



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**ALZHEİMER HASTALARININ UYKU ÖNCE VE SONRASI
PLAZMA PROTEOM PROFİLLERİNİN İN VİTRO NÖRONAL
AKTİVİTE ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

FADİME ÇADIRCI TUNGAÇ

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. LÜTFÜ HANOĞLU

İkinci Tez Danışmanı

Prof. Dr. GÜRKAN ÖZTÜRK

İSTANBUL- 2022

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)
Anabilim Dalı : Sinirbilim
Tez Sahibi : Fadime ÇADIRCI TUNGAÇ
Tez Başlığı : Alzheimer Hastalarının Uyku Önce ve Sonrası Plazma
Proteom Profillerinin İn Vitro Nöronal Aktivite Üzerindeki
Etkileri
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 27.07.2022

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Danışman</u>	<u>Kurumu</u>	<u>İmza</u>
Prof.Dr. Lütfü HANOĞLU	İstanbul Medipol Üniversitesi	
<u>Sınav Jüri Üyeleri</u>		
Prof.Dr. Ertuğrul KILIÇ	İstanbul Medipol Üniversitesi	
Doç.Dr. Esra ÇAĞAVI	İstanbul Medipol Üniversitesi	
Prof.Dr. Burak YULUĞ	Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi	
Prof. Dr. Zehra Betül YALÇINER	İstanbul Okan Üniversitesi	

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür Vekili

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması veyazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Fadime ÇADIRCI TUNGAÇ

TEŞEKKÜR

Lisansüstü çalışmalarımın yanı sıra, bilgisiyle ve insani değerleri ile saygı duyduğum, akademik hayatın yoğunluğuna rağmen birçok işin beraber yapılabilmesine şahit olduğum ve bu konuda yol gösterici olması bakımından minnet duyduğum, hekim kimliği ile de yardımseverliğini gözlemleme fırsatı bulduğum saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Lütfü HANOĞLU' na,

Tez çalışmam boyunca fikirlerini paylaşarak bana yol gösteren, laboratuvar olanaklarını sınırsızca sunan ve akademik alanda gelişmemi sağlayacak fikirlerini paylaşmaktan geri durmayarak engin bilgilerinden istifade ettiğim saygıdeğer eş danışman hocam Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK' e,

Tez jüri üyelerimden olan işine olan saygısı ve titizliği ile örnek olan sevgili hocam Doç.Dr. Esra ÇAĞAVİ' ye ve saygıdeğer hocam Prof.Dr. Ertuğrul KILIÇ hocama,

Lisans eğitimimden beri gerek akademik gerekse sosyal hayatımda beraber yol aldığım ve bu tez çalışmamda da birlikte her türlü zorluklara karşı göğüs gerdiğim, değerli arkadaşım Nagihan MANTAR' a

Bana umudun her daim var olduğunu anlatan, pozitif bakış açıları ve bilgi birikimleri ile yol gösterici, tez sürecinde manevi desteklerini her daim hissettiren çok sevgili arkadaşlarım Fzt. Feyza DOĞAN ÖZDAMAR ve Fzt. Dr. Sümeyye Tunç'a, Sıdika BİLGİN ve Zehra TÜZEMEN'e,

Tezim boyunca ihtiyaç duyduğum her konuda yardımcı olan ve tezime katkıda bulunan Fazlı Kemal Bayat'a ve her türlü desteğini esirgemeyen ve bilgisini paylaşan Sevginur BOSTAN' a

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen Dr.Öğr. Üyesi Neşe AYŞİT' e, her türlü desteğini hissettiğim sevgili arkadaşım Dr. Naciye BİLGİN BODUR' a, Laboratuvar ortamını paylaştığım ekip arkadaşlarım, Esra Nur YİĞİT, Şeyma ÇİMEN, Sadık BAY, Gülsena BAYDAŞ, Safiye SERDENGEÇTİ' Ayşe Server SEZER' Mehmet Şerif AYDIN' a, laboratuvarda her türlü teknik ve benzeri sorunlarda yardımını esirgemeyen başta Hilmi Kaan ALKAN, Mehtap ŞİMŞEK, Büşra BATĞI, Arda KEBAPÇI' ya, proteomiks biriminden Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Çağlar BEKER, Ecem YELKENCİ' ye, MEDİTAM ekibinden Ekrem Musa ÖZDEMİR, Ali ŞENBAHÇE ve MEDİTAM ekibinden herkese ayrıca tüm SABİTA ailesine dahil olan tüm personellere,

Eğitim hayatım ve her türlü gelişim basamağımda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, akademik hayatımın devam etmesi yönünde teşvik eden ve yanımda olan çok kıymet verdiğim sevgili babama, hakkını ödeyemeyeceğim çok kıymet verdiğim sevgili anneme, bugünlere gelmemde manevi desteğini derinden hissettiğim kız kardeşlerime ve erkek kardeşlerime bunun yanında manevi desteğini hissettiğim kayınvalidem, kayınbabam ve TUNGAÇ ailesine sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Her daim yanımda olan, başarılarımın ve zorluklarımın yanında bana destek veren çok kıymetli eşim Salih'e ayrıca en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
RESİMLER LİSTESİ	xviii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1 Alzheimer Hastalığı	5
4.1.1 Etiyolojisi.....	5
4.1.2 Patofizyolojisi	6
4.1.2.1 Amiloid beta (A β)	7
4.1.2.2 Tau	8
4.1.3 Alzheimer tanı ölçütleri	8
4.2 Hipokampus ve Anatomisi.....	11
4.3 Glimfatik Sistem	12
4.4 Uyku ve Sirkadiyen Ritim.....	14
4.5. Kalsiyum Görüntüleme	16
4.6. Eksitotoksisite	18
4.7 Proteomiks	19
5. MATERYAL VE METOT	21
5.1. Malzeme Listesi ve Gereçler.....	21

5.2.Araştırmanın Yapıldığı Yer	22
5.2.1 Deney hayvanları	23
5.3 Katılımcı ve Dahil Edilme Kriterleri.....	23
5.4 Kan Örneği Tüpünün Belirlenmesi	24
5.4.1 Kan örneklerinin temini ve transferi.....	25
5.4.2. Kan örneklerinden plazma elde edilişi ve saklanma koşulları.....	25
5.5. Plazma Oranı ve İnkübasyon Süre Optimizasyonu.....	26
5.6. Rekombinant Adeno-Asosiy Virüs (rAAV) Üretme.....	26
5.7. Primer Hipokampus Nöron Kültür Protokolü	28
5.7.1. Kültür kabı hazırlama	28
5.7.2. Kültürde kullanılacak vasat/ besiyerlerin hazırlanması	28
5.7.2.1. Diseksiyon vasatı	28
5.7.2.2. Kültür vasatı	28
5.7.2.3. Ekim vasatı.....	29
5.7.3 Kültür aşamaları.....	29
5.7.3.1 Klo-nlama halkaları kullanılarak hücre ekimi.....	30
5.7.3.2. Vasat tamamlama	32
5.7.3.3. Vasat değişimi	32
5.8. Virüsün Eklenmesi	32
5.9. Hipokampus Kültüründe Faz kontrast Mikroskop Görüntülerinin Alınması .	33
5.10. Glutamat Doz Belirleme Optimizasyonu	33
5.11. Primer Hipokampus Nöron Kültüründe Deney Akışı.....	34
5.12. Kalsiyum Görüntülemesi, Kayıt Alma ve Analizi	36
5.13. Proteomiks	41
5.13.1. Protein izolasyonu ve filtre yardımcı örnek hazırlama(FASP) protokolü	41
5.13.2. Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) analizi	44
5.14. İstatistiksel Yöntemler	46

6. BULGULAR	47
6.1. Demografik Veriler	47
6.2. Hipokampüs Kültürü	48
6.2.1. Hipokampal kültürde kalsiyum geçişinin yayılması.....	49
6.3. Hipokampal Nöron Kültüründe Alzheimer ve Kontrol Gruplarından Alınan Uyku Öncesi ve Sonrası Plazma Örneklerinin Etkin Hücre Sayısı, Olay Olma Sıklığı, Olay Genliği ve Süresinin Kalsiyuma Bağlı Aktivitesi.....	51
6.4. Hipokampal Nöronlarda Uyku Öncesi ve Sonrası Plazma Etkin Hücre Sayısı, Olay Sıklığı, Olay Süre ve Genlik Ortalamalarının Grup İçi ve Gruplar Arası Parametre Karşılaştırma, Ortalama ve Standart Hata Analizleri	55
6. 5. BALB/c ırkı Farelerden Elde Edilen Hipokampal Nöronlarda Alzheimer Hastalarında ve Yaşlı Sağlıklı Kontrollerde Kalsiyum aktivitesine Bağlı Spontan-Plazma, Spontan-Glutamat ve Plazma-Glutamat Deneylelerinde Uyku Önce Grup içi ve Uyku Sonra Grup içi Karşılaştırma Analizleri	64
6. 6. BALB/c ırkı Farelerden Elde Edilen Hipokampal Nöronlarda Alzheimer Hastalarında ve Yaşlı Sağlıklı Kontrollerde Kalsiyum aktivitesine Bağlı Spontan, Glutamat ve Plazma Deneylelerinde Uyku Öncesi ve Sonrası etkin hücre sayısı, olay sıklığı, olay süre ve genlik ortalamalarının Yüzdalik Değişimleri	68
6.7. LC-MS/MS ile Yapılan Plazma Protein Analiz Sonuçları.....	73
6.7.1 LC-MS/MS ile yapılan plazma protein analizlerinin panther sınıflandırma sistemi ile analiz edilmesi	81
6.7.1.1 Alzheimer hastalarının yaşlı sağlıklı kontrollere göre fazla bulunan uyku sonrası plazma protein sonuçlarının PANTHER sınıflandırma sistemi ile analiz edilmesi.....	81
6.7.1.2 Yaşlı sağlıklı kontrollerin Alzheimer hastalarına göre fazla bulunan uyku sonrası plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile analiz edilmesi.....	85
6.7.1.3. Alzheimer hastalarının yaşlı sağlıklı kontrollere göre fazla bulunan uyku öncesi plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile analiz edilmesi.....	89

6.7.1.4. Yaşlı sağlıklı kontrollerin Alzheimer hastalarına göre fazla bulunan uyku öncesi plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile analiz edilmesi.....	93
6.7.1.5. Yaşlı sağlıklı kontrollerde Uyku öncesinin uyku sonrasına göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile analiz edilmesi.....	94
6.7.1.6. Yaşlı sağlıklı kontrollerde uyku sonrasında uyku öncesine göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile analiz edilmesi.....	98
6.7.1.7. Alzheimer hastalarının uyku öncesinde uyku sonrasına göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile analiz edilmesi.....	102
6.7.1.8. Alzheimer hastalarının uyku sonrasında uyku öncesine göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile analiz edilmesi.....	105
6.7.2 STRING veritabanı ile protein-protein etkileşim analizi.....	109
6.7.2.1 Alzheimer hastalarının yaşlı sağlıklı kontrollere göre uyku öncesi ve sonrası fazla bulunan plazma proteinlerinde STRING veritabanı kullanılarak protein-protein etkileşimi	109
6.7.2.2 Yaşlı sağlıklı kontrollerin Alzheimer hastalarına göre uyku öncesi ve sonrası fazla bulunan plazma proteinlerinde STRING veritabanı kullanılarak protein-protein etkileşimi	111
7. TARTIŞMA	114
8. SONUÇ	121
9. KAYNAKLAR	122
10. EKLER	129
11. ETİK KURUL ONAYI	132
12. ÖZGEÇMİŞ	140

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ACN: Asetonitrilden

ADRDA: Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Hastalıklar Derneği

AH: Alzheimer Hastalığı

AMPA: Amino-3-Hidroksi-Metil-4-İzoksazol

APOE: Apolipoprotein E

APP: Amiloid Öncü Proteini

A β : Amiloid Beta

AQP-4: Aquaporin-4

BT: Bilgisayarlı Tomografi

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

CA: Cornu Amoris

CBD: Kortikobazal Dejenerasyon

CDR: Klinik Demans Derecelendirme Ölçeği

CNS: Merkezi Sinir Sistemi

DG: Dentat girus

Div: Day *in vitro*

DSM-V: Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal Tanı Ölçütü-5

EC: Entorinal korteks

EEG: Elektroensefalografi

EOAD: Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı

FA: Formik Asit

FBS: Fetal Bovin Serum

FASP: Filtre Yardımlı Örnek Hazırlama

GECI: Genetik Olarak Kodlanmış Kalsiyum İndikatörü

GFP: Yeşil Floresan Protein

GWAS: Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları

HCl: Hidroklorik Asit

ISF: İnterstisyel Sıvı

IAA: İyodoasetamid

iGluR: İyonotropik Glutamat Reseptör

LOAD: Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı

LP: Lomber Ponksiyon

LC-MS/MS: Sıvı Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi

MAP: Mikrotübül İlişkili Protein

MRI: Manyetik Rezonans Görüntüleme

NaCl: Sodyum Klorür

NFT: Nörofibriler Yumaklar

NINCDS: Ulusal Nörolojik ve İletişim Hastalıkları Enstitüsü ve İnme

NMDA: N-metil-D-aspartat

PET: Pozitron Emisyon Tomografi

PSP: İlerleyici Supranükleer Palsi

PTM: Post-Translasyonel Modifikasyon

PPI: Protein-Protein Etkileşimi

PANTHER: Evrimsel İlişkiler Yoluyla Protein Analizi

rAAV: Rekombinant Adeno-Asosiy  Virüs

SCN: Suprakiazmatik  ekirdek

STRING:

SMMT: Standardize Mini Mental Test

TMS: Transkraniyal Manyetik Stimülasyon

tDCS: Transkraniyal Doğru Akım Uyarımı

U : Uyku  ncesi

US: Uyku Sonrası

Ca²⁺: Kalsiyum

 m: Mikrometre

 l: Mikrolitre

 M: Mikromolar

mM: Milimolar

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 5. 1. Malzeme Listesi	21
Tablo 5. 2. Deneylerde Kullanılan Gereçler.....	21
Tablo 5. 3. Kalsiyum Görüntüleme ve Kayıt için Kullanılan Gereç ve Yazılım Paketleri.....	22
Tablo 6. 1. Alzheimer ve Kontrol Gruplarının Demografik Bilgilerinin Ortalama ve Standart Sapma Değerleri.....	47
Tablo 6. 2. Uyku Önce ve Sonrası Kontrol ve Alzheimer Gruplarının Hipokampal Hücre Kültüründe Kalsiyum Aktivite Parametrelerinin Ortalama ve Standart Hata Değerleri.....	56
Tablo 6. 3. BALB/c ırkı Farelerden Elde Edilen Hipokampal Nöronlarda Grup içi ve Gruplar arası Etkin hücre sayı Karşılaştırmaları.....	57
Tablo 6. 4. BALB/c Irkı Farelerden Elde Edilen Hipokampal Nöronlarda Grup İçi ve Gruplar Arası Olay Olma Sıklığı Karşılaştırmaları	59
Tablo 6. 5. BALB/c Irkı Farelerden Elde Edilen Hipokampal Nöronlarda Grup İçi ve Gruplar Arası Olay Süresi Karşılaştırmaları	60
Tablo 6. 6. BALB/c Irkı Farelerden Elde Edilen Hipokampal Nöronlarda Grup İçi ve Gruplar Arası Olay Genliği Karşılaştırmaları	61
Tablo 6. 7. Alzheimer Hastalarında ve Kontrollerde Spontan-Plazma, Spontan-Glutamat ve Plazma-Glutamat Deneylerinde Uyku Önce ve Sonra Grup İçi Olay Olma Sıklığı	66
Tablo 6. 8. Uyku Sonrası Alınan Plazma Örneklerinde Alzheimer Grubunun Kontrol Grubuna Göre Fazla Bulunan Proteinleri ve Bu Proteinlerin p Değeri ve Maksimum Katlanma Değişimleri	74
Tablo 6. 9. Uyku Sonrası Alınan Plazma Örneklerinde Kontrollerin Alzheimer Grubuna Göre Fazla Bulunan Proteinleri ve Bu Proteinlerin p Değeri ve Maksimum Katlanma Değişimleri	75
Tablo 6. 10. Uyku Öncesi Alınan Plazma Örneklerinde Alzheimer Grubunun Kontrol Grubuna Göre Fazla Bulunan Proteinleri ve Bu Proteinlerin p Değeri ve Maksimum Katlanma Değişimleri	76

Tablo 6. 11. Uyku Öncesi Alınan Plazma Örneklerinde Kontrollerin Alzheimer Grubuna Göre Fazla Bulunan Proteinleri ve Bu Proteinlerin p Değeri ve Maksimum Katlanma Değişimleri	76
Tablo 6. 12. Kontrollerin Uyku Öncesinde Alınan Plazma Örneklerinin Uyku Sonrasına Göre Fazla Bulunan Proteinleri ve Bu Proteinlerin p Değeri ve Maksimum Katlanma Değişimleri	77
Tablo 6. 13. Kontrollerin Uyku Sonrasında Alınan Plazma Örneklerinin Uyku öncesine Göre Fazla Bulunan Proteinleri ve Bu Proteinlerin p Değeri ve Maksimum Katlanma Değişimleri	78
Tablo 6. 14. Alzheimer Hastalarının Uyku Öncesinde Alınan Plazma Örneklerinin Uyku sonrasına Göre Fazla Bulunan Proteinleri ve Bu Proteinlerin p Değeri ve Maksimum Katlanma Değişimleri	79
Tablo 6. 15. Alzheimer Hastalarının Uyku Sonralarının Uyku Öncesine Göre Fazla Bulunan Proteinler Ve Proteinlerin p Değeri ve Maksimum Katlanma Değişim.....	80

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4. 1. Alzheimer Patolojisi	7
Şekil 4. 2. Hipokampus'un Yolak Bağlantıları.....	11
Şekil 4. 3. Beyin Omurilik-İnterstisyel -Sıvı Akışı ve Atık Klirens Yolağı	14
Şekil 4. 4. Uyku- Uyanıklık Döngüsü.....	15
Şekil 4. 5. Genetik olarak kodlanmış Ca^{2+} göstergeleri.....	17
Şekil 5. 1. a) Floresan Mikroskop, b) Deney Akış Diyagramı.....	36
Şekil 5. 2. Hipokampal Sinir Ağının Kalsiyum Görüntüsü, a) Spontan Kalsiyum Aktivitesi (Görüntüdeki Tüm Hipokampal Nöronlar) b) Spontan Kalsiyum Aktivitesinde Yanıp Sönen Hücre Gövdelerinin ROI Olarak Seçilmesi (Etkin Hücre Sayısı).....	38
Şekil 5. 3. Kalsiyum Etkinliğine Ait Kayıt Üzerinden Seçilmiş Hipokampal Hücre Gövdelerinin Seçildiği ROI'lerde Meydana Gelen Işık Şiddeti Değişimlerinin Frekansa, Zamana ve Genliğe Bağlı Olarak Çizilmiş Grafiği	40
Şekil 6. 1. Alzheimer ve Kontrol Grupları arasında sMMT Ortalama ve Anlamlılık Grafiği.....	48
Şekil 6. 2. Spontan, Plazmalı ve Glutamatlı Kalsiyum Aktivitesine Bağlı değişimlerin Etkin Hücre Sayı Görüntüleri, A) Kontrol-Uyku Öncesi, B) Kontrol Uyku Sonrası.....	52
Şekil 6. 3. Spontan, Plazmalı ve Glutamat'ın Kalsiyum Aktivitesine Bağlı Değişimlerin Etkin Hücre Sayı Görüntüleri.....	53
Şekil 6. 4. Kalsiyum Etkinliğine Ait Kayıt Üzerinden Seçilmiş ROI'ler de Meydana Gelen Işık Şiddeti Değişimlerinin Zamana Bağlı Olarak Çizilmiş Grafiği	54
Şekil 6. 5. Kalsiyuma Bağlı Aktivitede ROI'lerde Meydana Gelen Işık Şiddeti Değişimlerinin Zamana Bağlı Olarak Çizilmiş Grafiği	55
Şekil 6. 6. Uyku Öncesi Plazma Etkin Hücre Sayısı, Olay Olma Sıklığı, Olay Süre ve Genlik Grup Karşılaştırmaları.....	62
Şekil 6. 7. Uyku Öncesi ve Sonrası Plazma Etkin Hücre Sayısı, Olay Olma Sıklığı, Olay Süre ve Genlik Grup İçi Karşılaştırmaları.....	63
Şekil 6. 8. Uyku Öncesi ve Sonrası Plazma Olay Genlik Grup İçi Karşılaştırmaları	63

