. *Journal of chromatographic science*. **7 (43)**: 372-376.
- BASSANI TB, BONATO JM, MACHADO MM, CÓPPOLA-SEGOVIA V, MOURA EL, ZANATA SM, OLIVEIRA RM, VITAL MA (2018). Decrease in adult neurogenesis and neuroinflammation are involved in spatial memory impairment in the streptozotocin-induced model of sporadic Alzheimer's disease in rats. *Molecular neurobiology*. **5 (55)**: 4280-4296.
- BAZRGAR M, GOUDARZI I, LASHKARBOLOUKI T, SALMANI ME (2015). Melatonin ameliorates oxidative damage induced by maternal lead exposure in rat pups. *Physiology & behavior*. **(151)**: 178-188.
- BELZUNG C, GRIEBEL G (2001). Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behavioural brain research*. **1-2 (125)**: 141-149.
- BERNALES S, SOTO MM, MCCULLAGH E (2012). Unfolded protein stress in the endoplasmic reticulum and mitochondria: a role in neurodegeneration. *Frontiers in aging neuroscience*. **(4)**: 286-293
- BHAT AH, DAR KB, ANEES S, ZARGAR MA, MASOOD A, SOFI MA, GANIE SA (2015). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **(74)**: 101-110.
- BIRKS JS (2006). Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane database of systematic reviews*. **1** : 196-204

- BISWAS J, GUPTA S, VERMA DK, GUPTA P, SINGH A, TIWARI S, GOSWAMI P, SHARMA S, SINGH S (2017). Involvement of glucose related energy crisis and endoplasmic reticulum stress: Insinuation of streptozotocin induced Alzheimer's like pathology. *Cellular Signalling*.
- BITAN G, KIRKITADZE MD, LOMAKIN A, VOLLERS SS, BENEDEK GB, TELOW DB (2003). Amyloid β -protein ($A\beta$) assembly: $A\beta$ 40 and $A\beta$ 42 oligomerize through distinct pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1** (100): 330-335.
- BLANCO-SILVENTE L, CASTELLS X, SAEZ M, BARCELÓ MA, GARRE-OLMO J, VILALTA-FRANCH J, CAPELLÀ D (2017). Discontinuation, efficacy, and safety of cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: a meta-analysis and meta-regression of 43 randomized clinical trials enrolling 16 106 patients. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. **7** (20): 519-528.
- BLANK T, NIJHOLT I, ECKART K, SPIESS J (2002). Priming of long-term potentiation in mouse hippocampus by corticotropin-releasing factor and acute stress: implications for hippocampus-dependent learning. *Journal of neuroscience*. **9** (22): 3788-3794.
- BLASIAK J, GLOWACKI S, KAUPPINEN A, KAARNIRANTA K (2013). Mitochondrial and nuclear DNA damage and repair in age-related macular degeneration. *International journal of molecular sciences*. **2** (14): 2996-3010.
- BOMHOLT SF, MIKKELSEN JD, BLACKBURN-MUNRO G (2005). Normal hypothalamo-pituitary-adrenal axis function in a rat model of peripheral neuropathic pain. *Brain research*. **2** (1044): 216-226.
- BORGHYS H, VAN BROECK B, DHUYVETTER D, JACOBS T, DE WAEPENAERT K, ERKENS T, BROOKS M, THEVARKUNNEL S, ARAUJO JA (2017). Young to middle-aged dogs with high amyloid- β levels in cerebrospinal fluid are impaired on learning in standard cognition tests. *Journal of Alzheimer's Disease*. **2** (56): 763-774.
- BORRAS D, FERRER I, PUMAROLA M (1999). Age-related changes in the brain of the dog. *Veterinary Pathology*. **3** (36): 202-211.
- BOULEAU S, TRICOIRE H (2015). Drosophila models of Alzheimer's disease: advances, limits, and perspectives. *Journal of Alzheimer's Disease*. **4** (45): 1015-1038.
- BOUTAJANGOUT A, WISNIEWSKI T (2014). Tau-based therapeutic approaches for Alzheimer's disease-a mini-review. *Gerontology*. **5** (60): 381-385.

- BRAAK H, BRAAK E (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica*. **4 (82)**: 239-259.
- BRUEHL H, RUEGER M, DZIOBEK I, SWEAT V, TIRSI A, JAVIER E, ARENTOFT A, WOLF OT, CONVIT A (2007). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and memory impairments in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. **7 (92)**: 2439-2445.
- BURKE AR, MICZEK KA (2014). Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: role of dopamine, CRF, and HPA axis. *Psychopharmacology*. **8 (231)**: 1557-1580.
- CAMICIOLI R, BOUCHARD T, LICIS L (2006). Dual-tasks and walking fast: relationship to extra-pyramidal signs in advanced Alzheimer disease. *Journal of the neurological sciences*. **1-2 (248)**: 205-209.
- CANDLAND DK, NAGY ZM (1969). The open field: some comparative data. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **3 (159)**: 831-851.
- CARBALLO F, DZIK V, FREIDIN E, DAMIÁN JP, CASANAVE EB, BENTOSELA M (2020). Do dogs rescue their owners from a stressful situation? A behavioral and physiological assessment. *Animal Cognition*. 1-15.
- CAROBREZ A, BERTOGLIO L (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. **8 (29)**: 1193-1205.
- CARRASCO-PANCORBO A, CERRETANI L, BENDINI A, SEGURA-CARRETERO A, GALLINA-TOSCHI T, FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ A (2005). Analytical determination of polyphenols in olive oils. *Journal of separation science*. **9-10 (28)**: 837-858.
- CARTER M, SHIEH JC. (2015). *Book Guide to research techniques in neuroscience*. ed., p.: Academic Press
- CARUSO D, BERRA B, GIAVARINI F, CORTESI N, FEDELI E, GALLI G (1999). Effect of virgin olive oil phenolic compounds on in vitro oxidation of human low density lipoproteins. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD*. **3 (9)**: 102-107.
- CAVALLUCCI V, FERRAINA C, D'AMELIO M (2013). Key role of mitochondria in Alzheimer's disease synaptic dysfunction. *Current pharmaceutical design*. **36 (19)**: 6440-6450.
- CEVIK B, SOLMAZ V, YIGITTURK G, CAVUSOĞLU T, PEKER G, ERBAS O (2017). Neuroprotective effects of erythropoietin on Alzheimer's dementia model in rats. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. **1 (26)**: 23-29.