Şekil 6. 9. Alzheimer Hastalarında Spontan-Plazma, Spontan-Glutamat ve Plazma-Glutamat Deneylelerinde Uyku Öncesi Grup İçi Olay Olma Sıklığı.....	67
Şekil 6. 10. Kontrol Grubunda Spontan-Plazma, Spontan-Glutamat ve Plazma-	67
Şekil 6. 11. Alzheimer ve Yaşlı Sağlıklı Kontrollerin Hipokampal Nöron Kültüründe Kalsiyuma Bağlı Etkin Hücre Sayısının Yüzdelerik Değişimlerinin Artış-Azalış Grafiği	69
Şekil 6. 12. Alzheimer ve Yaşlı Sağlıklı Kontrollerin Hipokampal Nöron Kültüründe Kalsiyuma Bağlı Aktivitesinin Olay Sıklık Parametresinde Yüzdelerik Değişimlerinin Artış-Azalış Grafiği.....	70
Şekil 6. 13. Alzheimer ve Yaşlı Sağlıklı Kontrollerin Hipokampal Nöron Kültüründe Kalsiyuma Bağlı Aktivitesinin Olay Süresi Parametresinde Yüzdelerik Değişimlerinin Artış-Azalış Grafiği.....	71
Şekil 6. 14. Alzheimer ve Yaşlı Sağlıklı Kontrollerin Hipokampal Nöron Kültüründe Kalsiyuma Bağlı Aktivitesinin Olay Genlik Parametresinde Yüzdelerik Değişimlerinin Artış-Azalış Grafiği.....	72
Şekil 6. 15. Alzheimer Hastalarının Kontrollere Göre Yüksek Çıkan Uyku Sonrası Plazma Proteinlerinde PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Moleküler Fonksiyonları	81
Şekil 6. 16. Alzheimer Hastalarının Kontrollere Göre Yüksek Çıkan Uyku Sonrası Plazma Proteinlerinde Panther Sınıflandırma Sistemi ile Biyolojik Süreçleri.....	82
Şekil 6. 17. Alzheimer Hastalarının Kontrollere Göre Yüksek Çıkan Uyku Sonrası Plazma Proteinlerinde Panther Sınıflandırma Sistemi İle Protein Sınıflandırılması .	83
Şekil 6. 18. Alzheimer Hastalarının Kontrollere Göre Yüksek Çıkan Uyku Sonrası Plazma Proteinlerinde Panther Sınıflandırma Sistemi İle Yolak Analizleri.	84
Şekil 6. 19. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerin Alzheimer Hastalarına Göre Yüksek Çıkan Uyku Sonrası Proteinlerinde PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Moleküler Fonksiyonları.	85
Şekil 6. 20. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerin Alzheimer Hastalarına Göre Yüksek Çıkan Uyku Sonrası Proteinlerinde PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Biyolojik Süreçleri	86

Şekil 6. 21. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerin Alzheimer Hastalarına Göre Yüksek Çıkan Uyku Sonrası Proteinlerinde PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Protein Sınıflandırılması.....	87
Şekil 6. 22. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerin Alzheimer Hastalarına Göre Yüksek Çıkan Uyku Sonrası Proteinlerinde PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Yolak Analizleri.	88
Şekil 6. 23. Alzheimer Hastalarının Yaşlı Sağlıklı Kontrollere Göre Fazla Bulunan Uyku Öncesi Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi İle Moleküler Fonksiyonları.....	89
Şekil 6. 24. Alzheimer Hastalarının Yaşlı Sağlıklı Kontrollere Göre Fazla Bulunan Uyku Öncesi Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Biyolojik Süreçleri	90
Şekil 6. 25. Alzheimer Hastalarının Yaşlı Sağlıklı Kontrollere Göre Fazla Bulunan Uyku Öncesi Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Protein Sınıflandırması	91
Şekil 6. 26. Alzheimer Hastalarının Yaşlı Sağlıklı Kontrollere Göre Fazla Bulunan Uyku Öncesi Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Yolak Analizi	92
Şekil 6. 27. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerin Alzheimer Hastalarına Göre Fazla Bulunan Uyku Öncesi Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Moleküler Fonksiyonları.....	93
Şekil 6. 28. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerde Uyku Öncesinde Uyku Sonrasına Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi İle Moleküler Fonksiyonları.....	94
Şekil 6. 29. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerde Uyku Öncesinin Uyku Sonrasına Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi İle Biyolojik Süreçleri	95
Şekil 6. 30. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerde Uyku Öncesinde Uyku Sonrasına Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi İle Protein Sınıflandırması	96

Şekil 6. 31. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerde Uyku Öncesinde Uyku Sonrasına Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi İle Yolak Analizi	97
Şekil 6. 32. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerde Uyku Sonrasında Uyku Öncesine Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Moleküler Fonksiyonları	98
Şekil 6. 33. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerde Uyku Sonrasının Uyku Öncesine Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi İle Biyolojik Süreçleri	99
Şekil 6. 34. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerde Uyku Sonrasında Uyku Öncesine Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Protein Sınıflandırılması	100
Şekil 6. 35. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerde Uyku Sonrasının Uyku Öncesine Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi İle Yolak Analizi	101
Şekil 6. 36. Alzheimer Hastalarının Uyku Öncesinde Uyku Sonrasına Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi İle Moleküler Fonksiyonları	102
Şekil 6. 37. Alzheimer Hastalarının Uyku Öncesinde Uyku Sonrasına Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Biyolojik Süreçleri	103
Şekil 6. 38. Alzheimer Hastalarının Uyku Öncesinin Uyku Sonrasına Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Protein Sınıflandırılması	104
Şekil 6. 39. Alzheimer Hastalarının Uyku Sonrası Uyku Öncesine Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Moleküler Fonksiyonları	105
Şekil 6. 40. Alzheimer Hastalarının Uyku Sonrası Uyku Öncesine Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi İle Biyolojik Süreçleri	106

Şekil 6. 41. Alzheimer Hastalarının Uyku Sonrası Uyku Öncesine Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Protein Sınıflandırılması.....	107
Şekil 6. 42. Alzheimer Hastalarının Uyku Sonrası Uyku Öncesine Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi İle Yolak Analizi.....	108
Şekil 6. 43. Alzheimer Hastalarının Yaşlı Sağlıklı Kontrollere Göre Fazla Bulunan Uyku Sonrası Plazma Proteinlerinde STRING Veritabanı Kullanılarak Protein Protein Etkileşim Analizi.....	109
Şekil 6. 44. Alzheimer Hastalarının Yaşlı Sağlıklı Kontrollere Göre Fazla Bulunan Uyku Öncesi Plazma Proteinlerinin STRING Veritabanı Kullanılarak Protein-Protein Etkileşimi.....	110
Şekil 6. 45. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerin Uyku Sonrası Plazma Proteinlerinde STRING Veritabanı Kullanılarak Protein-Protein Etkileşimi.....	111
Şekil 6. 46. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerin Alzheimer Hastalarında Uyku Öncesi Plazma Proteinlerinde STRING Veritabanı Kullanılarak Protein-Protein Etkileşimi.....	112

RESİMLER LİSTESİ

Resim 5. 1. Iodixonal Gradient Tabakaları.....	27
Resim 5. 2. Diseksiyon Aşaması için Hazırlanmış Laminar Akımlı Kabin	30
Resim 5. 3. a) BALB/ c Yenidoğan Disekte Edilmiş Beyin, b) Disekte Edilmiş Hipokampus	30
Resim 5. 4. a) Cam Kültür Kabının Ortasına Klonlama Halkası İçerisine Hücre Ekimi, b) Ekim Vasatı Tamamlanmış Kültür Kabı.....	31
Resim 5. 5. Deney Düzeneği, a) Deney Düzeneği ve Beyin Ara-Yüz Programı, b-c) Kültür Kabının Mikroskopta Yandan Görünümü, d) Üstten Görünümü	37
Resim 6. 1. Primer Hipokampus Kültür Deneylerinin Faz kontrast Mikroskopuyla Çekilen Hücre Görüntüleri.....	49
Resim 6. 2. Kalsiyum Geçişinin Zamana Bağlı Yayılma Gösterimi. a-b) Bir Noktadan Kalsiyum Etkinliğinin Başlangıcı (ok işareti ile gösterilen yer), c-h) Kalsiyum Geçişinin Tüm Bölgede Yaygınlığı.....	50

1. ÖZET

ALZHEİMER HASTALARININ UYKU ÖNCE VE SONRASI PLAZMA PROTEOM PROFİLLERİNİN İN VİTRO NÖRONAL AKTİVİTE ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Alzheimer hastalığı, bellek, dil, düşünme, davranış ve kognitif becerilerin zamanla bozulmasına neden olan ve beyin hücrelerinin kaybıyla ilerleyen nörodejeneratif hastalıktır. Bu doğrultuda çalışmanın amacı, Alzheimer hastaları ve yaşlı sağlıklı kontrollerin uyku önce ve sonrası plazma proteom profillerinin primer hipokampal hücre kültürü deneyleri ile kalsiyum görüntüleme gerçekleştirilerek kalsiyuma bağlı nöronal aktiviteye etkisini incelemektir. Ayrıca glutamat eksitotoksitesinin hipokampal nöronlar üzerine olası etkisi incelenmiştir. Postnatal 1-2 günlük BALB/c ırkı fareler ile in vitro ortamda deneyler yapılmış AAV GcAMP virüs kullanılarak kalsiyum görüntüleme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın analizinde ki-kare, Mann-Whitney U, Wilcoxon sıralı işaretler testi ve bağımsız örneklem için t testleri kullanıldı. Bu çalışma sonucunda, Alzheimer hastalarının ve yaşlı sağlıklı kontrollerin uyku öncesi plazma ile kültüre edilen etkin hücre sayısı, kalsiyum geçişine bağlı nöronal aktivite süresi ve genlik karşılaştırmaları arasında anlamlı farklar bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Hem Alzheimer hem de yaşlı sağlıklı kontrollerde uyku önce ve sonrası plazma kalsiyum aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar mevcuttur. Alzheimer hastaları ve yaşlı sağlıklı kontrollerin plazma örnekleri arasında metabolik ve biyolojik süreç, yolak analizi, protein sınıflandırması ve protein-protein ilişkileri bakımından farklı proteom profilleri bulunmuştur. Tüm sonuçlar incelendiğinde, Alzheimer hastalarının uyku öncesi ve sonrası farklı bulunan plazma proteom profillerinin primer hipokampal hücre kültür deneylerinde kalsiyuma bağlı değişen nöronal aktiviteye etkisi olabileceği yönünde yorumlanabilir. Bu bağlamda, Alzheimer hastalığının araştırılmasında proteomiks biliminin ilerleyen yıllarda önemli bir tanı aracı olma yönünde önem kazacaktır.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer Hastalığı, GcAMP, Glimfatik Sistem, Kalsiyum Görüntüleme, Proteomiks

2. ABSTRACT

THE EFFECTS OF ALZHEIMER'S DISEASE BEFORE AND AFTER SLEEP PLASMA PROTEOME PROFILES ON IN VITRO NEURONAL ACTIVITY

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease that causes memory, language, thinking, behaviour and cognitive skills to deteriorate over time and progresses through the loss of brain cells. In this regard, the aim of the study was to examine the effect of plasma proteome profiles before and after sleep on calcium-dependent neuronal activity of Alzheimer's disease and elderly healthy controls by performing calcium imaging with primary hippocampal cell culture experiments. In addition, the possible effect of glutamate excitotoxicity on hippocampal neurons was investigated. Calcium imaging experiments were performed using the AAV GcAMP virus, which was experimented with in vitro with postnatal 1-2-day BALB/c mice. In the analysis of the study, chi-square, Mann-Whitney U, Wilcoxon signed rank test and independent samples t-test were used. As a result of this study, significant differences were found between the number of active cells cultured with before sleep plasma of Alzheimer's disease and elderly healthy controls, the time and amplitude comparisons of neuroactive activity due to calcium transition ($p \leq .05$). There were statistically significant differences between plasma calcium activities before and after sleep in both Alzheimer's diseases and elderly healthy controls. Plasma samples from Alzheimer's disease and elderly healthy controls had different proteome profiles in terms of metabolic and biological processes, pathway analysis, protein classification, and protein-protein interactions. When all the data are taken into consideration, it can be concluded that calcium-induced neuronal activity in primary hippocampus cell culture studies may be influenced by the different plasma proteome profiles of Alzheimer's disease before and after sleep. Proteomics will become more crucial in this context as an important diagnostic tool in the study of Alzheimer's disease.

Key Words: Alzheimer Disease, Calcium Imaging, GcAMP, Glymphatic system
Proteomics

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyamız gelişen bir yapının içerisinde varlığını devam ettiren canlılardan oluşmaktadır. Bu oluşumun belli bir düzen içerisindeki durumu beraberinde kaçınılmaz ciddi sağlık problemlerini de getirmektedir. Günümüzde gelişmiş ve sanayileşmiş toplumlarda bu problemlerle sıkça karşılaşmaktayız. Alzheimer hastalığı üzerinde önemle durulması gereken ve toplumu etkileyen ciddi bir hastalıktır.

Alzheimer hastalığında (AH) temelde hafıza yetisinin bozulduğu ve bununla birlikte bilişsel yetilerinde negatif yönde etkilendiği ilerleyici bir tablo izlenmektedir (1). Yaşa bağlı demanslara baktığımızda en çok görülen, histopatolojik açıdan ele alındığında da intrasellüler, nörofibriller yumak (tau), ve ekstrasellüler, beta amiloid plak (senil), protein birikiminin izlendiği nörodejeneratif bir hastalıktır (2). Bu hastalığın altında yatan mekanizmalarını anlamak tedavi, tanı ve yıkıcı etkilerine maruz kalan hasta ve hasta yakınları (3) için büyük bir öneme sahiptir. Geçmişten günümüze birçok açıdan araştırılan bu hastalık da altında yatan etiyojolojiye yüzlerce yeni teori ile açıklama getirilerek yaklaşılmaktadır. Fakat hala hastalığın tanısında kesin bir yargıya gidilememiştir. Ancak posmortem çalışmalar sonrasında kesin AH tanısı konmaktadır. Fakat kesin tanının yer almadığı durumlarda kullanılan 'olası AH' tanısı yerini, günümüzde aday çalışmalar sayesinde yüksek ölçüde hastalık tanısının varlığını mümkün kıldığı görülmektedir. Bu sebeple bu zamana kadar hastalığın patofizyolojisini anlamada yardımcı olan hatta hastalığa yakalanmama adına önleyici tedavi, egzersiz, diyet veya transkraniyal manyetik stimülasyon (TMS), transkraniyal doğru akım uyarımı (tDCS) vb gibi yeni terapötik yaklaşımların (2, 4) da olduğu birçok çalışmanın varlığından söz edebiliriz. Yapılan her çalışmanın sonuçları altta yatan mekanizmayı açıklamak için bir adım yakınlaştırmakta fakat hala Alzheimer hastalığını tam manasıyla açıklamaya yetememektedir. Bu yüzden öncelikli olarak patofizyolojik ve etiyojolojik açıdan hastalığın hangi unsurla araştırılacağı konusu bu bağlamda işin en önemli basamağını oluşturmaktadır. Bu hususta, son on yıldır popüler olarak her alanda karşımıza çıkan proteomiks disiplini ile hem de *in vitro* çalışmalarda canlı görüntüleme

faydalanılarak Alzheimer hastalığının uyku ve sirkadian ritim açısından ele alınması yeni yaklaşımlar arasında önemli bir yer tutmaktadır.

Sirkadiyen ritim yaklaşık olarak 24 saatlik bir zaman diliminde gerçekleşen gece-gündüz döngüsünde davranışsal, hücrenel, fizyolojik (5) ve biyolojik süreçlerde rol oynayan bir sistemdir. Bu tanımdan yola çıkarak, yapılan çalışmalarda, uyku yoksunluğu ve sirkadiyen ritim fonksiyon (6) bozukluklarının Alzheimer hastalığının ilerlemesine olumsuz yönde etkilediği rapor edilmiştir (7). Böylece her birinin karşılıklı etkileşim içerisinde olduğu varsayılmaktadır.

Alzheimer'da, lenfatik drenaj sisteminin araştırılması bu hastalığın altta yatan mekanizmalarına ışık tutabilecek bir diğer yaklaşımdır. Son yıllarda merkezi sinir sisteminde (MSS) lenfatik ağın yer aldığı, beyinde lenfatik drenajın varlığının tespiti ile ilgili çalışmalara yer verilmiştir (8). Buna ek olarak, beyin parakiminde glimfatik sistem tanımlanmıştır (9). Bu çalışmada, glimfatik sistemin özellikle uyku esnasında çalıştığı ve bu sistemin beyinde özelleşmiş kanallar sayesinde plakların ve birtakım atıkların birikiminin uzaklaştırılmasında yardımcı olduğu belirtilmiştir (9).

Çalışmamızda Alzheimer hastalarından farklı iki zamanda (gece/gündüz) alınan plazma proteom profillerinin *in vitro* nöronal aktivite üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Postnatal 1-2 günlük BALB/c ırkı fareler kullanılarak primer hipokampal kültür deneyleri gerçekleştirilmiş olup, floresan kalsiyum görüntüleme yöntemi ile nöronal aktiviteleri incelendi. Ayrıca, glutamat eksitotoksitesi *in vitro* koşullarda hipokampal nöronlar üzerine olası etkisi araştırıldı. Tüm bilgiler göz önünde bulundurulduğunda; i) Alzheimer hastalarının ve sağlıklı yaşlı kontrollerin plazma proteom profillerinin tanımlamaları ve sayıları bakımından nasıl farklılık göstereceği ii) uykunun, beyin lenfatik drenaj sisteminde rol oynayıp oynamadığı, iii) bu sistemin hasta ve kontrollerde uyku öncesi ve sonrası alınan plazmaların nöronal aktivite üzerine nasıl etki edeceği iv) olası etki varlığının *in vitro* ortamda primer hipokampal nöron kültür deneylerinde plazmanın Alzheimer hastalığının tanısında muhtemel bir belirteç olabileceği noktasında araştırılması hedeflendi.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 Alzheimer Hastalığı

Alois Alzheimer'ın, Alzheimer hastalığını keşfi (10) ile günümüze kadar hastalığın aydınlatılmasında birçok araştırma konusu ele alınmıştır. Alzheimer, demansın en yaygın sebepleri arasında gösterilen ve demans tanıları arasında %80 'ini oluşturan hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır (11). Demans, -bunama-, günlük yaşam aktivitelerinin kısıtlanmasıyla beraber bellek, yürütücü işlev bozukluğu, dil becerisi, görsel-algısal yeti, oryantasyon, planlama gibi kognitif becerilerde iki veya daha fazla yeti kaybıyla ilerleyen ve buna ek davranışsal bozukluğunda izlendiği klinik bir tablodur (12). AH, hipokampus ve neokortekste (13) belirli bölgelerde sinaps ve nöron kayıpları (14) ile karakterize merkezi sinir sistem ile ilişkili bozukluktur. Hastalığın prevalansı, 65 yaş üstü nüfusun yaklaşık %10'u ve 85 yaş üstü nüfusun yaklaşık %60'ı bu hastalıktan etkilenmektedir (15).

4.1.1 Etiyolojisi

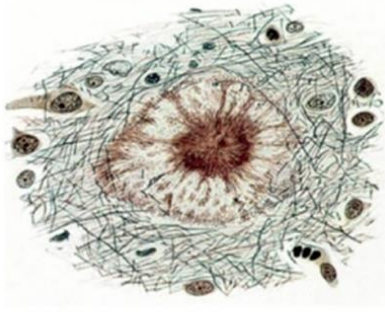
Alzheimer etiyolojisinde altında onlarca faktöre bağlı değişim ve oluşumlarla birçok mekanizmanın işin içerisinde yer aldığı bilinmektedir. Böylece hastalığın ele alış şeklini hücrel, genetik, kan ve BOS biyobelirteçleri, nörogörüntüleme, proteomiks, *in vivo* ve *in vitro* hayvan modelleri üzerinden bir bütünlük olgusu içerisinde gerçekleştirmek gerekir. Bundan yıllar önceki çalışmalarda örneğin 1980' lere kadar hastalık sadece amiloid beta ve tau proteinleri (16) üzerinden tanımlanarak açıklanmaya çalışılıyordu. Fakat günümüz teknolojisinde araştırmacılar sinaptik, enflamatuar ve vasküler (17), nöronal aktivite değişiklikleri (18), glimfatik akış bozukluklarının (9), kafa travması(19), nörodenerasyon (20), nöropsikolojik ve yaşa bağlı değişikliklerin (21) AH'nin etiyolojisinde etken olabileceğini tartışmaktadırlar. Hastalığın, risk faktörlerinde depresyon, genetik yatkınlık, diyet ve kardiyovasküler sistem hastalıkları vb gibi faktör varlığına işaret edilmektedir. Apolipoprotein E' nin homozigot (APOE) ε4 aleli taşıma hastalık geliştirme olasılığını çok yüksek bir sayıda arttıran geç başlangıçlı AD vakaları için bilinen en güçlü genetik risk faktörüdür. Nüfusun önemli bir oranda ε4 aleli taşıması AH patogenezi ve patofizyolojisindeki rolünü anlamak çok önemlidir (22). AH 'nin ortaya çıkmasında

hem genetik hem de çevresel risk faktörleri ile karşılaşmaktayız. Genel olarak bakıldığında en büyük risk faktörü yaştır. AH insidansı 65 yaşın altındaki yaş grubunda daha az görülme olasılığı rapor edilmiştir (21). Yaşlanan nüfusla birlikte genel sayılarda artış olsa da, yaşa özel insidans birkaç ülkede düşüyor gibi görünmektedir (23). AH, hastalığını ne zaman ortaya çıktığına ve kalıtsal olup olmadığı göz önünde bulundurularak ayrılabilir. Erken başlangıçlı Alzheimer hastalığı (EOAD) 65 yaşından önce görülürken, geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı (LOAD) 65 yaşından sonra ortaya çıkan, vakaların %95'inden fazlasını oluşturan hastalıktır (24). Ailesel AH Mendel (genellikle baskın) kalıtım gösterirken, sporadik AH basit bir ailesel bağlantı göstermez (25). Hemen hemen tüm EOAD kalıtımsaldır, bu hastalık sahibi vakalar APP, PSEN1 veya PSEN2'deki mutasyonlardan kaynaklanır, LOAD ise büyük çoğunluğu ailesel bağlantı göstermez. Genetik varyasyonların tanımlanması için genom çapında ilişkilendirme (GWAS, genom wide association studies) ve dizileme çalışmaları, sporadik vakalar için toplamda 20'den fazla risk lokusunu sağlamıştır (26) ancak bazı araştırmacılar çoğu zaman tanımlanabilir bir genetik nedenin olmadığını bildirmişlerdir (21).

4.1.2 Patofizyolojisi

Alzheimer hastalığının fizyolojisini anlamak için öncelikle histopatolojik, genetik, çevresel faktörler ve nörodejenerasyon başlıkları ile ele alınarak incelenmelidir. Yakın zamanda önerilen patojenik mekanizmaların çoğu amiloid kaskad ve tau hiperfosforilasyonu gibi iki temel hipotez açısından ele alınmaktadır (27). Amiloid- β birikiminin ya da Tau proteinin (Şekil 4.1) tek başlarına varlığı Alzheimer hastalığına kesin işaret etmeyeceğinden fizyolojisini de sadece bu konular etrafında ele almak patofizyolojisini açıklamaya yetmeyecektir.

a Amiloid plak



b Nörofibriler yumak



a) Amiloid plak, b) Nörofibriller yumak

Şekil 4. 1. Alzheimer Patolojisi (24)

4.1.2.1 Amiloid beta ($A\beta$)

Amiloid hipotezi hastalığın ana nedeni olarak β -amiloidi ($A\beta$) varlığına işaret etmektedir. Senil plaklarda biriken hücre dışı $A\beta$ proteininin yanlış katlanmasının ve yanlış katlanmış tau proteininin nörofibriler yumaklarda hücre içi birikiminin hafıza kaybına ve kafa karışıklığına sebep olduğu ve zamanla bireyin kişilik ve bilişsel gerileme yaşamasına neden olduğu belirtilmektedir (28). Birikmiş $A\beta$ peptidi senil plakların ana bileşenidir ve amiloid öncü proteini (APP)'nin daha büyük bir glikoproteinin proteolitik bölünmesinden türetilir. APP, nöronal gelişim, sinyalizasyon, hücre içi taşıma ve nöronal dengede rol oynayan tip 1 membran glikoproteinidir (29).

4.1.2.2 Tau

Tau, mikrotübül (MT) demetlerini stabilize ettiği nöronların aksonlarında bol miktarda bulunan bir mikrotübül ilişkili proteindir (MAP) (30). Hücre farklılaşması ve polarizasyonunda rol oynadığı bilinen, nöronlarda ve diğer hücrelerde mikrotübüllerin bir stabilizatörü olarak tau'nun hücre biyolojik rolünün anlaşılması üzerine çalışılmıştır. Alzheimer hastalığının, modifiye edilmiş tau proteininden oluşan nörofibriler yumaklara sahip olduğu iyi bilinmektedir. 1980'lerin ortalarında, hayatını kaybeden AH tanısı almış hastaların nörofibriler yumaklar (NFT) içeren beyin örneklerinde, tau proteinlerine karşı yükseltilmiş antiserumlarla immun lekeleme varlığı bulundu, bu da tau'nun nörodejenerasyonda zararlı bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (31, 32). Anormal tau proteini ile ilişkili diğer şiddetli ve ilerleyici beyin hastalıkları, kronik travmatik ensefalopati, Pick hastalığı, parkinsonizm-17 (FTDP-17) (33) ile frontotemporal demans, ilerleyici supranükleer Palsi (PSP) ve kortikobazal dejenerasyondur (CBD).

4.1.3 Alzheimer tanı ölçütleri

Alzheimer hastalığında yaygın olarak kullanılan ve çalışmamızın yöntem kısmında da yer verdiğimiz tanı kriterleri için iki ölçüt mevcuttur. İlki Ulusal Nörolojik ve İletişim Hastalıkları Enstitüsü ve İnme diğeri Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Hastalıklar Derneği (NINCDS, Neurological and Communicative Disorders and Stroke ve ADRDA, Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) tarafından (34, 35) bilime kazandırılmış etkili ve geniş açıdan ele alınan tanı ölçütü (Tablo 4.1.) diğeri ise son basımının geçtiğimiz yıllarda tamamlanmasıyla oluşan el kitabı niteliğindeki demans tanı kriterleri için başvuru Amerikan Psikiyatri Birliği Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayısal tanı ölçütünün yayınladığı kriterlerdir (DSM-V) (36). Bunların yanında en önemli tanı araçlarına ek olarak çalışmamızda iyi alınmış öz ve soy geçmiş sorgulaması, takibi uzman nörolog ve ilişkili hekimlerin varlığı ve son yıllarda bilim dünyasında popüler olarak başvuru nöropsikometrik testlerdir. Bu testler dil, bellek, görsel-algısal yeti, oryantasyon, yürütücü işlevler ve davranışsal işlevleri ölçen testler bütünüdür. Diğer hastalıkları dışlama esasına bağlı kalmak kaidesiyle yapılan kan testlerinden ve Pozitron emisyon tomografisi (PET), Bilgisayarlı tomografi (BT) ve Manyetik Rezonans tekniği (MR) gibi

nörogörünteleme ve elektroensefalografi (EEG) gibi elektrofizyolojik ayırıcı tanılardan yararlanılmaktadır.

Tablo 4. 1. Alzheimer Hastalığının NINCDS- ADRDA Tanı Klinik Kriterleri

I- Olası AH' nin Klinik Tanı Kriterleri:

- Yapılan birtakım klinik muayene ve Mini mental test, Blessed demans skalası ve buna ek muayenelerle belgelenmiş ve nöropsikolojik testlerle desteklenerek doğrulanmış demans tablosunun olması.
- Bilişsel işlevlerde iki ya da daha fazla alanda bozukluğun olması
- Bellek ve diğer bilişsel işlevlerde ilerleyici kötüleşme seyredilmesi.
- Bilinç bozukluğunun olmaması.
- Hastalığın başlangıcının 40-90 yaşlarında çoğunlukla 65 yaşın üzerinde olması, ayırıcı tanıda bellekte ve diğer bilişsel işlevlerde ilerleyici bozulmaya yol açabilecek sistemik bir hastalığın ya da bir beyin hastalığının bulunmaması

II- Olası AH Tanı Destek Kriterleri:

- Dil (afazi), motor işlevler (apraksi), algı (agnozi) gibi özel kognitif işlevlerde ilerleyici bozulmanın varlığı.
- Davranışta değişiklikler ve günlük aktivitede yetersizlik yaşanması
- Özellikle nöropatolojik olarak doğrulanmış benzer aile öyküsünün varlığı
- Laboratuvar sonuçlarının:
- Standart yöntemle normal BOS, lomber ponksiyon (LP) değerleri
- EEG' de normal patern ya da artmış yavaş dalga aktivitesi gibi nonspesifik değişiklikler. *Bilgisayarlı tomografide serebral atrofi delilleri ile arka arkaya yapılan çekimlerde progresyonun saptanması

III- AH Dışı Demans Nedenleri Dışlandığında "Olası AH" Tanısı ile Uyumlu Diğer Klinik Özellikler:

- Hastalığın süreci boyunca platolu bir seyrin olması
- Depresyon, insomni, inkontinans, delüzyonlar, illüzyonlar, halüsinasyonlar, katastrofik verbal, emosyonel veya fiziksel feveranlar, seksüel bozukluklar, kilo kaybı gibi eşlik eden semptomlar.

-
- Bazı hastalarda özellikle ileri hastalık döneminde görülen artmış kas tonusu, miyoklonus veya yürüyüş bozuklukları gibi motor işaretlerden oluşan diğer nörolojik anomaliler.
 - Epileptik nöbetler (ileri hastalık döneminde).
 - Yaşa göre normal bilgisayar tomografisi

IV- Olası AH Tanısından Uzaklaşır veya Şüpheli Kılan Durumlar:

- Ani, apoplektik başlangıç.
- Hastalığın erken dönemlerinde hemiparezi, duyu kusuru, görme alanı defekti ve inkoordinasyon gibi fokal nörolojik bulgular.
- Başlangıçta veya hastalığın çok erken döneminde ortaya çıkan epileptik nöbetler veya yürüyüş bozuklukları

V- Muhtemel AH'nin Klinik Tanısı:

- Demans sendromu temelinde demansı açıklayıcı yeterlilikte diğer nörolojik, psikiyatrik veya sistemik bozuklukların yokluğunda ve başlangıçta, prezantasyonda ya da klinik gidişte değişiklikler olduğunda.
- Özellikle araştırma çalışmalarında kullanılmak üzere tek bir alanda tedricen ilerleyen şiddetli ve diğer sebebi belirlenebilen nedenlere bağlanamayan bilişsel bozukluk

VI- Kesin AH Tanı Kriterleri:

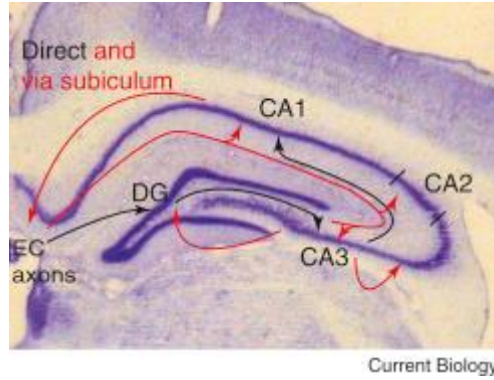
- Olası AH' nin klinik tanı kriterleri
- Biyopsi veya otopside histopatolojik tanı bulgularının olması

VII- Araştırma amacı ile hastalık özel görünümüleri olan alt tiplere ayrılabilir. Buna göre AH'nin sınıflandırılması:

- Ailesel oluş
 - 65 yaştan önce başlangıç.
 - Trizomi 21'in varlığı
 - Parkinson hastalığı gibi diğer durumlarla birliktelik olma durumunda
-

4.2 Hipokampüs ve Anatomisi

Anatomik açıdan incelendiğinde hipokampüs, insanlarda medial temporal lobun derinliklerinde, diseksiyon çalışmalarında denizatına benzerliği ile adını alan birçok yolakla projeksiyon yapan uzun yapı olarak tanımlanır. Hayvan çalışmalarına baktığımızda da kemirgenlerde hemen hemen neokorteksin altına uzanan yapıdır. Hipokampüsün, perforan, yosunsu lif yolu ve Schaffer kollatrel yolu olarak anatomik bağlantıları vardır. Trisinaptik döngü olarak gösterilen Cornu Amoris (CA)1, 2 ve 3 (Şekil 4.2) gösterilmiştir. Entorhinal korteks, perforan yolun aksonları ile dentat girus (DG) bölgesine ana kortikal girdiyi sağlar. DG' de yosunsu lifleri CA3 bölgesindeki piramidal nöronlarla projeksiyon sağlar. Diğer bir yolak olan, Schaffer kollatrel yoluyla CA3'ten CA1 bölgesine sinaps bağlantıları gerçekleşir. Subikulundan tekrar entorinal kortekese geri döner. Entorinal korteks sadece dentat girus'un yanında doğrudan CA3 ve CA1 bölgelerine de projeksiyon yapar. CA1 ve CA3 arasında bir geçiş bölgesi olarak kabul edilen CA2 bölgesinin kendisine özgü işlevlerinden söz edilmektedir (37).



Siyah okla gösterilmiş alan trisinaptik döngü olarak adlandırılan CA1, CA2 ve CA3 temsil etmektedir.

CA: Cornu Amoris, EC: Entorinal korteks, DG: Dentat girus. Kırmızı oklar da hipokampüs de gerçekleşen önemli bir diğer yolları kabaca gösterir.

Şekil 4. 2. Hipokampüs'ün Yolak Bağlantıları (37)

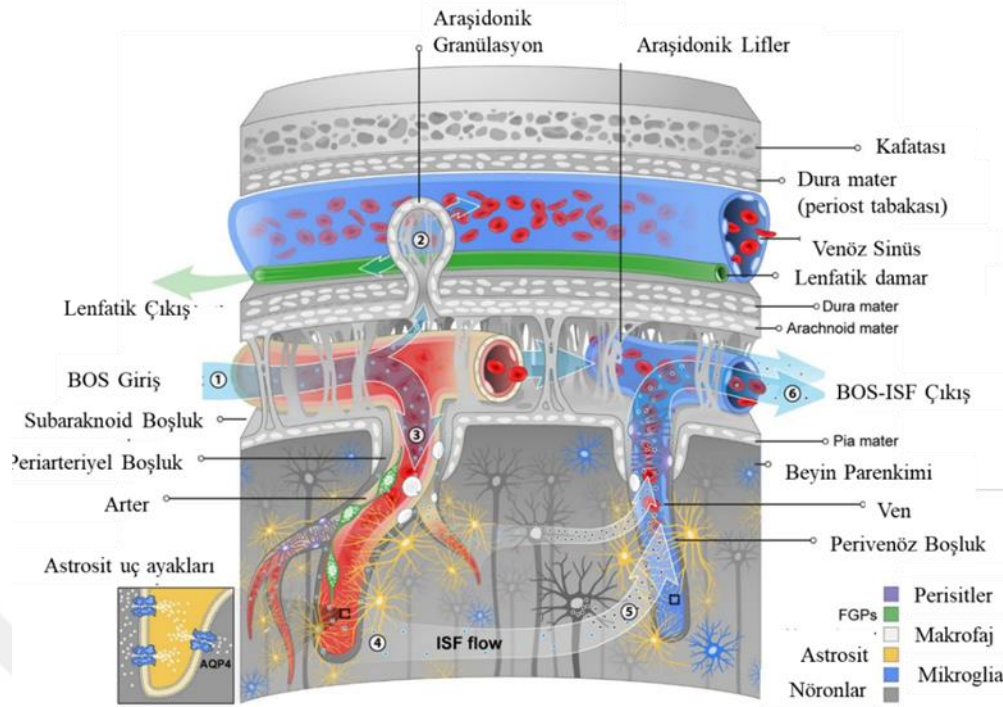
4.3 Glimfatik Sistem

İnsan vücudu sinir sistemi, dolaşım, solunum gibi tüm hayati işlevlerinde homeostazın (denge) korunması niteliğini gözetir. Bunu belli bilgi akışı ile sağlamaktadır. Sistemimizin korunması gereken bir diğer denge unsuru da vücut sıvılarımızdır. Sıvı homeostazının korunması lenfatik sistem ve kan damarları aracılığıyla gerçekleşir. Yapılan son çalışmalarda beyin-omurilik sıvısının (BOS) ve interstisyel sıvınının (ISF) birbirleri ile arasında bir takım protein, metabolit gibi atık dengesini sağlamak üzere sürekli devam eden sıvı değişimlerin gerçekleştiği bulunmuştur (Şekil 4.3). Bu değişim, periarteryal boşluk boyunca BOS'un taşınım akışı ile kolaylaştırılır (38). Subaraknoid boşluktan, beyin omur ilik sıvısı Virchow-Robin boşluklarına yönlendirilir (39). Virchow-Robin boşlukları BOS ile doldurulur ve damara bakan iç duvarda ve perivasküler astrositik uç ayaklara bakan dış duvarda bir leptomeningeal hücre tabakası ile etrafı sınırlanır. Merkezi sinir sisteminde (CNS) damar sisteminin önemli bir özelliği beyin parankimi içindeki tüm arteriyollerin, kılcal damarların ve venüllerin astrositik vasküler uç ayaklarla çevrili olmasıdır. Bu astrositik uç ayaklar, damarları çevreleyen halka şeklindeki bir tünele benzeyen perivasküler boşluğun dış duvarını oluşturur. Penetran arteriyoller beyin parankiminde daha derine daraldıkça, BOS içeren Virchow-Robin boşlukları bazal lamina ile sürekli hale gelir (9). Arteriyel pulsatilite, solunum ve BOS basınç gradyanları Virchow-Robin boşluklarına yönlendirmeden sorumludur. Bu yönetime beyin damar sistemini saran astrositik son ayaklarında tespit edilen aquaporin-4 (AQP-4) kanallarının, -su kanalı proteini-, olanak sağladığı belirtilmiştir (39). Bu sistem işlev olarak periferik dokudaki lenfatik sisteme benzerliğine ve konvektif sıvı taşınmasında glial AQP4 kanallarının yadsınamayacak önemine dayanarak glimfatik sistem adını almıştır (9).