- CHELLAMMAL HSJ, VEERACHAMY A, RAMACHANDRAN D, GUMMADI SB, MANAN MM, YELLU NR (2019). Neuroprotective effects of 1 δ -acetoxyeugenol acetate on A β (25-35) induced cognitive dysfunction in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **(109)**: 1454-1461.
- CHEN S-Y, HARDING JW, BARNES CD (1996). Neuropathology of synthetic β -amyloid peptide analogs in vivo. *Brain research*. **1-2 (715)**: 44-50.
- CHIROMA SM, BAHARULDIN MTH, TAIB M, NORMA C, AMOM Z, JAGADEESAN S, ILHAM ADENAN M, MAHDI O, MOKLAS MAM (2019). Protective effects of centella asiatica on cognitive deficits induced by D-gal/AlCl₃ via inhibition of oxidative stress and attenuation of acetylcholinesterase level. *Toxics*. **2 (7)**: 19.
- CHROBAK JJ, HANIN I, SCHMECHEL D, WALSH TJ (1988). AF64A-induced working memory impairment: behavioral, neurochemical and histological correlates. *Brain research*. **1 (463)**: 107-117.
- CIRCU ML, AW TY (2012). Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. **10 (1823)**: 1767-1777.
- COLE SL, VASSAR R (2008). The role of amyloid precursor protein processing by BACE1, the β -secretase, in Alzheimer disease pathophysiology. *Journal of Biological Chemistry*. **44 (283)**: 29621-29625.
- CORREA JAG, LÓPEZ-VILLODRES JA, ASENSI R, ESPARTERO JL, RODRIGUEZ-GUTIEREZ G, DE LA CRUZ JP (2008). Virgin olive oil polyphenol hydroxytyrosol acetate inhibits in vitro platelet aggregation in human whole blood: comparison with hydroxytyrosol and acetylsalicylic acid. *British journal of nutrition*. **8 (101)**: 1157-1164.
- COTMAN CW, HEAD E (2008). The canine (dog) model of human aging and disease: dietary, environmental and immunotherapy approaches. *Journal of Alzheimer's Disease*. **4 (15)**: 685-707.
- COTMAN CW, HEAD E, MUGGENBURG BA, ZICKER S, MILGRAM NW (2002). Brain aging in the canine: a diet enriched in antioxidants reduces cognitive dysfunction. *Neurobiology of aging*. **5 (23)**: 809-818.
- COYLE JT, PRICE DL, DELONG MR (1983). Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*. **4589 (219)**: 1184-1190.
- CRONIN-STUBBS D, BECKETT LA, SCHERR PA, FIELD TS, CHOWN MJ, PILGRIM DM, BENNETT DA, EVANS DA (1997). Weight loss in people with Alzheimer's disease: a prospective population based analysis. *Bmj*. **7075 (314)**: 178.

- CUMMINGS BJ, HEAD E, AFAGH AJ, MILGRAM NW, COTMAN CW (1996). β -amyloid accumulation correlates with cognitive dysfunction in the aged canine. *Neurobiology of learning and memory*. **1 (66)**: 11-23.
- DAVATZIKOS C, XU F, AN Y, FAN Y, RESNICK SM (2009). Longitudinal progression of Alzheimer's-like patterns of atrophy in normal older adults: the SPARE-AD index. *Brain*. **8 (132)**: 2026-2035.
- DAVIS K, BURNETT K, GIGG J (2017). Water and T-maze protocols are equally efficient methods to assess spatial memory in 3xTg Alzheimer's disease mice. *Behavioural brain research*. **(331)**: 54-66.
- DE KLOET ER, JOËLS M, HOLSBOER F (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature reviews neuroscience*. **6 (6)**: 463-475.
- DE VISSER L, BAARS A, LAVRIJSEN M, VAN DER WEERD C, VAN DEN BOS R (2011). Decision-making performance is related to levels of anxiety and differential recruitment of frontostriatal areas in male rats. *Neuroscience*. **(184)**: 97-106.
- DELL'AGLI M, MASCHI O, GALLI GV, FAGNANI R, DAL CERO E, CARUSO D, BOSISIO E (2008). Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase. *British journal of nutrition*. **5 (99)**: 945-951.
- DELOBETTE S, PRIVAT A, MAURICE T (1997). In vitro aggregation facilitates β -amyloid peptide-(25–35)-induced amnesia in the rat. *European journal of pharmacology*. **1 (319)**: 1-4.
- DEN HEIJER T, VAN DER LIJN F, KOUDSTAAL PJ, HOFMAN A, VAN DER LUGT A, KRESTIN GP, NIESSEN WJ, BRETELER MM (2010). A 10-year follow-up of hippocampal volume on magnetic resonance imaging in early dementia and cognitive decline. *Brain*. **4 (133)**: 1163-1172.
- DESAI RA, DAVIES AL, TACHROUNT M, KASTI M, LAULUND F, GOLAY X, SMITH KJ (2016). Cause and prevention of demyelination in a model multiple sclerosis lesion. *Annals of neurology*. **4 (79)**: 591-604.
- DICKERSON B, STOUB T, SHAH R, SPERLING R, KILLIANY R, ALBERT M, HYMAN B, BLACKER D, DETOLEDO-MORRELL L (2011). Alzheimer-signature MRI biomarker predicts AD dementia in cognitively normal adults. *Neurology*. **16 (76)**: 1395-1402.
- DICKMEIS T, WEGER BD, WEGER M (2013). The circadian clock and glucocorticoids—interactions across many time scales. *Molecular and cellular endocrinology*. **1-2 (380)**: 2-15.
- DODMAN NH, SHUSTER L. (1998). *Book Psychopharmacology of Animal Behavior Disorders*. ed., p.: Blackwell Science

- DONG H, YUEDE CM, COUGHLAN CA, MURPHY KM, CSERNANSKY JG (2009). Effects of donepezil on amyloid- β and synapse density in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Brain research*. **(1303)**: 169-178.
- DOODY RS, GELDMACHER DS, GORDON B, PERDOMO CA, PRATT RD (2001). Open-label, multicenter, phase 3 extension study of the safety and efficacy of donepezil in patients with Alzheimer disease. *Archives of neurology*. **3 (58)**: 427-433.
- DOORN JA, PETERSEN DR (2003). Covalent adduction of nucleophilic amino acids by 4-hydroxynonenal and 4-oxononenal. *Chemico-biological interactions*. **(143)**: 93-100.
- DOUGHERTY T, BERLINER M, SCHNEEBELI G, BERLINER D (1964). Hormonal control of lymphatic structure and function. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **2 (113)**: 825-843.
- DUJARDIN S, COLIN M, BUÉE L (2015). Invited review: animal models of tauopathies and their implications for research/translation into the clinic. *Neuropathology and applied neurobiology*. **1 (41)**: 59-80.
- ENAS AK (2010). Study of the possible protective and therapeutic influence of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) against neurodegenerative disorders and Alzheimer's disease induced by aluminum chloride in cerebral cortex of male Albino rats. *Nat Sci*. **11 (8)**: 202-213.
- ENGLISH C (2012). Donepezil 23 mg: Is it more advantageous compared to the original? *Mental Health Clinician*. **11 (1)**: 272-273.
- ERIK G (2004). Protein folding pathology in domestic animals. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE A*. **10 (5)**: 1226-1238.
- FALOWO AB, FAYEMI PO, MUCHENJE V (2014). Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Research International*. **(64)**: 171-181.
- FAST R, SCHÜTT T, TOFT N, MØLLER A, BERENDT M (2013). An observational study with long-term follow-up of canine cognitive dysfunction: Clinical characteristics, survival, and risk factors. *Journal of veterinary internal medicine*. **4 (27)**: 822-829.
- FELDMAN H, GAUTHIER S, HECKER J, VELLAS B, SUBBIAH P, WHALEN E (2001). A 24-week, randomized, double-blind study of donepezil in moderate to severe Alzheimer's disease. *Neurology*. **4 (57)**: 613-620.

- FEUSTON MH, LOW LK, HAMILTON CE, MACKERER CR (1994). Correlation of systemic and developmental toxicities with chemical component classes of refinery streams. *Fundamental and Applied Toxicology*. **4 (22)**: 622-630.
- FRANK D (2003). Cognitive dysfunction in dogs. *PRAKTISCHE TIERARZT*. **3 (84)**: 184-191.
- FRANKEL EN (2011). Nutritional and biological properties of extra virgin olive oil. *Journal of agricultural and food chemistry*. **3 (59)**: 785-792.
- FRAUTSCHY S, COLE G, BAIRD A (1992). Phagocytosis and deposition of vascular beta-amyloid in rat brains injected with Alzheimer beta-amyloid. *The American journal of pathology*. **6 (140)**: 1389.
- FRISONI GB, BOCCARDI M, BARKHOF F, BLENNOW K, CAPP A S, CHIOTIS K, DÉMONET J-F, GARIBOTTO V, GIANNAKOPOULOS P, GIETL A (2017). Strategic roadmap for an early diagnosis of Alzheimer's disease based on biomarkers. *The Lancet Neurology*. **8 (16)**: 661-676.
- GAMES D, ADAMS D, ALESSANDRINI R, BARBOUR R, BORTHELETTE P, BLACKWELL C, CARR T, CLEMENS J, DONALDSON T, GILLESPIE F (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature*. **6514 (373)**: 523-527.
- GAMES DA, ADAMS D (1995). D, Alessandrini, R. Barbour, R. Berthelette, P. Blackwell, C Carr, T Clemens, J Donaldson, T Gillespie, F et al Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein *Nature*. **(373)**: 523-527.
- GARLICH F, BALAKRISHNAN K, SHAH S, HOWLAND M, FONG J, NELSON L (2014). Prolonged altered mental status and bradycardia following pediatric donepezil ingestion. *Clinical Toxicology*. **4 (52)**: 291-294.
- GENOVESE A, CAPORASO N, VILLANI V, PADUANO A, SACCHI R (2015). Olive oil phenolic compounds affect the release of aroma compounds. *Food chemistry*. **(181)**: 284-294.
- GENRIKHS EE, STELMASHOOK EV, GOLYSHEV SA, ALEKSANDROVA OP, ISAEV NK (2017). Streptozotocin causes neurotoxic effect in cultured cerebellar granule neurons. *Brain research bulletin*. **(130)**: 90-94.
- GLENNER GG, WONG CW (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and biophysical research communications*. **3 (120)**: 885-890.
- GÖTZ J, BODEA L-G, GOEDERT M (2018). Rodent models for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*. **10 (19)**: 583-598.

- GULYAEVA N, BOBKOVA N, KOLOSOVA N, SAMOKHIN A, STEPANICHEV MY, STEFANOVA N (2017). Molecular and cellular mechanisms of sporadic Alzheimer's disease: Studies on rodent models in vivo. *Biochemistry (Moscow)*. **10 (82)**: 1088-1102.
- GULYAEVA NV, STEPANICHEV MY (2010). AB (25-35) as proxyholder for amyloidogenic peptides: In vivo evidence. *Experimental neurology*. **1 (222)**: 6-9.
- HAAKE A, NGUYEN K, FRIEDMAN L, CHAKKAMPARAMBIL B, GROSSBERG GT (2020). An update on the utility and safety of cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Drug Safety*. **2 (19)**: 147-157.
- HALL CS (1936). Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *Journal of Comparative Psychology*. **3 (22)**: 345.
- HAMMEN C (2005). Stress and depression. *Annu Rev Clin Psychol*. **(1)**: 293-319.
- HARA C, MANABE K, OGAWA N (1981). Influence of activity-stress on thymus, spleen and adrenal weights of rats: Possibility for an immunodeficiency model. *Physiology & behavior*. **2 (27)**: 243-248.
- HARDY J (2009). The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *Journal of neurochemistry*. **4 (110)**: 1129-1134.
- HARE B, PLYUSNINA I, IGNACIO N, SCHEPINA O, STEPIKA A, WRANGHAM R, TRUT L (2005). Social cognitive evolution in captive foxes is a correlated by-product of experimental domestication. *Current Biology*. **3 (15)**: 226-230.
- HART BL (2001). Effect of gonadectomy on subsequent development of age-related cognitive impairment in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **1 (219)**: 51-56.
- HEAD E (2009). Oxidative damage and cognitive dysfunction: antioxidant treatments to promote healthy brain aging. *Neurochemical research*. **4 (34)**: 670-678.
- HEAD E, CALLAHAN H, MUGGENBURG B, COTMAN C, MILGRAM N (1998). Visual-discrimination learning ability and β -amyloid accumulation in the dog. *Neurobiology of aging*. **5 (19)**: 415-425.
- HEAD E, MCCLEARY R, HAHN F, MILGRAM N, COTMAN C (2000). Region-specific age at onset of β -amyloid in dogs☆. *Neurobiology of aging*. **1 (21)**: 89-96.

- HEAD E, POP V, SARSOZA F, KAYED R, BECKETT TL, STUDZINSKI CM, TOMIC JL, GLABE CG, MURPHY MP (2010). Amyloid- β peptide and oligomers in the brain and cerebrospinal fluid of aged canines. *Journal of Alzheimer's Disease*. **2 (20)**: 637-646.
- HEGERL U, MERGL R, HENKEL V, GALLINAT J, KOTTER G, MÜLLER-SIECHENEDER F, POGARELL O, JUCKEL G, SCHRÖTER A, BAHRA R (2003). Kinematic analysis of the effects of donepezil hydrochloride on hand motor function in patients with Alzheimer dementia. *Journal of clinical psychopharmacology*. **2 (23)**: 214-216.
- HEIM C, NEMEROFF CB (2009). Neurobiology of posttraumatic stress disorder. *CNS spectr*. **1 Suppl 1 (14)**: 13-24.
- HENNEMAN E, SOMJEN G, CARPENTER DO (1965). Functional significance of cell size in spinal motoneurons. *Journal of neurophysiology*. **3 (28)**: 560-580.
- HERMAN JP, TASKER JG (2016). Paraventricular hypothalamic mechanisms of chronic stress adaptation. *Frontiers in endocrinology*. **(7)**: 137.
- HIGGINS L, HOLTZMAN D, RABIN J, MOBLEY W, CORDELL B (1994). Transgenic mouse brain histopathology resembles early Alzheimer's disease. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. **5 (35)**: 598-607.
- HOGG S (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **1 (54)**: 21-30.
- HOUDEK HM, LARSON J, WATT JA, ROSENBERGER TA (2014). Bacterial lipopolysaccharide induces a dose-dependent activation of neuroglia and loss of basal forebrain cholinergic cells in the rat brain. *Inflammation and cell signaling*. **1 (1)**: 126-133.
- HOWES LG (2014). Cardiovascular effects of drugs used to treat Alzheimer's disease. *Drug safety*. **6 (37)**: 391-395.
- HSIAO KK, BORCHELT DR, OLSON K, JOHANNSDOTTIR R, KITT C, YUNIS W, XU S, ECKMAN C, YOUNKIN S, PRICE D (1995). Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Neuron*. **5 (15)**: 1203-1218.
- HUANG H, ZHONG R, CAO P, WANG C, YANG D (2008). Effects of Goutengsan on model of Alzheimer dementia in rats by AlCl₃. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica*. **5 (33)**: 553-556.