ISF, Amiloid- β klirensinin güçlü bir şekilde bağlı olduğu sistemik lenfatiklere eşdeğer bir fonksiyona sahiptir. Bununla birlikte, fazla β -amiloid varlığında proteinin birikmesi ve buna bağlı olarak senil plak oluşumunun kaçınılmaz olduğu izlenmektedir. Amiloid- β drenajında, Virchow-Robin boşlukları Amiloid- β üretim ve temizleme için kritik öneme sahiptir. Bu konuda ventriküler sistemi ele aldığımızda, potansiyel Amiloid- β toksisitesini nötralize etmek için sistemik lenfatik sistemin,

lenf dögümlerine benzer bir rol oynadığını söyleyebilir. Hem Amiloid- β 'nin üretimi hem de birikiminin önlenmesi adına temizleme fonksiyonu arasındaki hassas denge, uygun nöral fonksiyonu sürdürmede çok önemli bir faktör olarak görünmektedir. Belirtilen bu hassas dengenin bozulması durumunda Alzheimer gibi bir hastalığın görülmesinde rol oynayabilir (39). Pozitron Emisyon Tomografisi (PET) ile yapılan bir çalışmada Alzheimer hastalarının genç katılımcılara göre BOS'da sıvı akışının azlığı izlenmiştir. Bu azalma yaşlanma ile ilgili bir sürecin temsili olarak yorumlanmıştır. Amiloid- β temizleme hızı ve sıvı akışının bu hastalarda azalması AH patogenizinde bir faktör oynayabileceğini belirtmişlerdir (40).

Dinlenme ve bellek konsolidasyonunun (41) sağlanması için gerekli temel biyolojik fonksiyonlara hizmet eden uyku kavramı son yıllarda glimfatik sistemin çalışma alanlarında da karşımıza çıkmaktadır. Son yapılan çalışmalarda, uyku sırasında glimfatik aktivitenin çarpıcı biçimde arttığını ve uyanıklık esnasında bu işlevin baskılandığını gösteren sonuçlar uykunun atık temizliğinde önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir. Bunu destekleyen çalışmalardan birinde anestezi madde kullanım sonucunda atık temizliğine yardım ettiğine dair bulunan sonuçları doğal uyku esnasında da yapılan deneylerle tekrarlamışlardır. Buna göre canlı farelerde tetrametilamonyum difüzyonunun ve *in vivo* 2-foton görüntüleme deneylerinde doğal uyku veya anestezinin, interstisyel boşlukta %60'lık bir artış ile ilişkili olduğunu ve BOS' un ISF ile konvektif değişiminde çarpıcı bir artışa yol açıldığını rapor etmişlerdir. Buna karşılık, ISF'nin konvektif akışları, uyku sırasında β -amiloid klirensi oranını arttırdı. (42). Bu artışın gözlenmesi sonucu uykunun glimfatik sistemde metabolik atıkların uzaklaştırılmasında önemli bir fonksiyon üstlendiğini göstermektedir (9).



Ventriküllerden BOS akışı subaraknoid boşluğa (1) ve periarteriyel boşluk yoluyla kan damarları boyunca astrositler (2) tarafından oluşturulur. Aquaporin-4 (AQP4) kanalları üzerindeki astrosit uç ayakları, BOS'un beyne girmesine izin vererek beyin parankimi boyunca ISF akışına neden olur (3), makromoleküllerin toplanması (4) (örn:nöronal atık) ve subaraknoid boşluğa geri dönerek BOS-ISF akışına neden olur (5). Makromoleküller ve BOS, subaraknoid granülasyonlar yoluyla kafatasından (6) ve dural lenfatik damarlar yoluyla çıkabilir. Makrofaj (gri) ve FGP (yeşil) süpürücü makromoleküller beyin parankiminde bulunur ve kan damarları boyunca uzanır.

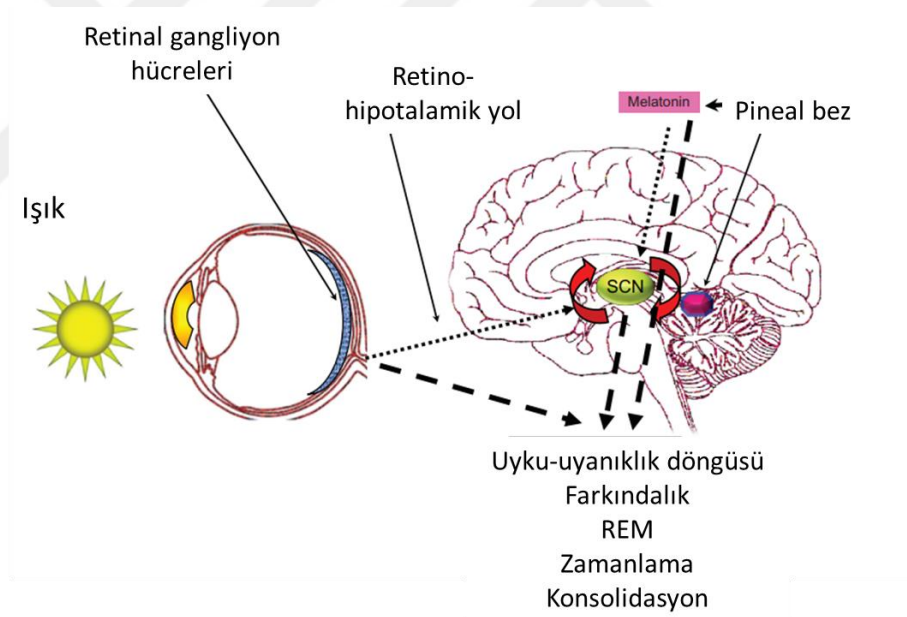
Şekil 4. 3. Beyin Omurilik-İnterstisyel -Sıvı Akışı ve Atık Klirens Yoluğu (43).

4.4 Uyku ve Sirkadiyen Ritim

Sirkadiyen ritim tüm canlı organizmalarda gerçekleştiği bilinen, iç çevresel faktörlere de bağlı olarak vücut ısısı, kan basıncı ve en önemli unsurlardan biri olan uykunun yönetilmesinde (44) uyku-uyanıklık döngüleri de dahil olmak üzere yaklaşık olarak 24 saatlik bir zaman diliminde davranışsal, hücrenel, fizyolojik (5) ve biyolojik süreçlerde rol oynayan bir sistemdir.

Alzheimer hastalığında sirkadian ritim fonksiyon bozukluklarına işaret eden bazı bulgular hastaların şikayetleriyle paralel olarak ortaya çıkmaktadır. Hastaların uyku-uyanıklık döngüsündeki değişiklikler ilk etapta göze çarpmaktadır (45).

Düzensiz uyku-uyanıklılık hastalığının semptomlarından biridir. Bununla birlikte uykusuzluk ile devam eden gereksiz gündüz uykululuk hali gibi semptomlar da hastalar tarafından belirtilmiştir (46). AH hastalığı ile ilişkili olduğu bilinen A β birimi ve Tau'nun uyku yoksunluğuna bağlı çalışmalar yapılmıştır (47). İnsan deney çalışmasında BOS tau seviyeleri, uyku yoksunluğu sırasında %50'nin üzerinde arttığı izlenmiştir (48). Son olarak, kesitsel bir çalışmada, klinik öncesi AH ile aktivite-dinlenme ritimlerinin bozulması arasında ilişki bulmuşlardır. Klinik öncesi amiloid plakları veya daha yüksek BOS fosforile edilmiş-tau ile A β -42 oranları, aktivite-dinlenme ritimlerinin parçalandığını gösteren günlük aktivitelerde artan değişkenlik ile ilişkilendirilmiştir. Klinik öncesi AH' de sirkadiyen ritimlerdeki bozulmanın erken patogenezi anlamada bir biyobelirteç olarak katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür (49).



Şekil 4. 4. Uyku- Uyanıklık Döngüsü (50).

Suprakiazmatik çekirdekteki (SCN) ana saat, uyku-uyanıklık döngüsünün zamanlamasını kontrol etmenin yanı sıra uyarılmayı, REM uykusunu ve uyku konsolidasyonunun destekler. Işık, retino-hipotalamik aracılığıyla doğrudan SCN' e yansıyan melanopsin içeren retina ganglion hücrelerini içeren bir mekanizma yoluyla

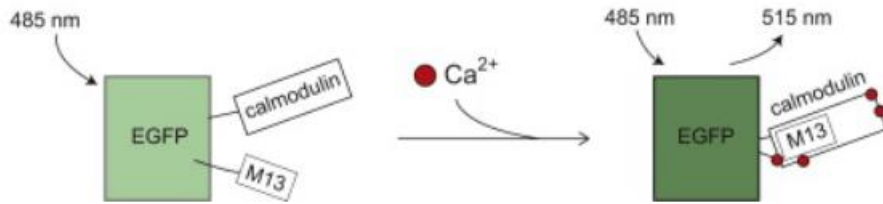
SCN' de ki salınımları sıfırlar. Dolaylı bir yoldan sirkadiyen bilgi, melatonin hormonunun üretildiği epifiz bezine ulaşır ve bu da salınımların fazını değiştirebilir. SCN'de. Retinal ganglion hücrelerinden hem melatonin hem de nöral bilgi aynı zamanda doğrudan uyku-uyanıklık sisteminin kendisi üzerinde de etki edebilir. Böylece ışık girişi ve sirkadiyen sistem uyku-uyanıklık döngüsünün özelliklerini modüle etmek için birlikte çalışırlar. İnce, noktalı oklar, SCN' de (dönen kırmızı okla gösterilmiştir) salınımlı merkezi pacemaker'a doğrudan bağlı giriş yollarını temsil etmektedir. Kalın kesikli oklar, uyku-uyanıklık döngüsünü etkileyen farklı çıkış yollarını temsil eder. Hem ışık hem de melatonin bileşimi merkezi sirkadiyen giriş yolunun yanı sıra uyku-uyanıklık davranışını kontrol eden çıkış sinyali oluşturur (Şekil 4.4) (50).

4.5. Kalsiyum Görüntüleme

Kalsiyum görüntülemesi, tek nöron veya nöron popülasyonlarında aksiyon potansiyeli ateşlemesi gibi nöronal dinamiklerin dolaylı olarak gözlemlenmesini sağlar (51). Kalsiyum, hücre içi sinyaller üreterek nöronlarda iletişim kuran ve temel fonksiyonları kontrol eden çok yönlü işlevleri olan bir iyonudur. Bu özelliği sayesinde kalsiyum görüntülemesi çalışmalarda önemli bir yer tutmaktadır. Nedeni, kalsiyum sinyallerinin yüksek özellikli işlevlerini iyi tanımlanmış hücresel alt bölümlerinde yerine getirmesidir (52). Aynı zamanda kalp kası hücre kontraksiyonu (53) ve hücre döngü regülasyonu gibi (54) hücrelerde biyolojik organizmadaki belli fonksiyonlarda görev almaktadır. Hücrenin bileşenlerinden olan presinaptik/postsinaptik hücrede ve aynı zamanda hücrenin çekirdeğinde belli işlevleri üstlenir (52).

Hücre içi kalsiyum sinyalleri, nörotransmitter salınımindan gen transkripsiyonuna kadar geniş bir zaman aralığında bu sürecin regülasyonunu sağlar. Tüm hepsine bakıldığında, zaman süreci, genlik ve en önemlisi, iyi tanımlanmış hücresel alt bölümlerdeki yerel eylem bölgesi, hücre içi kalsiyum sinyallerinde önemli bir belirleyici olarak karşımıza çıkmaktadır (55). Nöronal ağ aktivitesinin sayısal yönden ölçülerek izlenmesinde, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda (56, 57) kalsiyum görüntüleme tekniği uygulanmaktadır. Ca^{2+} göstergeleri fizyolojik sinyalleşmeyi önemli ölçüde etkileyebilen Ca^{2+} tamponlarıdır (58) Floresan kalsiyum indikatörleri kullanılarak hücre içi kalsiyum varlığının optik yollarla ölçülmesi

sağlanır (51). Kalsiyum görüntülemeyi sağlayan kimyasal indikatörler mevcuttur ve çok geniş bir aralıkta (<50 nM - >50 μ M) hücre içi Ca^{2+} görüntülemesine izin verir. Görüntüleme için kullanılan göstergeler, tek dalga boyu veya orantısız boyalar olarak ayrılabilir. Her ikisinde de spektral özelliklerine bağlı özel lazerler, filtreler ve/veya algılama yöntemleri gerektirir (58). Bazı kimyasal göstergeler, Fura 2 (59), kalsiyum green-1 (60), fluo-4 (61) sıkça kalsiyum görüntüleme için kullanılmaktadır. Genetik olarak kodlanmış Ca^{2+} göstergeleri (GECI) görüntüleme alanında gelişmeye yardımcı olmuştur (62). İlk protein bazlı Ca^{2+} göstergesi, hücrelere enjekte edilen denizanası *Aequorea Victoria*'dan saflaştırılan biyoluminesan kalsiyum bağlayıcı fotoprotein (63), olan aequorindir (17). 1970'li yıllarda, Ca^{2+} ölçmek için önemli bir indikatör olmuştur. Çalışmamızın yöntemleri içerisinde kullandığımız bir önemli gelişimde kaynaşmış protein-GFP (yeşil floresan protein) yapılarının oluşumu yoluyla canlı hücrelerdeki proteinlerin uzaysal ve zamansal dağılımının araştırılmasında kullanılan yeşil floresan protein (GFP)' dir. Bu eşleşme, hedef protein ekspresyonu üzerine GFP' nin birlikte ekspresyonuyla proteini floresan ile işaretlemesi anlamına gelmektedir (62, 64). GCaMP, GECI (Şekil 4.5) ailesine ait bir indikatördür.



Kalsiyumun gcamp'e bağlanmasından sonra konformasyonel intramoleküler değişiklikler, yayılan floresanda 515 nm'lik bir artışa yol açar

Şekil 4. 5. Genetik olarak kodlanmış Ca^{2+} göstergeleri. (52).

GECI' ailesinin başlıca temsilcisi olarak son yıllarda sıkça kullanılan GCaMP'ler (65) kalsiyum bağlayıcı protein kalmodulin ve diğer tarafında kalmodulin bağlayıcı peptit M13 ile çevrili zenginleştirilmiş yeşil floresan

proteininden (EGFP) oluşmaktadır (52, 66). Ca^{2+} varlığında, kalmodulin-M13 etkileşimleri, yayılan floresanda bir artışa yol açan florofor ortamında konformasyonel değişiklikler ortaya çıkarır (67).

4.6. Eksitotoksisite

Nörodejeneratif hastalıklarda eksitotoksisite konulu çalışmalar hastalığın altta yatan mekanizmalarının anlaşılmasında önemini korumaktadır. Glutamat reseptörlerinin uyarıcı amino asitler tarafından aşırı aktivasyonu bir dizi bozucu sonuçlara yol açmaktadır. Hücre ölümünü tetikleyerek Ca^{2+} homeostazında düzensizlik, serbest radikallerin oluşumu, mitokondriyal işlev bozukluğu, oksidatif stres üretimi ve ikincil eksitotoksisite sorunları aşırı glutamat uyarılmasında karşılaşılan zararlı etkilerdendir (68, 69). İyonotropik glutamat reseptörleri (iGluR'ler) temel olarak üç iyon kanalı reseptörlerinden oluşmaktadır. Bunlar, amino-3-hidroksi-metil-4-izoksazol (AMPA), kainat ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleridir. Bu üç iGluR alt tipi seçici olarak aktive olan belirli agonistlerin adını almıştır. Glutamat kapılı kanalların farklı fizyolojik ve farmakolojik özellikleri olmasına karşın yapısal ortak benzerlikleri mevcuttur (70). Bazı çalışmalar toksisiteye neden olan unsurun NMDA yoluyla aşırı Ca^{2+} girişine aracılık ettiğini göstermektedir (71).

İskemi, Parkinson hastalığı veya Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif bozukluklarda, nöronal hücreler, hücre ölümü ile karşı karşıya gelmenin yanında mitokondriyal disfonksiyonu indükleyen aşırı iyonik ve biyokimyasal streslerle karşı karşıya gelmektedir. Glutamat, sinir sistemimizde uyarıcı sınıfta yer alan bir nörotransmitterdir. Aşırı glutamat salınımı bu hastalıkların temel bir özelliğidir. Önemli olarak, aşırı miktarda hücre dışı glutamat toksiktir ve nöron ölümüyle sonuçlanır. Yüksek hücre dışı glutamat, NMDA reseptörü ve AMPA iyonotropik glutamat reseptörlerinin ve metabotropik glutamat reseptörlerini aktive eder (72). Hipotalamik-hipofiz-adrenal stres ekseninin aktivasyon artışı, nöronları eksitotoksisiteye karşı savunmasız bırakmaktadır (73). Glutamat reseptör aktivasyonu, kalsiyuma bağlı enzimleri aktive eden, reaktif oksijen ve nitrojen türlerini artıran ve hücre ölüm basamaklarını tetikleyen kalsiyum aşırı yüklenmesine katkıda bulunur. Glutamat eksitotoksisitesinde, kalsiyumun aşırı olması ve

mitokondriyal membran potansiyelinin çökmesi, hücrelerin ölmeye iten iki anahtar adımdır (74, 75).

4.7 Proteomiks

Proteomik, hızla gelişim sağlayan yeni bir 'omik' türüdür. Proteom 1995 yılında Marc Wilkins tarafından oluşturuldu (76). Proteomik, proteinlerin etkileşimleri, işlevi, bileşimi ve yapıları ile hücrel aktivitelerini incelemektedir (77). Proteomik, organizmanın yapısının ve işlevinin genomiklerden daha iyi anlaşılmasını sağlarken protein ekspresyonu zamana ve çevresel koşullara göre değiştiği için de genomik yaklaşımlardan çok daha karmaşık olduğu bilinmektedir (78). Çoğu, post-translasyonel modifikasyon (PTM) gibi modifikasyonlar içeren yaklaşık bir milyon insan proteininin varlığı tahmin edilmektedir.

Birçok protein tayin yöntemleri yıllar geçtikçe gelişerek günümüze kadar gelmektedir (79). Tek (1D) ve iki boyutlu (2D) jel elektroforezi (2-DE) (80) yöntemi ve çok boyutlu protein tanımlama teknolojisi araştırmalarında jel içermeyen yüksek verimli tarama teknolojileri de mevcuttur. Bunun yanında Shotgun proteomik (81), 2D farklı jel elektroforezi (2D-DIGE) (80) ve protein mikrodizileri (82) dokularda, organellerde ve hücrelerde kullanılabilir. Büyük ölçekli western blot deneyleri, çoklu reaksiyon izleme deneyleri ve yüksek kütle çözünürlüklü sıvı kromatografisi (LC)-tandem kütle spektrometresi (MS) etiketleme yapmadan, yüksek verimli işleme için yaygın olarak kullanılır (83).

Sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) gibi kromatografik yöntemler laboratuvarlar genelinde ilaç maddeleri ve biyolojik numunelerin araştırılması gibi yaygın olarak kalitatif ve kantitatif analizler için kullanılmaktadır (84). Plazma, tükürük gibi birçok numune ile bu yöntemler aracılığı ile çalışılmaktadır. AH beyin dokusunu inceleyen proteomik çalışmaların çoğu, toplu doku numuneleri kullanarak AH ile yaş uyumlu, bilişsel olarak normal kontroller arasındaki proteomik değişiklikleri tanımlamıştır. Bu çalışmalarda, genellikle hassas bir beyin bölgesi ile sınırlı olan beyin homojenatındaki kontroller ile AH arasındaki protein ekspresyonunu karşılaştırmak için proteomik kullanılır. LC-MS/MS yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda, AH ve kontrol beyinleri arasındaki protein farklılıkları hakkında ön bulgular elde etmesine rağmen tipik olarak küçük numune

boyutlarıyla çalışıldığından çoklu karşılaştırmalar için düzeltme yaptıktan sonra protein farklılıklarını saptamak için uğraş verilmiştir (85, 86). Daha yakın tarihli çalışmalar daha büyük örneklem grubu ile çalışıldığından Alzheimer hastalığında yüzlerce protein farklılığını saptamak için yeterli güce sahiptir (87, 88). Çalışmalara ışık tutacak şekilde bu son çalışmaların meta-analizi, AH beyinlerinde önemli ölçüde değiştirilmiş proteinlerin çoğunun tutarlı olduğunu ve bu değiştirilmiş proteinlerin AH' nin patogenezi ile ilgili olabileceği yönünde sağlam kanıtlar elde edildiğine dair görüşler çoğalmıştır (89).

Protein-protein etkileşimleri (PPI) hücrenin kontrolü, iletişimi, metaboliksel gelişimi gibi birçok biyolojik süreci göstermeye yarayan bir yöntemdir (90). PPI'lar zincirler arasındaki kovalent olmayan bağlar sonucu etkileşim meydana getirir (91). Yapısal ve işlevsel özelliklerine göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir. PPI çalışmaları, proteinlerin hücre içindeki işlevlerini öğrenmek adına kritik öneme sahiptir. Buradaki etkileşim daha öncesinde tanımlanmamış bir proteinin önceden fonksiyonu tespit edilmiş bir proteinle olabilecek etkileşimin varlığı üzerinden tahmin olasılığına bağlı bir mantıkla kurulmuştur. STRING Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins -etkileşen genlerin/proteinlerin alınması için arama aracı) veritabanı kullanıcılarına sunduğu basit ara-yüz ve veri görselleştirmesi açısından başarılı grafikler sunması bakımından protein-protein etkileşim tabanlı analizlerde sistem biyoloji bilimine büyük katkıda bulunmaktadır.

PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships -Evrimsel ilişkiler ile protein analizi) veri tabanı biyolojik veya fizyolojik aktivitelerindeki protein sınıflamada rol oynarken STRING web tabanlı veri aracı ise protein-protein etkileşimlerini analiz etmede fayda sağlamaktadır.

5. MATERYAL VE METOT

5.1. Malzeme Listesi ve Gereçler

Tablo 5. 1. Malzeme Listesi

	Ürün Kodu/Model	Marka
Fenol Kırmızısı	A3616-5G	Biomatik
At serumu	H1270-500ML	Sigma
Hibernate-A	A1247501	Gibco
L-15 1X (Leibovitz)	323-050-CL	MuLticell
Neurobasal-A Medium 1X	10888-022	Gibco
Antibiyotik	450-115-EL	Multicell
Glutamax	35050-061	Gibco
B27 (50X)	17504-044	Gibco
Papain	P4762	Sigma
DNAze	A2442	Biomatik
Fetal Bovin Serum (FBS)	10500-064	Bibco
L-glutamik asit	49449	Sigma-Aldrich
Poly-L-lysine	P6282	Sigma
High Select™ Top 14 Abundant Protein depletion	A36369, A36370	Thermo Fisher
FASP™ Protein Digestion Kit	44250	expedeon
UPX™ Universal Protein Extraction Kit	44101	expedeon
Qubit 2.0 Assay kit		Thermo Fisher Scientific

Tablo 5. 2. Deneylerde Kullanılan Gereçler

Gereçler	Ürün Kodu/Model	Marka
Saf Su Cihazı	Direct-Q™ 8	Millipore
Kültür kabı (35 mm) cam tabanlı	704004	Nest
Kültür kabı (150 mm)	168381	Thermo
Santrifüj tüpü (50 ml)	602002	Nest
Santrifüj tüpü (15 ml)	601002	Nest

Mikrosantrifüj tüpü (2 ml)	620011	Nest
Çalkalamalı Etüv	MAXQ 6000	Thermo Scientific
Santrifüj	SL 16R	Thermo Scientific
Vorteks	VB00001357	DragonLAB
Hassas Terazi	EX124	Ohaus
İnkübatör	Forma Steri-Cycle	ThermoFisher
Sonikatör	AM120DT	Amtech
Stereo mikroskop	StereoV8	Zeiss
Floresan mikroskop	CKX41	Olympus
Laminar akımlı kabin	Safe 2020	Thermo Scientific
Klonlama Halkası	C7983	Sigma
SYNAPT2-Si		Waters
ACQUITY UPLC	M-Class	Waters

Tablo 5. 3.Kalsiyum Görüntüleme ve Kayıt için Kullanılan Gereç ve Yazılım Paketleri

	Model	Marka
Floresan mikroskop/ kamera	CKX41 ve DP72	Olympus
Matlab	Sürüm 2018b	Mathworks
Fiji	Image-j	
Matlab	Ezcalcium Toolbox	Mathworks

5.2.Araştırmanın Yapıldığı Yer

Çalışmamızın kan numune örneklerinin alınması iki farklı merkezde gerçekleşmiştir. Alzheimer hastalarından periferik kan numune örnekleri gerekli izinler alınarak İstanbul'da özel yaşlı bakım merkezinden sağlanmıştır. Sağlıklı yaşlı kontrollerden alınacak kan numune örnekleri de bir eğitim ve araştırma Hastanesinde gerçekleşmiştir. Merkez tarafından istenen etik kurul belgesi mevcuttur. Çalışmanın gerekli etik kurul izinleri İstanbul Medipol üniversitesi girişimsel olmayan etik kurul tarafından alınmıştır.

5.2.1 Deney hayvanları

Çalışmamızda deney hayvanlarının temininde gerekli izinlerin sağlanması adına İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu (İMÜ-HADYEK)'na başvurularak gerekli onaylar alınmıştır. Deneylelerde, toplamda 20 adet yenidoğan, postnatal (P1-P2), BALB/c ırkı fareler kullanılmıştır. Isı, yem ve diğer her türlü bakım gibi koşulların kontrol altına alınması, yenidoğan üretim ve takibi, İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi (MEDİTAM) tarafından gerçekleştirildi. Çalışmanın kalsiyum görüntüleme deneyleleri İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık bilim ve teknolojileri araştırma Enstitüsü (SABİTA) laboratuvarında, *in vitro* deneyleleri bu merkeze bağlı hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

5.3 Katılımcı ve Dahil Edilme Kriterleri

Bu çalışmaya klinik değerlendirme ile Alzheimer tanısı almış 5 hasta ve cinsiyet, eğitim gibi demografik bilgilerin uyumlu olduğu 5 sağlıklı yaşlı kontrol dahil edilmiştir. AH ve Kontrol grubunun periferik venöz kan örnekleri 10 ml heparinli tüpler ile hemşireler tarafından sabah ve akşam olacak şekilde farklı iki zaman diliminde alınmıştır. Çalışma boyunca kullanılacak olan uyku öncesi ve sonrası kan numune örnek terimlerinde, numunenin alınma prensibinin nasıl olduğunun belirtilmesi çalışmanın bulgularını anlaşılması açısından yardımcı olacaktır. İlk olarak; (i) Sabah alınan kan numune örneklerinde, katılımcıların kendiliğinden uyanması beklenecek, kan numune örneği uyanır uyanmaz alması sağlanırken (uykudan sonra), (ii) akşam alınan kan numune örneklerinde de katılımcıların uyumadan hemen önce periferik venöz kan örneklerinin alımı hemşireler tarafından gerçekleştirildi (uykudan önce).

Alzheimer hastalarının dahil edilme kriterlerinde, DSM-V (36) ve NINCDS-ADRDA (34, 35) tanı ölçütlerine başvurulmuştur. Bu doğrultuda merkezde var olan hasta anamnezleri uzman nörolog ve nöropsikologlar tarafından incelenmiş olup çalışmamıza kolinerjik monoterapi ya da memantin ile kolinerjik tedavi uygulanan hasta grubu içerisinde yer alan hastaların dahil edilmesi sağlandı. Ayrıca hastalara Demans evrelemesi için yine uzman nörolog ve nöropsikologlar tarafından klinik

demans derecelendirme ölçeği (CDR) (92) ve global bilişsel değerlendirmenin sağlanması adına da Standardize Mini Mental Test (SMMT) (93) uygulanmıştır. Sağlıklı yaşlı grupta da bilişsel değerlendirmeleri uzman nörolog ve nöropsikologlar tarafından yapıldı ve global bilişsel yetilerinin değerlendirilmesinde SMMT' ye başvuruldu. Sağlıklı yaşlı kontroller herhangi bir merkezi sinir sistemine bağlı travma, inme ve/veya buna benzer sağlık problemleri ile başvurmayan, fizik tedavi ve rehabilitasyon bölümünde yataklı birimde kalan kişiler arasından seçildi. Uyku öncesi ve sonrası kan numune örneklerinin tüm katılımcılarda aynı şartlarda sağlamak amacıyla yataklı bir birimde olmasına dikkat edilmiştir. Hem hasta hem de kontrol gruplarında bilgilendirilmiş onam formları (EK-1) kendileri veya varsa vasisi tarafından imzalanmış olanlar çalışmaya dahil edilmiştir.

5.4 Kan Örneği Tüpünün Belirlenmesi

Primer hipokampus deneylerinde, çalışmanın sonucunu olumsuz yönde etkileyeceği düşünülen olası her bir etkenin kontrol altında alınarak optimize edildi. Bunları ele aldığımızda deney protokolümüzde kan tüpünün belirlenmesi de önemli bir yer almaktadır. Bu sebeple EDTA, Sitrata ve Heparin olmak üzere antikoagülanlı (kanın pıhtılaşmasını önleyen) tüplerle, kan örneği tüpünün belirlenmesi açısından deneyler yapılmıştır. Kan numunelerinden elde edilen plazma örneği her bir tüp için kültür ortamında deneylere tabi tutuldu. Bu doğrultuda in vitro koşullarda primer hipokampus kültürü yapılarak antikoagülanlı 3 farklı tüpten alınan plazma, nöronlara %10 eklenerek incelendi. Belirlenen antikoagülanlı tüpler için aynı zaman diliminde deneyler gerçekleştirildi. Sitrata ile ilgili yapılan kültürlerde 5 gün sonrasında nöron kayıpları görüldü. EDTA' nın sitrata göre görece daha az nöron kaybının varlığı izlenmiş fakat ilerleyen günlerde nöronların takibinde akson uzamalarının gerçekleşmediği gözlemlendi. Hem heparinli tüplerde yapılan hem de ayrıca vasatına da heparinli plazma eklenmiş deneylerin diğer iki tüpten elde edilen plazma deneylerinden daha iyi sonuçlar elde edildiği sonucu diğerlerine oranla nöron sağ kalımlarının da diğerlerine göre nispeten daha iyi olduğu izlenmiştir. Bu sonuçlar ile deney protokolümüzde kan numune örneklerinin alınması antikoagülanlı heparin tüpü ile gerçekleşmiştir.

5.4.1 Kan örneklerinin temini ve transferi

Hem hasta grubunun hem de kontrol grubunun kan örnek alım süreci alım zamanları ve transfer edilme süreçleri bakımından aynı koşullar altında gerçekleşti. Gerekli izinlerin alındığı birimlerden katılımcıların periferik venöz kanları uykudan önce (akşam) ve uykudan sonra (sabah) olacak şekilde iki ayrı zaman diliminde hemşire yardımıyla alınmıştır. Kanın alınma zamanı, ad soyad bilgileri kaydedildi. Bu örneklerin transferi uygun ısı (soğuk zincir) ve taşıma kurallarına uyularak gerçekleşmiştir. Tüm katılımcılardan alınan örneklerin zaman, hız ve merkeze temini gibi unsurların deneylerde olası herhangi bir karıştırıcı etken riskine karşın olabildiğince aynı koşullar altında olması sağlandı. Örnekler sabah ve akşam olacak şekilde motor kurye aracılığı ile SABİTA merkezine getirildi.

5.4.2. Kan örneklerinden plazma elde edilişi ve saklanma koşulları

Plazma deneylerinde karşılaşılan sorunların çözümünde santrifüj ile optimizasyon süreci gerçekleşti. Deneylerin başlarında aldığımız örnekler 3500 RPM'de 15 dakika santrifüj ediliyordu. Daha sonra tüplerdeki plazmanın çözdürülme işlemi esnasında plazmanın pipetlemesine engel teşkil eden pıhtıya rastlanıldı. Tam kanın plazma bileşenlerinin iki defa santrifüje edilmesi ve pipetlemenin plazmanın uygun tekniklerle yapılması ile plazmadaki bu sorun ortadan kaldırıldı.

Merkezimize getirilen örneklerde katılımcılardan alınan kan örneklerinde hemoliz saptanmış tüm kan numuneleri deney grubuna dahil edilmemiştir.

SABİTA merkezinde, hücre kültürü labında, santrifüj işlemi uyku öncesi/sonrası tüm kan örnekleri için 2 defa olacak şekilde gerçekleşmiştir. Heparinli tüpte alınan tam kanın ilk etapta soğutmalı santrifüj cihazında 1500 x g' de 15 dakika santrifüj edildikten sonra laminar akım kabininde, üstte kalan plazma pipet yardımıyla tüpe aktarıldı. İçerisinde olası kan pulcuklarından (platelet) kurtulmak üzere 0.22 mikrometre (μm) filtre (Millex Gp filter unit milipore) kullanılmıştır.

Bu esnada tüpte eritrosit ve plazma katmanı arasında kalan kan pulcuklarından zengin ince sarı katmanlı kısmın alınmamasına dikkat edildi. Aynı santrifüj işlemi tüpe aktarılan plazma için tekrarlandı. Son işlemde de dipte kalan platelet katmanının

alınmasını önlemek adına plazmanın bir miktarı tüpte bırakıldı. Ayrılan plazmaların çoğu 75 µl (deney için hesaplanan miktar) olacak şekilde alikotlanarak (bölünme) 80 °C derin dondurucuda deney zamanına kadar muhafaza edildi. Kanın hangi zaman diliminde alındığı bilgisi (uyku öncesi/sonrası), kan sahibinin ad soyadı, alınma tarihi kontrol veya hasta kanı olması gibi bilgiler etiket bilgisi adı altında tüp üzerine kaydı tutuldu.

5.5. Plazma Oranı ve İnkübasyon Süre Optimizasyonu

Plazma oranının ve deney aşamasında nöronların plazmaya maruz bırakılma sürelerinin belirlenmesi için deneyler yapılmıştır. İlk olarak primer hipokampus deneylerinde %1, %5 ve %10 plazma oranları ayrı ayrı denenmiştir. Bunlarla beraber inkübasyon süreleri ile ilgili de deneyler yapılmıştır. 1, 3 ve 6 saat inkübasyon süreleri ile deneyler gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda %1 ilave edilen hücrelerde etki görünmezken, %10 plazmaya maruz kalma halinde yüksek ölçüde nöron ölümüne rastlanıldı. Sonuç olarak nöronların ölü-canlılık testleri de değerlendirilerek %5 oranında plazma kullanımı ve 1 saatlik inkübasyon süresi belirlenerek deneyler gerçekleştirilmiştir.

5.6. Rekombinant Adeno-Asosiye Virüs (rAAV) Üretme

Rekombinant Adeno-Asosiye Virüs (rAAV) üretme süreçleri İstanbul Medipol Üniversitesi SABİTA merkezinde gerçekleştirilmiştir. Kalsiyum görüntülemesinde kullanılmak üzere plazmitin hücre içerisine aktarılması hücrelerin GCaMP ifade etmesi için gereklidir. Bunun için nöron üzerinde etkinliği olan ve sadece nöronlara enfekte olan AAV kullanılmak üzere üretildi. Virüsün hazırlanma protokolünün ayrıntıları ilgili referansta ayrıca verilmiştir (94).

1. Virüsün üretilmesinde ilk aşama olarak kompetent hücrelerin hazırlama işlemi gelmektedir. Bu aşamada bölünen hücreler sıvı nitrojen ile dondurulduktan sonra muhafazası için -80 dereceye kaldırıldı.
2. Transformasyon işleminde GCaMP6s plazmiti (Addgene-pAAV. Syn. GCaMP6s. WPRE.SV40) ve hazırlanan kompetent hücre eklenerek buzda bekletildi. Bir dizi işlem sonrasında, hazırlanan tüp içerisindeki bakteriler agarlı kültür kaplarına alınarak inkübatörde 1 gece bekletildi.

3. Plazmitin çoğaltılması ve izole etme aşaması gerçekleştirildi.
4. 293AAV hücre kültürü gerçekleştirilerek kültür kaplarına ekim gerçekleştirildi.
5. Plazmitin 293 AAV hücrelerine transfeksiyonları sağlandı.
6. Transfeksiyon sonrası virüs izolasyonu ve pürifikasyon (safılaştırma) işlemi gerçekleştirildi. En son ki süreçte üst sıvıdaki virüsleri diğer hücre kalıntılarından izole etmek için kontrast madde olan Iodixanol gradienti hazırlandı. Bu madde de %7, %25, %40 ve %60'lık yoğunluklarda hazırlandı. Ultrasantrifüj tüpüne çok yavaş bir şekilde bu solüsyonlar eklendi (Resim. 5.1). Tüpün en üstüne pürifiye edilecek virüsler eklendi. Birtakım işlemler sonrasında virüs filtreli kolonlara aktarılarak santrifüj edildi. Son olarak virüs solüsyonları 2'şer µl şeklinde tüplere alikotlanarak -80°C'de deney gününe kadar saklandı.



En altta %60 ve en üstte %17'lik Iodixonal tabaka (sırasıyla %60, %40, %25 ve %17) ve virüslü solüsyon

Resim 5. 1. Iodixonal Gradient Tabakaları.

5.7. Primer Hipokampus Nöron Kültür Protokolü

Çalışmada, *in vitro* koşullarda hücre kültürü yöntemleri kullanılarak primer hipokampus nöron kültürü yapılmıştır. Deneylerde postnatal 1-2 günlük (P1-P2) yenidoğan BALB/c ırkı fareler kullanılmıştır.