- HUANG WJ, ZHANG X, CHEN WW (2016). Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomedical reports*. **5 (4)**: 519-522.
- HUSSIEN HM, ABD-ELMEGIED A, GHAREEB DA, HAFEZ HS, AHMED HE, EL-MONEAM NA (2018). Neuroprotective effect of berberine against environmental heavy metals-induced neurotoxicity and Alzheimer's-like disease in rats. *Food and chemical toxicology*. **(111)**: 432-444.
- IKEDA-DOUGLAS C, ZICKER S, ESTRADA J, JEWELL D, MILGRAM N (2004). Prior experience, antioxidants, and mitochondrial cofactors improve cognitive function in aged beagles. *Veterinary therapeutics: research in applied veterinary medicine*. **1 (5)**: 5-16.
- IRIZARRY MC, SORIANO F, MCNAMARA M, PAGE KJ, SCHENK D, GAMES D, HYMAN BT (1997). A β deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *Journal of Neuroscience*. **18 (17)**: 7053-7059.
- ITO K (2013). Frontiers of model animals for neuroscience: two prosperous aging model animals for promoting neuroscience research. *Experimental animals*. **4 (62)**: 275-280.
- IUVONE T, DE FILIPPIS D, ESPOSITO G, D'AMICO A, IZZO AA (2006). The spice sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cells from amyloid- β peptide-induced neurotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **3 (317)**: 1143-1149.
- IZADI MS, RADAHMADI M, GHASEMI M, RAYATPOUR A (2018). The effects of subchronic social and isolation stresses on learning and memory trend in male rats. *Physiology and Pharmacology*. **2 (22)**: 82-91.
- JIANGBO N, LIYUN Z (2018). Effect of donepezil hydrochloride & aerobic exercise training on learning and memory and its mechanism of action in an Alzheimer's disease rat model. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. **(31)**:
- JOËLS M, BARAM TZ (2009). The neuro-symphony of stress. *Nature reviews neuroscience*. **6 (10)**: 459-466.
- KAEBERLEIN M, CREEVY KE, PROMISLOW DE (2016). The dog aging project: translational geroscience in companion animals. *Mammalian genome*. **7-8 (27)**: 279-288.
- KAPADIA M, XU J, SAKIC B (2016). The water maze paradigm in experimental studies of chronic cognitive disorders: Theory, protocols, analysis, and inference. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. **(68)**: 195-217.

- KARRAN E, MERCKEN M, DE STROOPER B (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nature reviews Drug discovery*. **9 (10)**: 698-712.
- KOBAYASHI D, CHEN K (2005). Behavioral phenotypes of amyloid-based genetically modified mouse models of Alzheimer's disease. *Genes, Brain and Behavior*. **3 (4)**: 173-196.
- KOLOSOVA N, STEFANOVA N, KORBOLINA E, FURSOVA AZ, KOZHEVNIKOVA O (2014). Senescence-accelerated OXYS rats: A genetic model of premature aging and age-related diseases. *Advances in Gerontology*. **4 (4)**: 294-298.
- KOOPMAN WJ, NIJTMANS LG, DIETEREN CE, ROESTENBERG P, VALSECCHI F, SMEITINK JA, WILLEMS PH (2010). Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxidants & redox signaling*. **12 (12)**: 1431-1470.
- KUMAR V, GILL KD (2009). Aluminium neurotoxicity: neurobehavioural and oxidative aspects. *Archives of toxicology*. **11 (83)**: 965-978.
- LAFERLA FM, TINKLE BT, BIEBERICH CJ, HAUDENSCHILD CC, JAY G (1995). The Alzheimer's A β peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. *Nature genetics*. **1 (9)**: 21-28.
- LAFORA GR. (1914). *Book Neoformaciones Dendriticas En Las Neuronas y Alteraciones de la Neuroglia en el Perro Senil*. ed., p.: Imp. de Hijos de Nicolás Moya
- LAKSHMI B, SUDHAKAR M, PRAKASH KS (2015). Protective effect of selenium against aluminum chloride-induced Alzheimer's disease: behavioral and biochemical alterations in rats. *Biological trace element research*. **1 (165)**: 67-74.
- LAMAISON J, PETITJEAN-FREYTET C, CARNAT A (1991). Medicinal Lamiaceae with antioxidant properties, a potential source of rosmarinic acid. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. **7 (66)**: 185-188.
- LANDSBERG G, ARAUJO JA (2005). Behavior problems in geriatric pets. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*. **3 (35)**: 675-698.
- LANDSBERG GM, NICHOL J, ARAUJO JA (2012). Cognitive dysfunction syndrome: a disease of canine and feline brain aging. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*. **4 (42)**: 749-768.
- LEE J, CHO E, KWON H, JEON J, JUNG CJ, MOON M, JEON M, LEE YC, KIM DH, JUNG JW (2019). The fruit of *Crataegus pinnatifida* ameliorates memory

- deficits in β -amyloid protein-induced Alzheimer's disease mouse model. *Journal of ethnopharmacology*. **(243)**: 112107.
- LIAO C-Y, KENNEDY BK (2016). SIRT6, oxidative stress, and aging. *Cell research*. **2 (26)**: 143-144.
- LIN W-T, CHEN R-C, LU W-W, LIU S-H, YANG F-Y (2015). Protective effects of low-intensity pulsed ultrasound on aluminum-induced cerebral damage in Alzheimer's disease rat model. *Scientific reports*. **(5)**: 345-345
- LISTER RG (1990). Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & therapeutics*. **3 (46)**: 321-340.
- LIVESEY A, GARTY F, SHIPMAN A, SHIPMAN K (2019). Lactate dehydrogenase in dermatology practice. *Clinical and experimental dermatology* **(28)**: 26-33.
- LÓPEZ-ALARCÓN C, DENICOLA A (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica chimica acta*. **(763)**: 1-10.
- LORENS SA, KINDEL G, DONG XW, LEE JM, HANIN I (1991). Septal choline acetyltransferase immunoreactive neurons: dose-dependent effects of AF64A. *Brain research bulletin*. **6 (26)**: 965-971.
- LU Y, BARTON HA, LEUNG L, ZHANG L, HAJOS-KORCSOK E, NOLAN CE, LIU J, BECKER SL, WOOD KM, ROBshaw AE (2013). Cerebrospinal fluid β -Amyloid turnover in the mouse, dog, monkey and human evaluated by systematic quantitative analyses. *Neurodegenerative Diseases*. **1 (12)**: 36-50.
- MASTERS CL, SIMMS G, WEINMAN NA, MULTHAUP G, MCDONALD BL, BEYREUTHER K (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **12 (82)**: 4245-4249.
- MATHIYAZAHAN DB, THENMOZHI AJ, MANIVASAGAM T (2015). Protective effect of black tea extract against aluminium chloride-induced Alzheimer's disease in rats: A behavioural, biochemical and molecular approach. *Journal of Functional Foods*. **(16)**: 423-435.
- MATT C, SHIEH J. Guide to research techniques in neuroscience. Academic Press; 2010.
- MAURICE T, LOCKHART BP, PRIVAT A (1996). Amnesia induced in mice by centrally administered β -amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain research*. **2 (706)**: 181-193.

- MCDONALD MP, OVERMIER JB (1997). Present imperfect: a critical review of animal models of the mnemonic impairments in Alzheimer's disease. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. **1 (22)**: 99-120.
- MEHTA S, CHANDERSEKHAR K, PRASADRAO G, DUTT L, PATKAR S, NAGPAL R, GUPTA M, RAJU G, PRAVEEN K, PRASAD B (2012). Safety and efficacy of donepezil hydrochloride in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: Findings of an observational study. *Indian journal of psychiatry*. **4 (54)**: 337.
- MIU AC, HEILMAN RM, HOUSER D (2008). Anxiety impairs decision-making: psychophysiological evidence from an Iowa Gambling Task. *Biological psychology*. **3 (77)**: 353-358.
- MOLINO I, COLUCCI L, FASANARO AM, TRAINI E, AMENTA F (2013). Efficacy of memantine, donepezil, or their association in moderate-severe Alzheimer's disease: a review of clinical trials. *The Scientific World Journal*. **(2013)**: 347-355.
- MONTEDORO G, SERVILI M, BALDIOLI M, MINIATI E (1992). Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **9 (40)**: 1571-1576.
- MORAN PM, HIGGINS LS, CORDELL B, MOSER PC (1995). Age-related learning deficits in transgenic mice expressing the 751-amino acid isoform of human beta-amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **12 (92)**: 5341-5345.
- MORLEY JE, ARMBRECHT HJ, FARR SA, KUMAR VB (2012). The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. **5 (1822)**: 650-656.
- MORRIS R (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods*. **1 (11)**: 47-60.
- MULLAN M (2000). Genetic contributions to causes of Alzheimer's disease: current perspectives and future directions. *New insights into genetics and pathophysiology of Alzheimer's disease: what are the clinical and therapeutic implications*. 307-315.
- MUNCK A, GUYRE PM, HOLBROOK NJ (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine reviews*. **1 (5)**: 25-44.
- MUSHTAQ N, SCHMATZ R, PEREIRA LB, AHMAD M, STEFANELLO N, VIEIRA JM, ABDALLA F, RODRIGUES MV, BALDISSARELLI J,