İşlemler sırasıyla;

1. Kültür kabı hazırlama
2. Vasat/Besiyer Hazırlama
 - a. Diseksiyon Vasatı
 - b. Kültür Vasatı
 - c. Ekim Vasatı
3. Kültür Aşamaları

5.7.1. Kültür kabı hazırlama

İlk olarak nöronların yapışmasını ve nöronal olgunlaşmada sağlıklı ortam oluşturmak için 35 mm çapında cam tabanlı kültür kapları kullanıldı ve tabanların ortaları ateşlendi. Bu aşamada distile su (ddH₂O) ve Poly-L-Lysine 750 µl için %10 olacak şekilde (675 µl ddH₂O + 75 µl Poly-L-Lysine) eklenip kültür kabına yayılması sağlandıktan sonra 2 saat oda sıcaklığında inkübatörde bekletildi. Daha sonrasında 3 kere ddH₂O ile yıkanarak kurumaya bırakıldı.

5.7.2. Kültürde kullanılacak vasat/ besiyerlerin hazırlanması

5.7.2.1. Diseksiyon vasatı

Bu aşamada Hibernate-A (5 ml) kullanılmış olup besiyerlerine %1 Glutamax ve %1 Antibiyotik eklendi. Bu işlem yapılınca kadar +4 °C' de muhafaza edildi.

5.7.2.2. Kültür vasatı

Kültür vasatı için 6mL, L-15 kullanıldı. Besiyerlerine %1 glutamax, %1 antibiyotik ve %2 B-27 eklendi (+4 °C'de işlem yapılınca kadar bekletildi). Tüm bu aşama sonunda L-15'in 990 µl'si 2 µl' lik tüpe alındı, bu içerik daha sonra

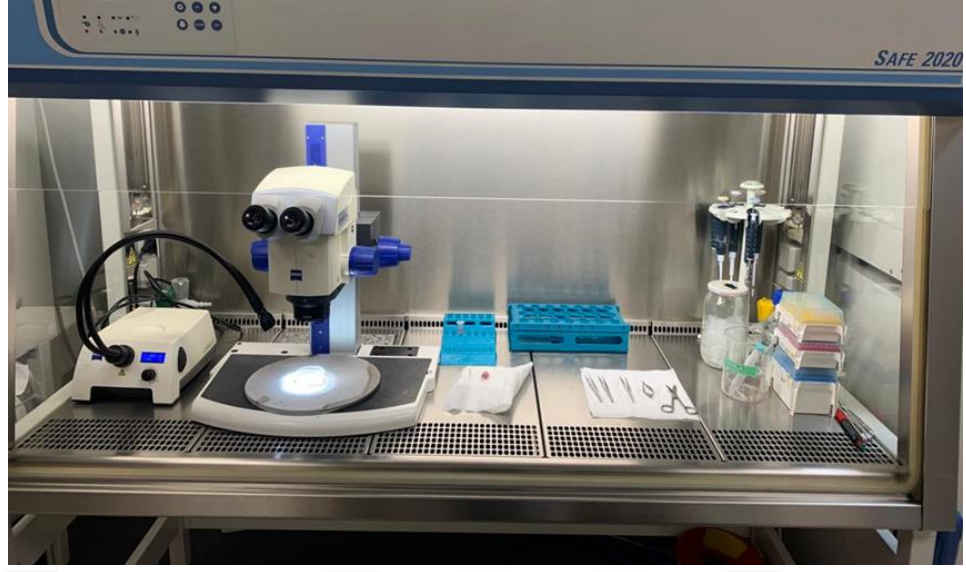
enzimatik işlemler için kullanıldı. Kültür vasatının geri kalanına %10 fetal bovine serum (FBS) eklendi.

5.7.2.3. Ekim vasatı

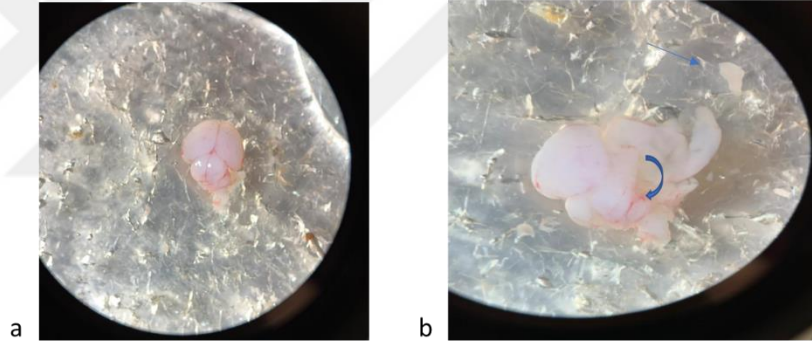
Ekim vasatı hazırlanmasında, 9 ml neurobasal-A (NBA) 15 mL'lik tüpe alınarak vasatına %1 glutamax, %1 antibiyotik, %2 B-27 ve son olarak hücre büyüme faktörü olarak %10 at serumu ilave edilerek kullanılacağı esnaya kadar NBA, +37 °C'de tüpün kapağı yarım açık şekilde inkübatöre kaldırıldı.

5.7.3 Kültür aşamaları

Yenidoğan BALB/c fareler steril, biyolojik güvenli laminar akım kabine alınıp (Resim 5.2) 70% EtOH ile yıkanarak kontaminasyon riskinin önlenmesi sağlandı. Fareler dekapite edildikten sonra hipokampus kültürüne özel steril mikro cerrahi setleri kullanılarak kafatasları açılmıştır. Yenidoğan beyni silikon tabanlı diseksiyon kabı içerisine alındı (Resim 5.3,a). İçerisine, önceden +4 °C'de muhafaza ettiğimiz HBA medyumunu eklendi. Stereo mikroskop altında soğuk çelik plaka üzerinde temporal lobların medialinde yer alan her iki hemisferdeki hipokampus dokuları çıkarıldı (Resim 5.3,b). Daha sonra, kültür vasatından ayırmış olduğumuz 990 µl L-15 tüpün içerisine enzimatik parçalanma için 10 µL papain enzimi eklendi. Bu işlemde tüp, 45 dakika boyunca +4 °C'de ajitatörde bekletildi. Buradan alınan tüp içerisindeki doku karışımına hücrelerin yapışmasını önlemek için 10 µL DNaz eklendi. Mekanik ayrışmanın gerçekleşmesi için pastör pipetlerinin uçları hafif, orta ve yoğun olacak şekilde ateşlenerek üç farklı genişlik elde edildi ve tritürasyon yapıldı. Homojen süspansiyon halini aldıktan sonra daha önce hazırlanmış olan kültür vasatının (5 ml L-15 +%10 FBS) bulunduğu tüpe aktarıldı. Bu içerikte 15 dakika işleme alınana kadar +4 °C'de muhafaza edildi.



Resim 5. 2. Diseksiyon Aşaması için Hazırlanmış Laminar Akımlı Kabin

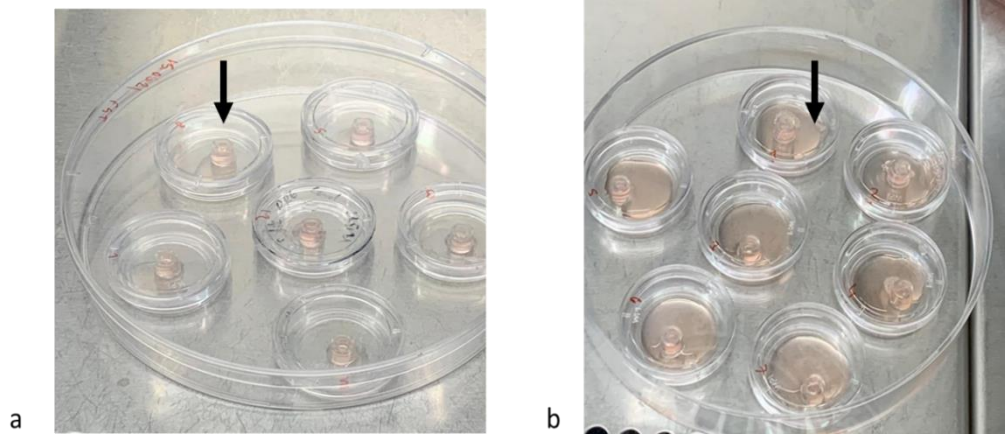


Resim 5. 3. a) BALB/ c Yenidoğan Disekte Edilmiş Beyin, b) Disekte Edilmiş Hipokampus

5.7.3.1 Klo-nlama halkaları kullanılarak hücre ekimi

BALB/c ırkı yenidoğan farelerde primer hipokampus kültürü yapıldı. Cam tabanlı kültür kabı üzerine ekilen hücrelerin bir arada olması ve belirlenen bölgede yoğun bir ağ oluşturmasını sağlamak adına klonlama halkaları kullanılmıştır (Resim 5.4., a).

Hücre ekiminden önceki aşamada 15 dakika +4 °C’de muhafaza ettiğimiz tüp alınıp, 1000 RPM hızında 5 dakika ve +4 °C’ ye soğutulmuş santrifüjde hücreler dibe çöktürüldü ve çöken hücrelerin dökeltisi (süpernatantı) atıldı. Bu tez için kültür protokolünde 6 adet cam tabanlı kültür kabına göre hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. Buna göre her bir klonlama halkası için ekim besiyerinin belirlenmesinde Tripan mavisi ile canlı hücre incelemesi ve hücre sayımı gerçekleştirilmiştir (95). Buna göre 45 µl tripan mavisi solüsyonuna + süspanse haldeki 5 µl hücrelerden eklenip al-ver tekniği ile homojenize edilmiştir. Hazırlanan 1:10 oranında dilüe edilen bu homojen karışımı 10 µl’si Neubauer lamı Hemositometresi’ne yüklenmiştir. Hücre sayımlarını gerçekleştirmek üzere ışık mikroskobu altında 10X büyütmede ölü hücreler mavi, canlı hücreler parlak beyaz görünecek şekilde bu yöntem kullanılmıştır. Hemositometre ile hücre sayımı ve hesaplama formülüne göre; her bir karedeki parlak hücre sayısı; Parlak hücre sayımı/4 * Dilüe etme faktörü (10)*10⁴ = Hücre sayımı/ml. Bu formüle göre 7x10⁴-10x10⁴ arasında nöron ekimini gerçekleştirildi (burada 1 mililitredeki süspanse edilmiş hücre sayısına göre hesap edildi). Bunun sonucunda yeterli nöron eldesi sağlanarak çöken hücrelerin üzerine inkübatörden alınan ekim vasatı her bir cam tabanlı kültür kabında 140’ar µl olacak şekilde toplamda 840 µl NBA eklenerek resüspanse edildi (Resim 5.4.,b). Klonlama halkalı cam tabanlı kültür kapları 2 saat boyunca 37°C de, %5 CO₂ ortamında inkübe edildi. Vasat tamamlamadan önce ortalama 2 saatin sonunda mikroskop altında ekilen hücrelerin akson uzantıları takip edildi.



Resim 5. 4.a) Cam Kültür Kabının Ortasına Klonlama Halkası İçerisine Hücre Ekimi, **b)** Ekim Vasatı Tamamlanmış Kültür Kabı

5.7.3.2. Vasat tamamlama

Vasat tamamlama işlemi 2 saat inkübasyon sonunda kültür kabı başına 1500 µl NBA olacak şekilde klonlama halkasının etrafına dikkatli bir şekilde besiyerinin ilave edilmesi ile tamamlandı. Bu aşama sonrasında ekim vasatı tamamlandıktan sonra (resim 5.6.3.1.1 b) klonlama halkaları kültür kabı içerisinde alınarak 37°C’ de, %5 CO₂ ortamında inkübatöre taşındı.

5.7.3.3. Vasat değişimi

Hücrelerin vasat değişimleri deney gününe kadar steril ve aynı koşullar altında taze olarak hazırlandı. Laboratuvar ortamında aralıklı olarak gün takipleri sağlandı [(Days *in vitro* (Div)]. NBA vasatına %1 glutamax, %1 antibiyotik ve %2 B-27 eklendi. Sunulan tezin deneylerinde, hücrelerin tutunması ve gelişimi için gereken sürenin deneyin 5. günü olarak gözlemlenerek ilk vasat değişim gününe karar verildi. Bunu takiben 3 ve 4 günde bir kültür kabı içerisindeki vasattan 500 µl vasat çekilerek yerine 600 µl taze hazırlanmış NBA eklenmesiyle vasat değişimleri gerçekleşti. Bazı durumlarda vasatın pH değerine göre ihtiyaç dahilinde değişim oranı miktarı artırıldı. Deney günün yapılacağı zamana kadar hipokampal nöron kültürleri, nöronların olgunlaşma sürecinin sağlanması için 37°C de, %5 CO₂ ortamında inkübe edildi.

Vasat değişimlerinin deney gününe kadar gün takipleri aşağıda gösterilmiştir. Hipokampal nöron kültür deneyleri ile kalsiyum görüntüleme deneyleri kültürün 24.-28.günlere arasında yapılmıştır. Deney gününe denk gelen vasat değişimleri deneyde karıştırıcı unsur olmaması adına yapılmamıştır.



5.8. Virüsün Eklenmesi

Tüm deneylerde kültürün 4.gününde AAV GcAMP virüs verildi. Kültür kabının ortasına ekilmiş hücrelere denk gelecek şekilde her petri için 1 µl virüs verilme işlemi gerçekleşti.

5.9. Hipokampus Kültüründe Faz kontrast Mikroskop Görüntülerinin Alınması

Kültür gününden itibaren ilk gün ve daha sonraki günlerdeki vasat değişimlerini baz alarak faz kontrast mikroskopta 20x ve 40x de görüntüleri alındı. Hücrelerin sağlıklı nöral gelişimlerini, akson uzatmalarının takibi açısından görüntüler elde edildi (resim 6.2.). Ayrıca virüs verildikten sonraki 10-11. günden itibaren hücrelerde GCaMP ifadesi görülmeye başlandı.

5.10. Glutamat Doz Belirleme Optimizasyonu

Deneylerimizde ekstra uyarıcı özellikleri ile bilinen Nikotin, Ginko A, Ginko B kullanılmış fakat deney sonucunda primer hipokampus nöron kültürlerinde istenen uyarıcı etkisine rastlanılmadığından başka bir uyarıcı nörotransmitter olan glutamat kullanılmıştır. Bu kısımda da önemli olan glutamatın doğru konsantrasyonun nöron kültürleri üzerinde belirlenme aşamasıydı (Formül-1). Glutamatın molaritesi hesaplandıktan sonra literatür taranıp glutamat deneyleri için glutamat çözeltisinin hazırlanma sürecinde hidroklorik asit (HCl asit) (96), DMSO ve daha sonrasında distile su kullanılmıştır. HCl asit ve DMSO ile yapılan deneylerde glutamat uyarıcı etkisinin görülmemesi sebebiyle deney dışı bırakıldı. Bu deneyler sonucunda L-glutamik asit (Sigma-Aldrich, 49449)'in distile su ile seyreltilerek glutamat hazırlanması işlemi gerçekleşti. Deney protokolümüzde kullanmak üzere optimizasyonun sağlanması için glutamat doz konsantrasyonunda düşük ve yüksek doz uygulaması ile bir dizi deneyler yapıldı. Düşük doz glutamat uygulamasında 10 mikromolar (μM) 20 μM , 25 μM , 30 μM , ve 50 μM , yüksek doz glutamat uygulamasında 80 μM , 100 μM , 200 μM ve 400 μM denendi.

Formül 1: Stok Konsantrasyon: 10 milimolar (mM)

Moleküler Ağırlık: 147.13

Yoğunluk: 1 Mililitre

Bu bilgilerden yola çıkarak Sonuç: 1.4713 miligram

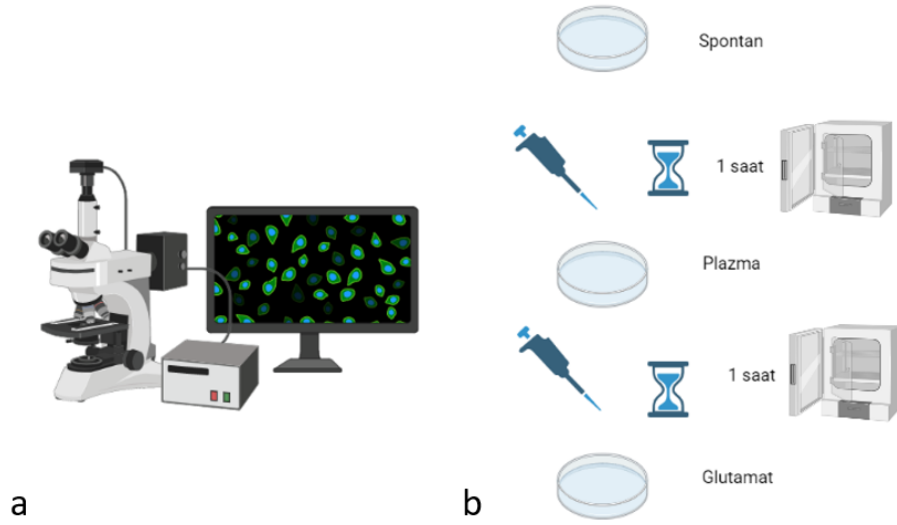
Primer nöron kültüründe nöronların farklı konsantrasyonlardaki glutamata cevaplarını izlemek için floresan mikroskop ve Spinning Disk (SD) mikroskobu kullanıldı. Sunulan bu tez floresan mikroskop ile gerçekleşti (Olympus). Primer

hipokampüs deneyleri ile çalışılan zamana kadar onlarca deneye tabi tutularak optimizasyonu sağlandı. Bu deneyler sırasıyla şu şekilde idi: Hassas terazi kullanılarak tartılan glutamat, hücrelere deney gününden 1 gün önce hazırlanmış şekilde +4 °C’ de muhafaza edildi. İlk başlarda, deney günü Promidün İyodür (PI) ile spontan çekimleri alınıp sonrasında plazma ekleyerek 1 saat inkübe ettikten sonra görüntüledi. Plazma maruziyetini takiben 1 saat sonra glutamat aktivitelerini görüntülemek adına glutamat ekleyip 1 saat inkübasyon sonrasında glutamat ile kalsiyuma bağlı aktivite görüntüleri alındı. Aynı zamanda önceden hazırlanan glutamatın pH’ın da bir değişiklik olup olmadığını takip etmek için pH indikatörü olarak bilinen 1000/1 fenol kırmızısı (phenol red) eklenerek her gün takibi sağlandı. Bu deney sonuçlarına göre glutamatın deney günü taze bir şekilde su ile seyreltilerek hazırlanılması sonucuna varıldı. Bu şekilde dilüe eden çalışmalar da mevcuttur (97). Yapılan görüntülemeler ışığında glutamat konsantrasyonunun yüksek dozda özellikle 200 µM ve 400 µM glutamat eksitotoksitesi ile nöronların kalsiyum aktivitelerinin yanıp kaldığı ya da durduğu izlenmiş ve yapılan analizlerle de bu yanıp kalmanın varlığı desteklenmiştir. Düşük doz deneylerinde de 50 µM dışında, bu aktivitenin yeterli olmadığı bulunmuştur. Deneylere daha sonrasında 50 µM doz glutamat eklenerek devam edilmiştir. Böylece, kalsiyum görüntüleme ve analizleri sonucu birçok tekrarlanan deneyler sonrasında konsantrasyon olarak 50 µM doz glutamat belirlenmiştir.

5.11. Primer Hipokampüs Nöron Kültüründe Deney Akışı

- i. İlk olarak laminar akım kabininde tüpe alınan glutamat distile su ile homojenize olana kadar vortekslendi. Tekrar kabin içerisine alınan tüp deney boyunca her bir kültür kabı için taze eklenmek üzere alikotlanıp +4 °C’ye kaldırıldı.
- ii. -80 °C’ de muhafaza edilen plazmalar su banyosunda 37°C de eritilerek çözüldü. Uyku öncesi deneyleri sırasında şartların aynı koşullarda sağlanması adına plazmaların hemen çözülmemesi için uyku sonrası tüpleri -20°C’ de bekletildi.

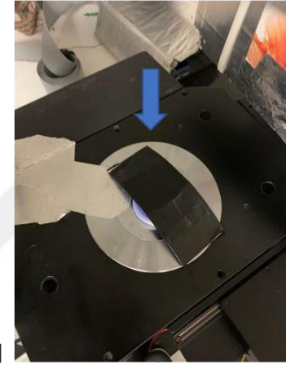
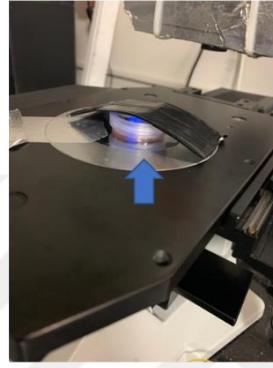
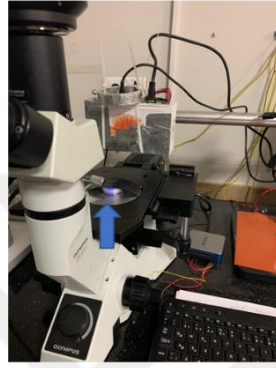
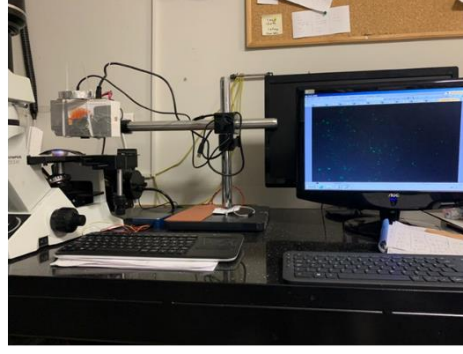
- iii. İnkübatörde olan kültür kaplarımız deneye alınmadan önce invert mikroskop altında aktiviteleri incelendi. Sağlıklı hücre ve aktiviteleri devam eden kültür kaplarıyla deney süreci başlatıldı.
- iv. Çalışmamızda uyku öncesi ve uyku sonrası plazmalar ile 3'er defa olacak şekilde spontan plazma ve glutamat görüntüleri tekrarlandı.
- v. İlk etapta inkübatörden alınan kültür kabı laminar akım kabinine alınıp etrafı parafilmleildi. Daha sonra olympus invert mikroskop altında spontan aktivitesinin art arda 3 video görüntüsü alındı (Saniye de 4 Kare, 100 sn, 3 video).
- vi. Spontan kalsiyum aktivitelerinden sonra kültür kabı laminar akım kabinine alındı.
- vii. %5 oranında belirlenen plazma, kültür kabına eklendi [Bu işlem kültür kaplarında 1500 µL medyumlu olacak şekilde baz alınarak tasarlandığından plazma oranında %5'i, 75 µL plazmaya tekabül etti].
- viii. Plazma eklenme işlemi; laminar akım kabinine alınan kültür kabından 500 µL medyum tüpe alındı. 75'i atılıp yerine 75 µL çözölen plazma eklendi. Al-ver tekniği uygulanarak pipetleme yapıldı. Daha sonra kültür kabının ortasına tekrardan 500 µL medyumunu aktarıldı.
- ix. Plazma eklenen kültür kabı 1 saat inkübe edilme işlemi tamamlandıktan sonra laminar akım kabininde parafilmleli invert mikroskop altında görüntülendi (Saniye de 4 kare, 100 sn, 3 video).
- x. Tekrar kabine alınan kültür kabı, 50 mikromolar hazırlanmış alikottan taze glutamat (+4 °C) tam ortasına gelecek şekilde 7.5 µL eklendi ve inkübatöre alındı.
- xi. 1saat sonunda glutamat eklenmiş kültür kabı kabinde parafilmleli mikroskop altında 3'er video görüntüleri alındı.
- xii. Uyku öncesinde yapılan tüm işlemler ve sıralama uyku sonrası içinde gerçekleşti (Şekil 5. 1.b.).



Şekil 5. 1. a) Floresan Mikroskop, b) Deney Akış Diyagramı

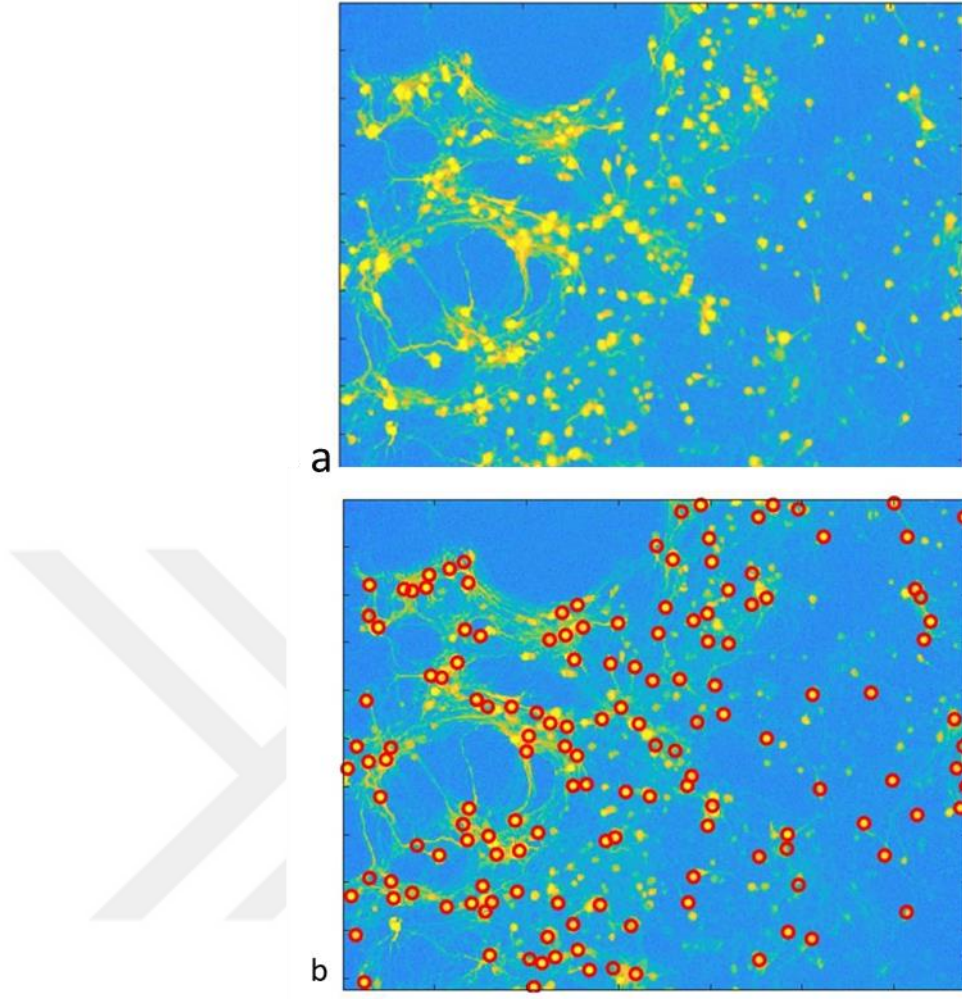
5.12. Kalsiyum Görüntülemesi, Kayıt Alma ve Analizi

Çalışmamızın deney düzeneği floresan mikroskop ona bağlı kamera ve beyin ara-yüz programı aracılığı ile oluşmaktadır (Resim 5.5). Hücre içerisindeki kalsiyum girişleri ile GCaMP proteinde oluşan olası her türlü dönüşüm gibi değişiklikler bu proteindeki zenginleştirilmiş yeşil floresan proteininin (EGFP) parlaklığının ortaya çıkmasını ve floresanın ışımaya düzeyindeki artışı sağlamaktadır. Yeşil floresan ışımının ortaya çıkması EGFP'nin 488 nm dalga boyunda mavi ışığa maruz kalındığında gerçekleşen bir durumdur. Bu sayede yeşil renkte floresan ışımaya 515 nm dalga boyunda görünür durumda olmaktadır. Hipokampal nöron kültür deneylerinin kalsiyum görüntüleme deneyleri kültürün 24.-28.günleri arasında yapılmıştır. Kalsiyum aktiviteleri de bu sistem aracılığı ile kaydedilmiştir. Bilgisayar aracılığı ile floresan mikroskop altında 10x objektifler kullanılarak saniyede 4 kare/görüntü (fps) toplam 100 saniyede fotoğraflar video şeklinde kaydedildi (400 fps, 100 s, 10 x).



Resim 5. 5. Deney Düzeneği, a) Deney Düzeneği ve Beyin Ara-Yüz Programı, b-c) Kültür Kabının Mikroskopta Yandan Görünümü, d) Üstten Görünümü

Kalsiyum görüntüleme sonrası elde edilen ham videolar Fiji-ImageJ programı ile açıldı (98). RGB (kırmızı-yeşil-mavi) görüntüsü bileşenlerine ayrıldı (Şekil 5.2.a). Daha sonra EZcalcium toolbox (99) kullanılarak videoda yer alan hücre gövdeleri ROI (Şekil 5.2.b) olarak otomatik seçildi (maksimum 150 ROI). MATLAB programıyla seçilen ROI' ler de ki ışık değışiminin ortalamaları alınarak hesaplandı.

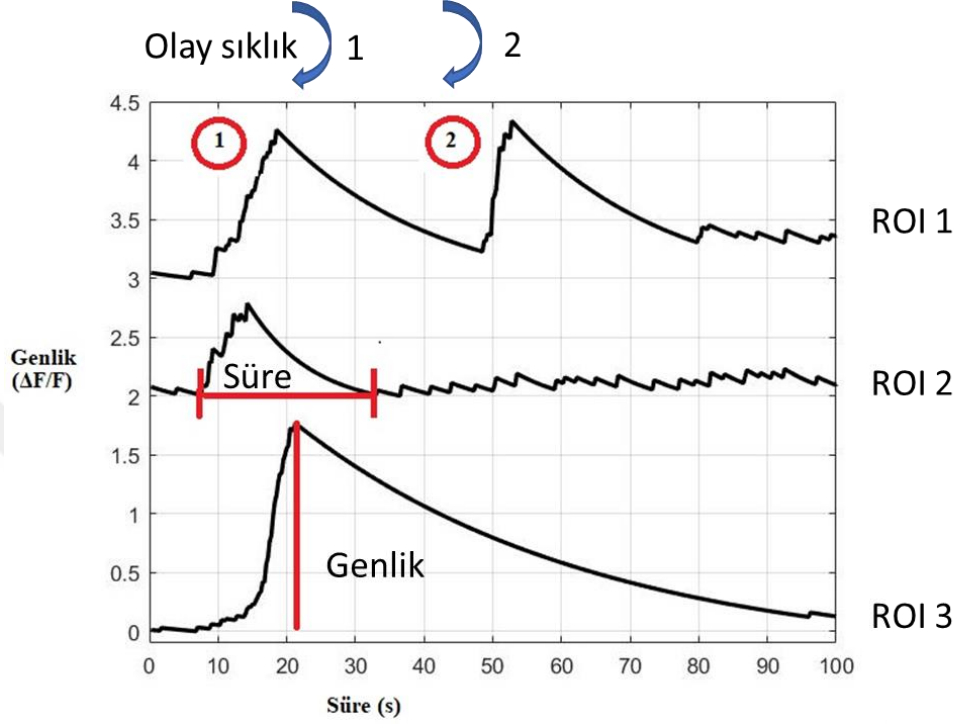


Şekil 5. 2. Hipokampal Sinir Ağının Kalsiyum Görüntüsü, a) Spontan Kalsiyum Aktivitesi (Görüntüdeki Tüm Hipokampal Nöronlar) b) Spontan Kalsiyum Aktivitesinde Yanıp Sönen Hücre Gövdelerinin ROI Olarak Seçilmesi (Etkin Hücre Sayısı)

MATLAB' de işlenen ve çözümlenen bu veriler etkin hücre sayısı, olay olma sıklığı, olay süresi ve olay genliği açısından analiz edildi. Seçilen ROI'ler de ki hücre gövdelerinde kalsiyumun geçişine bağlı ışık şiddeti değişimleri zamansal (100s) olarak çizildi (Şekil 5.3). Her bir kare içerisinde seçilen alanlarda gerçekleşen olayların sıklığı, süresi ve genliğinin kalsiyum aktiviteleri yani ışıksal değişimleri ortalamaları alınarak hesaplandı. Aşağıda verilen şekilde etkin hücre sayısı, olay olma sıklığı, olay süre ve genliği gösterilmiştir (Şekil 5.3).

- Etkin hücre sayısı, bir kültür kabında kalsiyum aktivitelerine karşılık gelen seçmiş olduğumuz maksimum 150 ROI temsil etmektedir. Etkin hücre sayısı parametresinde sadece yanıp sönen kalsiyum aktivitesi olan hücre gövdeleri seçilmiştir (Şekil 5.2.b). Bazı kültür kaplarında 150 ROI den az hücrelerde mevcuttu.
- Sunulan bu tez de olay, düzenli dalga formu oluşturan, bitiş ve başlangıcının belirgin olduğu en yüksek tepenin seçildiği kalsiyum aktivitesini gösteren dalga olarak tanımlanmaktadır. Olay olma sıklığı, frekansı, parametresinde dalga formunun başlangıç ve bitişinin belirgin ve düzenli dalga formu gösteren kalsiyum aktivitesi olan hücre gövdeleri arasından seçildi. Analiz aşamasında, kalsiyum etkinliği olan 150 ROI arasından maksimum 20 ROI, yukarıdaki kriterler göz önünde tutularak olay sıklığını analiz etmek için seçilmiştir. Aşağıdaki görsel de olay sıklığına örnek olarak ROI 1’ de kırmızı daire içerisinde ve mavi oklarla gösterilen 2 tane olay yaşanmıştır. ROI 2, 1 ve ROI 3’te de 1 olay olmak üzere toplam 3 adet hücrede (ROI) 4 olay sıklığı gösterilmiştir (Şekil 5.3). 100 saniyedeki olay sıklığı bu örnek için (olay/hücre sayısı), $4/3: 1.33$ şeklindedir. Bu örnekte, 100 saniye de 1.33 olay olmuştur. Çalışmamızın olay sıklığı bu formülle hesaplanmıştır.
- Olay genliği, ışık şiddeti değişim aralıkları kültür kaplarındaki örneklerde değişim gösterdiğinden olay genliği birim aralığında ve nispi floresan değişimi $\Delta F/F$ ile gösterilmiştir. Örneğin aşağıda, ROI 3’te kırmızı dikey çizgi ile gösterilen dalganın genliği (boyu) 1.7 civarındadır (Şekil 5.3). Toplamda 4 olay olmuştur. 4 olayın genlikleri toplanıp yine 4’e bölünerek ortalama alınma prensibi ile hesaplanmıştır. (Toplam olay genlik /olay sayısı)
- Olay süresi, toplam 100 saniyede, hücre gövdesi seçilen bir ROI’de başlangıç ve bitişinin belirgin olduğu dalganın ışık şiddeti değişimlerinin süresini temsil etmektedir. Aşağıda örnek olarak, ROI 2’de olay süresi başlangıç ve bitişleri belirgin şekilde kırmızı yatay çizgi ile gösterilmiştir. Başlangıç ve bitişleri sırasıyla 8-32 saniye aralığında olan bu örnekte olay süresi (bitiş-başlangıç) formülü ile 24 saniye şeklinde gösterilmiştir (Şekil 5.3). Aşağıda verilen örnekte toplam 4 olay olduğundan hepsinin olay süresi (bitiş – başlangıç)

hesaplanıp toplandıktan sonra olay sayısına bölünmesi ile hesaplanmıştır (Toplam olay süresi / olay sayısı).



Şekil 5. 3. Kalsiyum Etkinliğine Ait Kayıt Üzerinden Seçilmiş Hipokampal Hücre Gövdelerinin Seçildiği ROI'lerde Meydana Gelen Işık Şiddeti Değişimlerinin Frekansa, Zamana ve Genliğe Bağlı Olarak Çizilmiş Grafiği

Deney grubumuza 5 AH ve 5 kontrol olmak üzere toplam 10 kişi katılmıştır. Deney analizlerinde ise her bir örneklem için 3'er defa yapılan deneylerin kalsiyum aktivitesi belirlenen parametrelere göre hesaplanmıştır. Buna göre örneklem sayımızı havuzlayarak AH grubunda 14, kontrol grubunda da 15 olacak şekilde analize dahil edilmiştir. Havuzlama şu şekilde gerçekleşmiştir: (kişi sayısı (n) X tekrarlanan deney sayısı). Buna göre kontrol grubu için $n=5 \times 3$ spontan, 3 plazma, 3 glutamat olacak şekilde toplam n sayımız 15 olacak şekilde istatistiksel analizler gerçekleşti. Özetle, kontrol grubunun uyku öncesi alınan plazma deneyinde her bir katılımcının 3'er tane farklı kültür kabının kendiliğinden (spontan), 1 saat sonrası plazma hali ve yine 1 saat beklenen glutamat verilmiş hallerinin kalsiyum aktivite görüntüleri alınmıştır. Bu süreç uyku sonrası alınan plazma deneyleri için de gerçekleşmiştir. Alzheimer

grubunda sadece bir katılımcının uygun deney şartlarını sağlamayan bir kültür kabından alınan kalsiyum görüntüsü iptal edildiğinden n sayısı 14 olacak şekilde havuzlanmış toplam deney örüntümüzdeki veri sayımız Alzheimer ve kontrol gruplarının toplamı için 29 olarak kaydedilmiştir. Analizlerde yer alan etkin hücre sayısı, olay sıklık, genlik ve süre parametreleri Alzheimer ve kontrol gruplarının uyku önce ve sonrası alınan plazma deneylerinin hepsi için analiz edilmiştir.

5.13. Proteomiks

Plazmadan elde edilen toplam protein karışımı proteazlardan olan tripsin enzimi ile parçalanarak peptit yapısında incelenme işlemidir. Protein tanımlaması işlemi; tanımlanan peptitlerden bütün olan protein yönünde olduğu için tümevarımsal (bottom-up) proteomiks olarak tarif edilmektedir. Bu yöntem ile kısmi sekanslar üzerinden protein ifade değişikliği (tanımlama) işlemi gerçekleştirilmiştir. Sıvı kromatografi tandem kütle spektrometri (LC-MS/MS) ile analiz edilmiştir.

Kullanılan malzemeler firmadan temin edilen kit ile beraber verilen malzemelerdir. Proteomiks analizleri İstanbul Medipol Üniversitesi Proteomiks biriminde gerçekleştirilmiştir.

5.13.1. Protein izolasyonu ve filtre yardımcı örnek hazırlama(FASP) protokolü

5 Alzheimer ve 5 kontrol gruplarımızın uyku önce ve sonraları alınan plazma örnekleri toplamı 20 numuneden 10 µl plazma ile analizler gerçekleştirilmiştir. Öncelikle yüksek konsantrasyonda bulunan belirli proteinlerin (Albumin, transferrin gibi) uzaklaştırılması işlemi gerekmektedir. Bunun için High Select™ Top 14 Abundant Protein depletion mini spin column ürünü kullanılmıştır (Thermo Fisher, katalog numarası: A36369, A36370). Mini spin kolonların 2 ürünün içeriği aynı fakat birinde 6 (A36369) diğerinde 24 kolon (A36370) mevcuttur. Her kolon PBS, % 0.02 sodium azide içermekte ve pH 7.4'dir.