- PELINSON LP (2014). Rosmarinic acid prevents lipid peroxidation and increase in acetylcholinesterase activity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell biochemistry and function*. **3 (32)**: 287-293.
- NAKANO S, ASADA T, MATSUDA H, UNO M, TAKASAKI M (2001). Donepezil hydrochloride preserves regional cerebral blood flow in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Nuclear Medicine*. **10 (42)**: 1441-1445.
- NAKBI A, TAYEB W, GRISSA A, ISSAOUI M, DABBOU S, CHARGUI I, ELLOUZ M, MILED A, HAMMAMI M (2010). Effects of olive oil and its fractions on oxidative stress and the liver's fatty acid composition in 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid-treated rats. *Nutrition & metabolism*. **1 (7)**: 80.
- NALBANTOGLU J, TIRADO-SANTIAGO G, LAHSAINI A, POIRIER J, GONCALVES O, VERGE G, MOMOLI F, WELNER S, MASSICOTTE G, JULIEN J-P (1997). Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxy terminus of the Alzheimer amyloid precursor protein. *Nature*. **6632 (387)**: 500.
- NEILSON JC, HART BL, CLIFF KD, RUEHL WW (2001). Prevalence of behavioral changes associated with age-related cognitive impairment in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **11 (218)**: 1787-1791.
- NELSON N (1999). Metal ion transporters and homeostasis. *The EMBO Journal*. **16 (18)**: 4361-4371.
- NELSON PT, BRAAK H, MARKESBERY WR (2009). Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. **1 (68)**: 1-14.
- NEWINGTON JT, RAPPON T, ALBERS S, WONG DY, RYLETT RJ, CUMMING RC (2012). Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase 1 and lactate dehydrogenase A in nerve cells confers resistance to amyloid β and other toxins by decreasing mitochondrial respiration and reactive oxygen species production. *Journal of Biological Chemistry*. **44 (287)**: 37245-37258.
- NORRIS DO, CARR JA. (2013). *Book Vertebrate endocrinology*. ed., p.: Academic Press
- OH SR, KIM S-J, KIM DH, RYU JH, AHN E-M, JUNG JW (2013). Angelica keiskei ameliorates scopolamine-induced memory impairments in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **1 (36)**: 82-88.
- OLAJIDE OJ, YAWSON EO, GBADAMOSI IT, AROGUNDADE TT, LAMBE E, OBASI K, LAWAL IT, IBRAHIM A, OGUNRINOLA KY (2017). Ascorbic acid ameliorates behavioural deficits and neuropathological alterations in rat model of Alzheimer's disease. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **(50)**: 200-211.

- ONO K, LI L, TAKAMURA Y, YOSHIIKE Y, ZHU L, HAN F, MAO X, IKEDA T, TAKASAKI J-i, NISHIJO H (2012). Phenolic compounds prevent amyloid β -protein oligomerization and synaptic dysfunction by site-specific binding. *Journal of Biological Chemistry*. **18 (287)**: 14631-14643.
- OSELLA MC, RE G, ODORE R, GIRARDI C, BADINO P, BARBERO R, BERGAMASCO L (2007). Canine cognitive dysfunction syndrome: prevalence, clinical signs and treatment with a neuroprotective nutraceutical. *Applied Animal Behaviour Science*. **4 (105)**: 297-310.
- OSETOWSKA E (1966). Morphologic changes in the brains of old dogs. *Neuropatologia polska*. **1 (4)**: 97.
- OVERALL KL (2000). Natural animal models of human psychiatric conditions: assessment of mechanism and validity. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. **5 (24)**: 727-776.
- PAN Y (2013). Cognitive dysfunction syndrome in dogs and cats. *CAB Reviews*. **051 (8)**: 1-10.
- PAPANDREOU MA, DIMAKOPOULOU A, LINARDAKI ZI, CORDOPATIS P, KLIMIS-ZACAS D, MARGARITY M, LAMARI FN (2009). Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity. *Behavioural brain research*. **2 (198)**: 352-358.
- PASKITTI M, MCCREARY B, HERMAN J (2000). Stress regulation of adrenocorticosteroid receptor gene transcription and mRNA expression in rat hippocampus: time-course analysis. *Molecular brain research*. **2 (80)**: 142-152.
- PELLOW S, CHOPIN P, FILE SE, BRILEY M (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. **3 (14)**: 149-167.
- PERSSON T, POPESCU BO, CEDAZO-MINGUEZ A (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? *Oxidative medicine and cellular longevity*. **(2014)**: 78-86.
- PETTERSSON AF, ENGARDT M, WAHLUND L-O (2002). Activity level and balance in subjects with mild Alzheimer's disease. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. **4 (13)**: 213-216.
- PITTOZZI V, JACOMELLI M, ZAID M, LUCERI C, BIGAGLI E, LODOVICI M, GHELARDINI C, VIVOLI E, NORCINI M, GIANFRIDDO M (2010). Effects of dietary extra-virgin olive oil on behaviour and brain biochemical parameters in ageing rats. *British journal of nutrition*. **11 (103)**: 1674-1683.

- POLJSAK B, ŠUPUT D, MILISAV I (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity*. **(2013)**: 1100-1123.
- PRESTI G, GUARRASI V, GULOTTA E, PROVENZANO F, PROVENZANO A, GIULIANO S, MONFREDA M, MANGIONE M, PASSANTINO R, SAN BIAGIO P (2017). Bioactive compounds from extra virgin olive oils: Correlation between phenolic content and oxidative stress cell protection. *Biophysical Chemistry*. **(230)**: 109-116.
- PRUT L, BELZUNG C (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*. **1-3 (463)**: 3-33.
- PUZZO D, GULISANO W, ARANCIO O, PALMERI A (2015). The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in A β physiology. *Neuroscience*. **(307)**: 26-36.
- QUON D, WANG Y, CATALANO R, SCARDINA JM, MURAKAMI K, CORDELL B (1991). Formation of β -amyloid protein deposits in brains of transgenic mice. *Nature*. **6332 (352)**: 239.
- REID S, PETERSON M (2000). Methods of estimating canine longevity. *Veterinary Record*. **22 (147)**: 630-631.
- RICE-EVANS CA, DIPLOCK AT (1993). Current status of antioxidant therapy. *Free Radical Biology and Medicine*. **1 (15)**: 77-96.
- RODGERS R, CAO B-J, DALVI A, HOLMES A (1997). Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian journal of medical and biological research*. **(30)**: 289-304.
- ROSADO B, GONZÁLEZ-MARTÍNEZ A, PESINI P, GARCÍA-BELENQUER S, PALACIO J, VILLEGAS A, SUÁREZ M-L, SANTAMARINA G, SARASA M (2012). Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs—part 1: locomotor and exploratory behaviour. *The Veterinary Journal*. **2 (194)**: 189-195.
- ROSSNER S, HÄRTIG W, SCHLIEBS R, BRÜCKNER G, BRAUER K, PEREZ-POLO J, WILEY R, BIGL V (1995). 192IgG-saporin immunotoxin-induced loss of cholinergic cells differentially activates microglia in rat basal forebrain nuclei. *Journal of neuroscience research*. **3 (41)**: 335-346.
- SAFAEIAN L, ZABOLIAN H (2014). Antioxidant effects of bovine lactoferrin on dexamethasone-induced hypertension in rat. *ISRN pharmacology*. **(2014)**: 345-353.

- SAH SK, LEE C, JANG J-H, PARK GH (2017). Effect of high-fat diet on cognitive impairment in triple-transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications*. **1 (493)**: 731-736.
- SALKOVIC-PETRISIC M, KNEZOVIC A, HOYER S, RIEDERER P (2013). What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *Journal of neural transmission*. **1 (120)**: 233-252.
- SANTAMARIA J, KHALFALLAH O, SAUTY C, BRUNET I, SIBIEUDE M, MALLET J, BERRARD S, LECOMTE MJ (2009). Silencing of choline acetyltransferase expression by lentivirus-mediated RNA interference in cultured cells and in the adult rodent brain. *Journal of neuroscience research*. **2 (87)**: 532-544.
- SANTOS F, RAO V (2000). Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1, 8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. **4 (14)**: 240-244.
- SARASA L, GALLEGO C, MONLEON I, OLVERA A, CANUDAS J, MONTANES M, PESINI P, SARASA M (2010). Cloning, sequencing and expression in the dog of the main amyloid precursor protein isoforms and some of the enzymes related with their processing. *Neuroscience*. **4 (171)**: 1091-1101.
- SATOU T, CUMMINGS BJ, HEAD E, NIELSON KA, HAHN FF, MILGRAM NW, VELAZQUEZ P, CRIBBS DH, TENNER AJ, COTMAN CW (1997). The progression of β -amyloid deposition in the frontal cortex of the aged canine. *Brain research*. **1 (774)**: 35-43.
- SCARMEAS N, HADJIGEORGIOU G, PAPADIMITRIOU A, DUBOIS B, SARAZIN M, BRANDT J, ALBERT M, MARDER K, BELL K, HONIG LS (2004). Motor signs during the course of Alzheimer disease. *Neurology*. **6 (63)**: 975-982.
- SELFIDGE JE, LEZI E, LU J, SWERDLOW RH (2013). Role of mitochondrial homeostasis and dynamics in Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease*. **(51)**: 3-12.
- SHAMASUNDAR N, RAO TS, NAIDU MD, RAVID R, RAO K (2006). A new insight on Al-maltolate-treated aged rabbit as Alzheimer's animal model. *Brain research reviews*. **2 (52)**: 275-292.
- SHAO X, CUI W, XIE X, MA W, ZHAN Y, LIN Y (2020). Treatment of Alzheimer's disease with framework nucleic acids. *Cell Proliferation*. e12787. **(26)**: 343-350.

- SHARMA K (2019). Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics. *Molecular medicine reports*. **2 (20)**: 1479-1487.
- SHIGETA M, HOMMA A (2001). Donepezil for Alzheimer's disease: pharmacodynamic, pharmacokinetic, and clinical profiles. *CNS drug reviews*. **4 (7)**: 353-368.
- SINGH S, MULLEY GP, LOSOWSKY MS (1988). Why are Alzheimer patients thin? *Age and ageing*. **1 (17)**: 21-28.
- SINGLA N, DHAWAN D (2014). Zinc modulates aluminium-induced oxidative stress and cellular injury in rat brain. *Metallomics*. **10 (6)**: 1941-1950.
- SPENCER RL, DEAK T (2017). A users guide to HPA axis research. *Physiology & behavior*. **(178)**: 43-65.
- SPERLING RA, AISEN PS, BECKETT LA, BENNETT DA, CRAFT S, FAGAN AM, IWATSUBO T, JACK CR, KAYE J, MONTINE TJ (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia*. **3 (7)**: 280-292.
- STEFANOVA NA, MURALEVA NA, SKULACHEV VP, KOLOSOVA NG (2014). Alzheimer's disease-like pathology in senescence-accelerated OXYS rats can be partially retarded with mitochondria-targeted antioxidant SkQ1. *Journal of Alzheimer's Disease*. **3 (38)**: 681-694.
- STEPANICHEV M, LAZAREVA N, TUKHBATOVA G, SALOZHIN S, GULYAEVA N (2014). Transient disturbances in contextual fear memory induced by A β (25–35) in rats are accompanied by cholinergic dysfunction. *Behavioural brain research*. **(259)**: 152-157.
- STEPANICHEV MY, ZDOBNOVA IM, YAKOVLEV AA, ONUFRIEV MV, LAZAREVA NA, ZARUBENKO II, GULYAEVA NV (2003). Effects of tumor necrosis factor-alpha central administration on hippocampal damage in rat induced by amyloid beta-peptide (25–35). *Journal of neuroscience research*. **1 (71)**: 110-120.
- STEWART R, MASAKI K, XUE Q-L, PEILA R, PETROVITCH H, WHITE LR, LAUNER LJ (2005). A 32-year prospective study of change in body weight and incident dementia: the Honolulu-Asia Aging Study. *Archives of neurology*. **1 (62)**: 55-60.
- STUART KE, KING AE, FERNANDEZ-MARTOS CM, SUMMERS MJ, VICKERS JC (2017). Environmental novelty exacerbates stress hormones and A β pathology in an Alzheimer's model. *Scientific reports*. **1 (7)**: 1-7.

- STUDZINSKI CM, CHRISTIE L-A, ARAUJO JA, BURNHAM WM, HEAD E, COTMAN CW, MILGRAM NW (2006). Visuospatial function in the beagle dog: an early marker of cognitive decline in a model of human aging and dementia. *Neurobiology of learning and memory*. **2 (86)**: 197-204.
- TAPP PD, SIWAK CT, GAO FQ, CHIOU J-Y, BLACK SE, HEAD E, MUGGENBURG BA, COTMAN CW, MILGRAM NW, SU M-Y (2004). Frontal lobe volume, function, and β -amyloid pathology in a canine model of aging. *Journal of Neuroscience*. **38 (24)**: 8205-8213.
- TIAN H, DING N, GUO M, WANG S, WANG Z, LIU H, YANG J, LI Y, REN J, JIANG J (2019). Analysis of Learning and Memory Ability in an Alzheimer's Disease Mouse Model using the Morris Water Maze. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. **152** e60055.
- TRIPOLI E, GIAMMANCO M, TABACCHI G, DI MAJO D, GIAMMANCO S, LA GUARDIA M (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition research reviews*. **1 (18)**: 98-112.
- UCHIDA K, NAKAYAMA H, GOTO N (1991). Pathological studies on cerebral amyloid angiopathy, senile plaques and amyloid deposition in visceral organs in aged dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*. **6 (53)**: 1037-1042.
- VALVONA CJ, FILLMORE HL, NUNN PB, PILKINGTON GJ (2016). The regulation and function of lactate dehydrogenase a: therapeutic potential in brain tumor. *Brain pathology*. **1 (26)**: 3-17.
- VERTUANI S, ANGUSTI A, MANFREDINI S (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Current pharmaceutical design*. **14 (10)**: 1677-1694.
- VINTERS HV (2015). Emerging concepts in Alzheimer's disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. **(10)**: 291-319.
- VLASSENKO AG, VAISHNAVI SN, COUTURE L, SACCO D, SHANNON BJ, MACH RH, MORRIS JC, RAICHLE ME, MINTUN MA (2010). Spatial correlation between brain aerobic glycolysis and amyloid- β (A β) deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **41 (107)**: 17763-17767.
- WAITE J, CHEN A, WARDLOW M, WILEY R, LAPPI D, THAL L (1995). 192 immunoglobulin G-saporin produces graded behavioral and biochemical changes accompanying the loss of cholinergic neurons of the basal forebrain and cerebellar Purkinje cells. *Neuroscience*. **2 (65)**: 463-476.
- WAITE L, GRAYSON D, PIGUET O, CREASEY H, BENNETT H, BROE G (2005). Gait slowing as a predictor of incident dementia: 6-year longitudinal

- data from the Sydney Older Persons Study. *Journal of the neurological sciences*. **(229)**: 89-93.
- WEGIEL J, WISNIEWSKI HM, SOŁTYSIAK Z (1998). Region-and cell-type-specific pattern of tau phosphorylation in dog brain. *Brain research*. **1 (802)**: 259-266.
- WEIL-MALHERBE H, AXELROD J, TOMCHICK R (1959). Blood-brain barrier for adrenaline. *Science*. **3357 (129)**: 1226-1227.
- WILEY RG, OELTMANN TN, LAPPI DA (1991). Immunolesioning: selective destruction of neurons using immunotoxin to rat NGF receptor. *Brain research*. **1 (562)**: 149-153.
- WINBLAD B, ENGEDAL K, SOININEN H, VERHEY F, WALDEMAR G, WIMO A, WETTERHOLM A-L, ZHANG R, HAGLUND A, SUBBIAH P (2001). A 1-year, randomized, placebo-controlled study of donepezil in patients with mild to moderate AD. *Neurology*. **3 (57)**: 489-495.
- WINKLER J, THAL LJ, GAGE FH, FISHER LJ (1998). Cholinergic strategies for Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Medicine*. **8 (76)**: 555-567.
- WU M-Y, ESTEBAN G, BROGI S, SHIONOYA M, WANG L, CAMPIANI G, UNZETA M, INOKUCHI T, BUTINI S, MARCO-CONTELLI J (2016). Donepezil-like multifunctional agents: design, synthesis, molecular modeling and biological evaluation. *European journal of medicinal chemistry*. **(121)**: 864-879.
- YAMADA K, NABESHIMA T (2000). Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacology & therapeutics*. **2 (88)**: 93-113.
- YAMAGUCHI Y, KAWASHIMA S (2001). Effects of amyloid- β -(25–35) on passive avoidance, radial-arm maze learning and choline acetyltransferase activity in the rat. *European journal of pharmacology*. **3 (412)**: 265-272.
- YANAI S, SEMBA Y, ENDO S (2012). Remarkable changes in behavior and physiology of laboratory mice after the massive 2011 Tohoku earthquake in Japan. *PloS one*. **9 (7)**: 26-34.
- YOON J-H, BAEK SJ (2005). Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei medical journal*. **5 (46)**: 585-596.
- YOSHIYAMA Y, KOJIMA A, ISHIKAWA C, ARAI K (2010). Anti-inflammatory action of donepezil ameliorates tau pathology, synaptic loss, and neurodegeneration in a tauopathy mouse model. *Journal of Alzheimer's Disease*. **1 (22)**: 295-306.

YY SZETO J, JG LEWIS S (2016). Current treatment options for Alzheimer's disease and Parkinson's disease dementia. *Current neuropharmacology*. **4 (14)**: 326-338.

ZAKARIA R, WAN YAACOB W, OTHMAN Z, LONG I, AHMAD A, AL-RAHBI B (2017). Lipopolysaccharide-induced memory impairment in rats: a model of Alzheimer's disease. *Physiological research*. **(66)**: 943-950.

ZHANG J, WANG J, ZHOU G-S, TAN Y-J, TAO H-J, CHEN J-Q, PU Z-J, MA J-Y, SHE W, KANG A (2019). Studies of the Anti-amnesic Effects and Mechanisms of Single and Combined Use of Donepezil and Ginkgo Ketoester Tablet on Scopolamine-Induced Memory Impairment in Mice. *Oxidative medicine and cellular longevity*. **(2019)**: 123-130.

ZIDAN M, ARCOVERDE C, ARAÚJO NBd, VASQUES P, RIOS A, LAKS J, DESLANDES A (2012). Alterações motoras e funcionais em diferentes estágios da doença de Alzheimer. *Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)*. **5 (39)**: 161-165.

EKLER

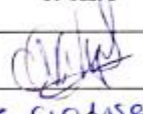
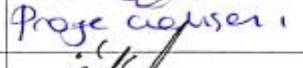
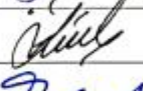
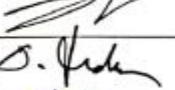
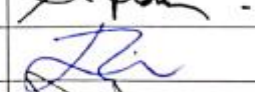
Ek 1. Etik Onay

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (TF-HADYEK)
ETİK KURUL KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	Proje Yürütücüsü
23/11/2017	24/2017	Doç. Dr. Levent ALTINTAŞ

“SIÇANLARDA AIC3 İLE OLUŞTURULAN ALZHEIMER MODELİNDE EVOO, ROZMARİNİK ASİT VE DONEPEZİLİN ETKİLERİ” isimli proje başvurusu etik açıdan uygun bulunmuştur.

Etik Onay Geçerlilik Süresi:

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Nazan Uysal HARZADIN	
Başkan Yardımcısı	Vet. Hek. Sevim KANDİŞ	
Üye	Prof. Dr. Lütüye KANIT	
Üye	Prof. Dr. Ersin KOYLU	
Üye	Prof. Dr. Sevil Gönenç ARDA	
Üye	Prof. Dr. Mehmet Nuri ARDA	
Üye	Prof. Dr. Durgül YILMAZ	
Üye	Ayşe DAYI	

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Sevim

Soyadı: Kandiş

Doğum yeri ve tarihi: Tokat 15.05.1990

Uyruğu: TC

Medeni durumu: Bekar

İletişim adresi ve telefonu: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Kat:6 İnciraltı 35340-İZMİR

II- Eğitimi

Yüksek Lisans: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

Tez konusu: Sıçanlarda Empati İlişkili Davranışta Parasetamolün Rolünün Araştırılması

Tezin Danışmanı: Prof.Dr. Nazan UYSAL HARZADIN

Lisans: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2008-2013)

Lise: Çağrıbey Anadolu Lisesi Ankara, Türkiye

Yabancı dili: İngilizce (Yökdil 2017: 78,75/100)

III- Ünvanları

Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

- Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Deneysel Araştırmalar Birimi, sorumlu veteriner hekim (2015-)
- Ankara Büyükşehir Belediyesi Sincan Hayvanat Bahçesi (2014- 2015)

- Pet Garden Akvaryum İth. İhr. San. Tic. Ltd. Şti. (2013-2014)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Fizyolojik Bilimler Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınlar

- Yüksel O, Kızıldağ S, Hoşgörler FU, Koç TB, **Kandiş S**, Güvendi G, Uysal Harzadın N, "Effects of exercise on netrin-1 and TNF- α levels in non-inflammatory conditions", Annals of Medical Research, 27/3/760-764/2020, 2020, Araştırma(Research) Makale, ULAKBİM
- Ates M, Kizildag S, Yuksel O, Hosgorler F, Yuce Z, Guvendi G, **Kandis S**, KarakilicA, Koc B, Uysal N, "Dose-Dependent Absorption Profile of Different Magnesium Compounds", Biological Trace Element Research, 192/2/244-251/2019, 2019, Araştırma(Research) Makale, SCI
- Hoşgörler FU, Kızıldağ S, Koç B, Güvendi G, **Kandiş S**, Ateş M, Uysal Harzadın N, "Yaşlı dişisıçanlarda akut ve kronik stres yanıtlarının midede TNF-alfa ve IL-10 düzeylerine etkileri", Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 33/3/201-209, 2019, Araştırma(Research) Makale, TÜBİTAK
- Kızıldağ S, Hoşgörler FU, Koç B, Golgelioglu O, Guvendi G, **Kandiş S**, Ateş M, Uysal Harzadın N, "Probable Interaction of MMP-2 and VEGF in Testicular Deteriorations Related to Aging", Dicle Medical Journal, 46/4/735-741/2019, 2019, Araştırma(Research) Makale, EA
- Hoşgörler F, Kızıldağ S, Ateş M, Argon A, Koç TB, **Kandiş S**, Güvendi G, Iğın R, Uysal Harzadın N, "The Chronic Use of Magnesium Decreases VEGF Levels in the Uterine Tissue in Rats.", Biological Trace Element Research, 2019, Araştırma(Research) Makale, SCI
- Ateş M, Hoşgörler FU, Yüksel O, Unsal SK, Güvendi G, Karakılıç A, Koç B, **Kandiş S**, Kanıt L, Uysal Harzadın N, "Nicotine increased VEGF and MMP2 levels in the rat eye and kidney", Environmental Science and Pollution Research, 26/3/33517-33523, 2019, Araştırma(Research) Makale, SCI
- Yüksel O, Ateş M, Kızıldağ S, Yüce Z, Koc B, **Kandiş S**, Güvendi G, Karakılıç A, Gümüş H, Uysal Harzadın N, "Regular Aerobic Voluntary Exercise Increased Oxytocin in Female Mice: Cause to Decrease Anxiety and Increase Empathy-Like

Behaviors", Balkan Medical Journal, 36/5/257-262/2019,2019, Araştırma(Research) Makale, SCI-Expanded

- **Sevim Kandis**, Mehmet Ates, Servet Kizildag, Gamze B. Camsari, Zeynep Yuce, Guven Guvendi, Basar Koc, Asli Karakilic, Ulaş M. Camsari, Nazan Uysal, "Acetaminophen (paracetamol) affects empathy-like behavior in rats: Dose response-relationship", Pharmacology Biochemistry and Behavior, Volume 175, December 2018, Pages 146-151, 2018, Araştırma(Research) Makale, SCI
- **Kandiş S**, Ates M, Kizildag S, Camsari G, Yuce Z, Guvendi G, Koc B, Karakılıç A, Camsari U, Uysal Harzadın N, "Acetaminophen (paracetamol) affects empathy-like behavior in rats: Dose-responserelationship", Pharmacology Biochemistry and Behavior, Volume 175, December 2018, Pages 146-151,2018, Araştırma(Research) Makale, SCI-Expanded
- Karakilic A, Kizildag S, **Kandis S**, Guvendi G, Koc B, Camsari GB, Camsari UM, Ates M, Arda SG,Uysal N, "The effects of acute foot shock stress on empathy levels in rats", Behavioural Brain Research, 2018 Sep 3;349:31-36, 2018, Araştırma(Research) Makale, SCI
- Karakılıç A, Kizildag S, **Kandiş S**, Guvendi G, Koc B, Camsari G, Camsari U, AtesM, Gönenç Arda S, Uysal Harzadın N, "The effects of acute foot shock stress on empathy levels in rats", Behavioural Brain Research, Volume 349, 3 September 2018, Pages 31-36, 2018, Araştırma(Research) Makale, SCIEexpanded
- Nazan Uysal, Oguz Yuksel, Servet Kizildag, Zeynep Yuce, Hikmet Gumus, Aslı Karakılıç, Guven Guvendi, Basar Koc, **Sevim Kandis**, Mehmet Ates, "Regular aerobic exercise correlates with reduced anxiety and incresed levels of irisin in brain and white adipose tissue", Neuroscience Letters, Volume 676, Pages 92-97, 29 May 2018, 2018, Araştırma(Research) Makale, SCI (10 eserde atıf)
- Nazan Uysal, Servet Kizildag, Zeynep Yuce, Guven Guvendi, **Sevim Kandis**, Basar Koc, Aslı Karakılıç, Ulas M. Camsari, Mehmet Ates, "Timeline (Bioavailability) of Magnesium Compounds in Hours: Which Magnesium Compound Works Best?", Biological Trace Element Research, 183,417,1- 9,2018, 2018, Araştırma(Research) Makale, SCI (5 eserde atıf)

Bilimsel Etkinliklerde Sunulmuş Bildiriler

- Kızıldağ S, Koc B, Hoşgörler FU, Yüksel O, Güvendi G, **Kandiş S**, Karakılıç A, Ateş M, Uysal Harzadın N,"MAGNEZYUM TNF-ALFA VE IL-10'U TLR4 ARACILIĞIYLA ARTIRMAKTADIR: ENFLAMASYON KASKAT DENGESİYLE İLİŞKİLİDİR","II. Dünya Spor Bilimleri Araştırmaları Kongresi, Manisa, Mart 2019, serbest bildiri, Uluslararası Hakemli organizasyon
- **Kandis S**, Ates M, Kızıldağ S, Camsari G, Yuce Z, Guvendi G, Koc B, Karakilic A, Camsari U, Uysal N,"INVESTIGATION OF THE ROLE OF

PARACETAMOL IN EMPATHY-RELATED BEHAVIOR IN RATS", "Pharmacology Biochemistry and Behavior, Volume 175, December 2018, Pages 146-151", 3rd International Congress of Turkish Neuroendocrinology Society, Malatya, Haziran 2018, serbest bildiri.

- Uluslararası Hakemli organizasyon

Katıldığı / Görev aldığı Mesleki / Bilimsel / Sanatsal Etkinlikler

- Üniversitemizi Temsilen, Tarım ve Orman Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünün Düzenlediği 2019/3 Sayılı Genelge Bilgilendirme, Ankara, Mayıs 2019(Diğer)
- "3rd International Congress Of Turkish Neuroendocrinology Society"De Görevlendirilmesi., Malatya, Haziran 2018(Tebliğ / Bildiri Sunma (Poster, Sözlü v.b.))
- Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulları Eğitim Seminerine Katılmak Üzere, Ankara, Mart 2018(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
- Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanımı Sertifika Kursu, İzmir, Mart 2017(Eğitimci Olarak Düzenleyici)
- Gaziantep'De Deney Hayvanları Almak Üzere, Gaziantep, Ekim 2016(Diğer)
- Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanımı Sertifika Kursu, İzmir, Mayıs 2016(Eğitimci Olarak Düzenleyici)
- Workshop On Advances In Clinical Behavioral Medicine For Cats And Dogs Toplantısına Katılmak Üzere, Bodrum, Mayıs 2016(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
- 41.Ulusal Fizyoloji Kongresine Katılmak Üzere, Çanakkale, Eylül 2015(İzlenimci – Katılımcı Olarak)
- Deney Hayvanları Kullanım Kursu, Çankaya, Kasım 2014(İzlenimci - Katılımcı Olarak)

Yönetim - İdari Görevler

- DEÜ Rektörlüğü Tıp Fakültesi HADYЕК (DEÜ-TF-HADYЕК) Üyesi, Şubat 2016- Şubat 2020.