Kolon vidalı kapağı çıkarılır ve kolondaki reçineye 10 µl plazma eklenir. Kolon kapanır ve reçine solüsyonda tamamen homojen olana kadar kolonu birkaç kez ters çevrilir. Karışımı kolonda nazikçe uçtan uca karıştırarak oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilir. Numunenin inkübasyon esnasında reçine ile karıştığı kontrol

edilmelidir. Homojenizasyon için birkaç dakikada bir hafifçe vortekslenir. İnkübasyondan sonra alt kapağı kapatılır ve üst kapağı gevşetilir. Mini kolon 2 mL'lik bir toplama tüpüne yerleştirilir ve 2 dakika 1000 x g' de santrifüjlenir. Reçine içeren kolon atılır ve protein LoBind tüplere konulur. Bunun sonucunda albümin, IgG ve diğer bol miktarda protein çıkarılmış numunemiz hazır hale gelir. Protein izole edilen numuneler 10 mM PBS ve %0.02 sodyum azit, pH 7.4 içinde olacaktır.

Protein konsantrasyonları Qubit 2.0 (Qubit Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific-Q33212) ile ölçüldü. Hazırlama adımlarında firmanın belirttiği protokol uygulanmıştır. Protein izole edilen numunelerde çıkan bu sonuca göre aseton çöktürme tekniği uygulandı. Aseton çöktürme sırasında 14,000 x g' de +4 derecede 15 dakika santrifüj yapıldıktan sonra aseton uzaklaştırıldı. Çöktürülen proteinler UPX™ tampon (Universal protein extraction kit, Expedeon)'la çözdürüldü. Tekrardan Qubit konsantrasyon ölçümü ile proteinlerin konsantrasyon tayin işlemi sağlandı. Numuneler, 50 µg olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu aşamadan sonra FASP kiti, (Filter-aided sample preparation, FASP™ kit, 44250) filtre yardımcı örnek hazırlama tekniği kullanılarak proteinlerin tripsin ile enzimatik parçalanması liyofilize edilmesi sağlandı. Elde edilen peptitler LC-MSMS cihazında ikili karşılaştırmalar için analiz edilerek proteom profilleri incelendi. FASP, protokol uygulanma adımlarından önce üre, iyodoasetamid (IAA) ve enzimatik parçalama çözeltilerinin hazırlanma işlemleri gerçekleşti.

FASP protokolünden önce firmanın (expedon) üre çözelti örneği hazırlama protokolü uygulandı. Enzimatik parçalanma işleminden önce bu solüsyon hazırlanmalıdır. Bu kit ile gelen üre tüpüne konsantrasyonu 100mM olan 1 mL Tris hidroklorür eklendi. Çözülene kadar tüp vortekslendi.

10X iyodoasetamid çözeltisi parçalanma başlamadan taze hazırlanmalıdır. Bunun için firmanın (expedon) 10X iyodoasetamid çözelti örneği hazırlama protokolü uygulandı. FASP kitle ile sağlanan, konsantrasyonu 10X olan IAA hazırlanması için iyodoasetamid tüpünün içerisine 100 µl üre çözeltisi eklendi. (Bu çalışmada, 9.8 mg IAA olan tüp içerisine 100 µl üre) . Bunu karıştırıp çözülmesini 15 defa yukarı ve aşağı pipetleme yaparak IAA çözdürüldü.

Enzimatik parçalamadan önce çözeltinin (expedon) taze hazırlanması gerekmektedir. FASP Kit ile birlikte verilen Amonyum bikarbonat Çözeltisi içinde 1 µg tripsin çözerek 75 µL enzimatik parçalama solüsyonu hazırlandı.

FASP filtre yardımlı örnek hazırlama protokolü aşağıdaki gibidir.

- 1) 50 µg protein içeren çözeltiye 200 µl üre örnek solüsyonu ile filtre içerisinde karıştırılıp 15 dakika boyunca 14,000 x g'de santrifüj yapıldı.
- 2) Tekrar, 200 µl üre örnek solüsyonunu karışım filtresine ekleyerek 15 dakika boyunca 14,000 x g'de santrifüj yapıldı.
- 3) Bu yıkamalar sonucu filtre çıkarılarak toplama tüpündeki sıvı kısmı atıldı.
- 4) Karışım filtresine 10 µl iyodoasetamid çözeltisi ve 90 µl üre çözeltisi ekleyip 1 dakika boyunca vortekslendikten sonra karıştırma yapmadan 20 dakika boyunca karanlık ortamda inkübe edildi.
- 5) Karışım filtrelili tüp 10 dakika boyunca 14,000 x g'de santrifüj yapıldı.
- 6) Filtrelili tüpe 100 µl üre çözeltisi eklenip 15 dakika boyunca 14,000 x g'de santrifüj edildi. Bu aşama 2 defa tekrarlandı.
- 7) Toplama tüpündeki sıvı kısmı atıldı.
- 8) Karışım filtresine FASP Kiti ile birlikte verilen 100 µL amonyum bikarbonat (50 mM) çözeltisi eklenip 10 dakika boyunca 14,000 x g' de santrifüjleme yapıldı. Bu adımı iki kez tekrarlandı.
- 9) 75 µL enzim parçalama çözeltisi (tripsin enzimi) eklendi (enzim-protein oranı 1:50) ve 1 dakika boyunca vorteks yapıldı. Buharlaştırma (evaporasyon) etkilerini en aza indirmek için tüplerin üst kısımlarını parafilm ile sarıldı.
- 10) Bu karışım filtresi 37 derecede 4-18 saat aralığında inkübe edildi.
- 11) Karışım filtresi yeni toplama tüpüne aktarıldı.
- 12) 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisinden 40 µL ekleyip karışım filtresini 10 dakika boyunca 14,000 x g' de santrifüjlendi. Bu adım bir kez tekrarlandı.
- 13) FASP Kiti ile birlikte verilen 50 µL 0.5 M sodyum klorür (NaCl) çözeltisi eklenerek karışım filtresi 14,000 x g' de 10 dakika boyunca santrifüjlendi.
- 14) Parçalanmış proteinler içeren toplama tüplerindeki triptik peptidler liyofilize edildi. Liyofilizasyon sonrası örnekler 20 µl %0,1'lik formik asit

çözeltisinde çözüldü ve Qubit cihazı ile konsantrasyon tayini yapıldı. Örneklerin konsantrasyonları LC-MS/MS sistemine enjekte edilmeden önce 100 ng/ µl olacak şekilde seyreltildi.

5.13.2. Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) analizi

Yapılan enzimatik parçalama sonrası, triptik peptidler, ACQUITY UPLC-M sınıfına (Waters) yüklenerek yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi olan SYNAPT2-G2-Si (Waters) sistemleri ile birleştirilerek kullanıldı. Kantifikasyon, HDMS^E ile sağlandı. Kolonlarda %97 mobil faz A (%0,1 FA (formik asit) içeren UHPLC sınıfı su, Merck) stabilize edildi ve sıcaklığın 55°C'ye sabitlenmesi gerçekleştirilmiştir. Peptidlerin ayrılma işlemi dakikada 0,300 µl olarak ayarlanmıştır. Burada peptidler trap kolondan (Symmetry C18, 5 µm, 180 µm i.d x 20mm, Waters) analitik kolona (CSH C18, 1.7 µm, 75 µm i.d. x 250 mm, Waters) dakikada 0,300 µl akış hızıyla birlikte %4'ten %40'a gradyanla ve içeriğinde %0.1 FA (v/v) olan asetonitrilden (ACN) ayrıldı. Kütle spektrometre (MS) ve MS/MS pozitif iyon modu 0,7 saniyelik döngüyle tarandı. Çarpışma enerjilerinde düşük enerji için 10 Voltaj (V) yüksek enerji için 30V olacak şekilde ayarlandı. İyonlar, iyon hareket ayırma (ion mobility separation, IMS) ile ayrıldı. Tam IMS döngüsü boyunca dalga hızı 1000 m/s' den 55 m/s' ye artırıldı. Trap'ın serbest bırakılma zamanı 500 µs, yüksekliği 15V olarak ayarlandı. Cihazda önceden ayarlanmış iyon ön seçimi olmadan, tüm iyonlar 50-1900 m/z (kütle/yük) aralığında çözünürlük modunda parçalandı. Peptitlerin ifade değişikliği, tanımlaması ve kantife edilmek üzere bir proteomiks programı olan Progenesis-QI (P2.0.5556.29015 Nonlinear, Waters®) yazılımları kullanılmıştır (100, 101). Data parametreleri; düşük enerji eşliğinde 200 sayım, yükseltilmiş enerji eşliğinde 50 sayım olacak şekilde seçildi.

Alzheimer ve kontrol gruplarından alınan uyku önce ve sonrası kan plazma örnekleri ile yapılan LC-MS/MS analizleri sonrası protein tanımlamaları ikili karşılaştırmalar için independent samples t-test (bağımsız gruplar t testi) (p<0.05) kullanılarak yapıldı. Gruplar arası kıyaslamalar:

- Uyku öncesi Alzheimer ve kontrol: uyku öncesi alınan plazma örneklerinden elde edilen Alzheimer ve kontrol grupları arasındaki protein tanımlamaları
- Uyku sonrası Alzheimer ve kontrol: uyku sonrası alınan plazma örneklerinden elde edilen Alzheimer ve kontrol grupları arasındaki protein tanımlamaları,
- Alzheimer uyku öncesi ve sonrası: Alzheimer grubunda uyku önce ve sonrası alınan plazma örneklerinden elde edilen protein tanımlamaları
- Kontrol uyku öncesi ve sonrası: kontrol grubunda uyku önce ve sonrası alınan plazma örneklerinden elde edilen protein tanımlamaları şeklinde yapıldı.

LC-MS/MS analizleri sonucunda yukarıda belirtilen grupların ikili olası karşılaştırmalarından oluşturulan gruplar genişletilerek analiz gerçekleştirildi. Bu alt grup analizlerinde protein tanımlamalarında ortaya çıkan ikili karşılaştırmalar şu şekilde oluşturuldu:

- 1) Kontrol grubunda, uyku öncesinin uyku sonrasına göre fazla bulunan protein sayısı (ekspresyonları)
- 2) Kontrol grubunda, uyku sonrasının uyku öncesine göre fazla bulunan protein sayısı
- 3) Alzheimer grubunda, uyku öncesinin uyku sonrasına göre fazla bulunan protein sayısı
- 4) Alzheimer grubunda, uyku sonrasının uyku öncesine göre fazla bulunan protein sayısı
- 5) Kontrol grubunun Alzheimer grubuna göre uyku öncesi fazla bulunan protein sayısı
- 6) Kontrol grubunun Alzheimer grubuna göre uyku sonrası fazla bulunan protein sayısı
- 7) Alzheimer grubunun kontrol grubuna göre uyku öncesi fazla bulunan protein sayısı
- 8) Alzheimer grubunun kontrol grubuna göre uyku sonrası fazla bulunan protein sayısı

İkili grupların oluşturulmasından sonra ortaya çıkan proteinler anlamlılık değeri $p < 0.05$ ve gruplar arasında grupların ortalamalarına göre 1.4 kat değişim ve daha fazla kat değişim gösteren proteinler dikkate alındı. Tüm protein tanımlamalarında 2 ve fazlası olan özgün peptitler (unique peptid) analize dahil edildi. Bu analiz sonucu bulunan proteinlerin fonksiyonlarının biyolojik aktivitede üzerindeki rollerini öğrenmek için ileri analizlere başvuruldu. Buna göre Alzheimer ve kontrol gruplarından alınan gündüz ve gece plazma örnekleriyle elde edilen proteinlerin sınıflandırılması ve protein etkileşim analizleri PANTHER ve STRING veri araçları ile sağlandı. PANTHER’ de moleküler fonksiyonları, biyolojik süreçleri, protein sınıflamaları ve Pathway (yolak) analizleri gerçekleştirildi. STRING’ de protein-protein etkileşimlerini (PPI) gösteren görseller ve PPI fonksiyonel zenginleştirme analizi (functional enrichment analysis) p değeri elde edildi.

5.14. İstatistiksel Yöntemler

İstatistiksel analizler için karşılaştırmalar, IBM SPSS Statistics V22.0 yazılım programı kullanıldı. Veri değerleri ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi (demografik bilgilerde standart sapma verildi). Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak belirlendi. Verilerin çoğu normal dağılıma uymadıkları için parametrik olmayan testlere başvuruldu. İkili grup karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Bağımlı değişkenler de Wilcoxon sıralı işaretler testi kullanıldı. Demografik bilgilerin analizinde, ki-kare ve Mann-Whitney U testlerine başvuruldu. Sonuç grafikleri GraphPad Prism9 ve MATLAB yazılımları üzerinden gerçekleştirildi. Deney tasarımına ilişkin resimler web tabanlı araç olan BioRender tasarım programı ile yapıldı. LC-MS/MS verileri ikili karşılaştırmalar için Progenesis-QI yazılımında nicel olarak değerlendirilen independent samples t-test (bağımsız gruplar t testi) ile analiz edildi. Cihazın hata payı 1.4 kat değişimi (fold change) ve çalışma boyunca p değerleri, 0.05 anlamlı kabul edildi ($p < 0.05$ ve fold change > 1.4).

6. BULGULAR

6.1. Demografik Veriler

Çalışmamız, 5 Alzheimer (AH) tanılı hasta ve 5 sağlıklı yaşlı (kontrol) bireylerden oluşmaktadır. Demografik ve klinik bilgilerinin yer aldığı analizler verilmiştir (Tablo 6.1).

Tablo 6. 1. Alzheimer ve Kontrol Gruplarının Demografik Bilgilerinin Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

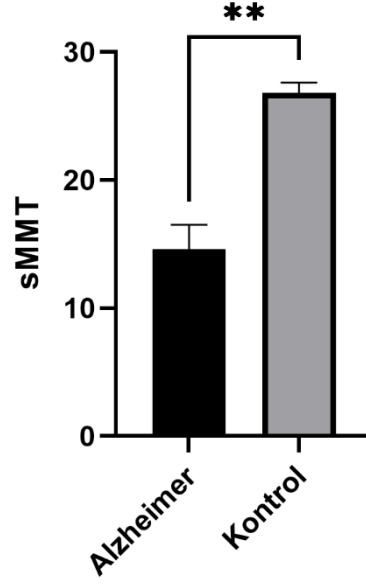
	Alzheimer	Kontrol	
	n =5	n =5	p
	Ort ±SD	Ort ±SD	
Yaş	82,30 ±4,32	74,4±5,32	,034^a
Cinsiyet (K/E)	3/2	3/2	,527 ^a
Eğitim (yıl)	7,2±5,85	6,8±6,68	,915 ^a
SMMT	14,60 ± 4,27	26,80 ± 1,79	,009^b

K: Kadın, E: Erkek, Ort: Ortalama, SD: Standart Sapma, ^a: Mann-Whitney U Test, ^b: Ki Kare Test, SMMT: Standardize Mini Mental Test, n: Kişi Sayısı.

Demografik veriler one sample Kolmogorov-Smirnov test ile analiz edilerek normal dağılım göstermediği tespit edilmiş bundan dolayı non-parametrik testler uygulanmıştır.

Alzheimer ve kontrol grupları arasında cinsiyet bakımından ki kare testi sonucunda istatistiksel anlamda bir fark saptanmamıştır ($\chi^2 = 0.40$, $df = 1$, $p > .05$). Tüm olgu grupları için eğitim bağlamında Alzheimer ve kontrol grupları arasında yapılan Mann Whitney-U testi analizinde istatistiksel anlamda fark saptanmamıştır. $U = 12$, $p = .91$. Kognitif süreçlerinin değerlendirilmesi için yapılan SMMT testinde Alzheimer ve kontrol grupları arasında yapılan Mann Whitney U testi analizinde istatistiksel anlamda fark saptanmıştır. Sıra ortalamaları AH için 3 ve kontrol grubu için 8 olarak bulunmuştur, $U = .00$, $p = .009$, $r = -.83$. Cohen (1988)' nin standartlarına göre yüksek etki büyüklüğüne sahiptir (102). Buna göre kontrol grubunun SMMT skor ortalaması Alzheimer grubuna göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (Şekil 6.1.). Alzheimer ve kontrol grupları arasında yapılan Mann-Whitney U testi analizinde yaş bakımından istatistiksel anlamda fark saptanmıştır. Sıra ortalamaları

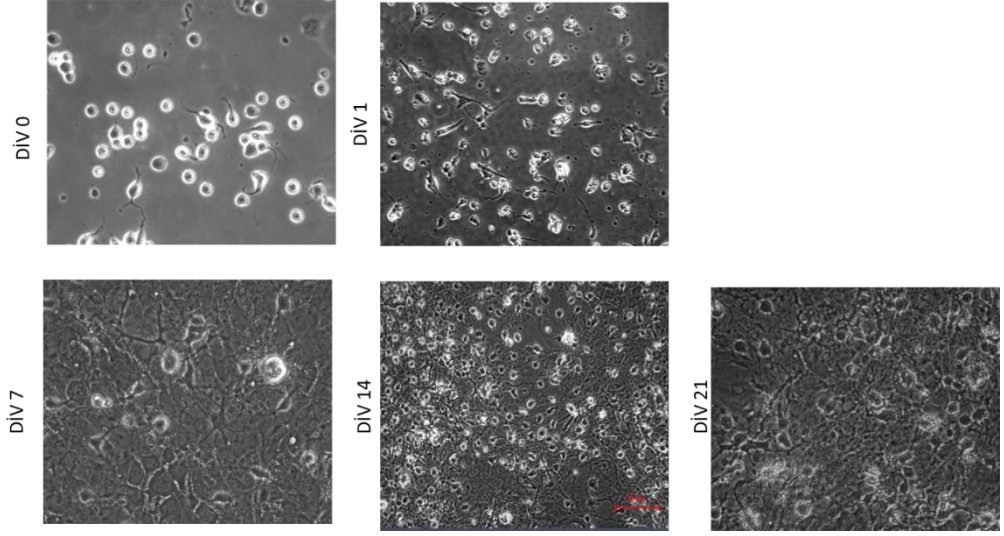
AH için 7.5 ve kontrol grubu için 3,5 olarak bulunmuştur, $U = 2,5$, $p = .034$, $r = -.67$. Cohen' nin standartlarına göre yüksek etki büyüklüğüne işaret etmektedir Alzheimer hastalarının yaş ortalaması kontrol grubuna göre nispeten fazladır.



Şekil 6. 1. Alzheimer ve Kontrol Grupları arasında sMMT Ortalama ve Anlamlılık Grafiği.

6.2. Hipokampus Kültürü

BALB/c ırkı yenidoğan (9: P2, 1: P1) farelerde primer hipokampus kültürü yapıldı. Ekimden ~ 2 saat sonrasında faz kontrast mikroskopunda nörit (uzantıların) görüntüsü izlendi. Kültürün 4. Gününde hücre medyumuna AAV GCaMP (1 μ L) eklendi. Div0'da (ekimden 1-2 saat sonra) 40x objektifiyle faz kontrast mikroskopundan alınan görüntüler gösterildi (Resim 6.1). Kültürde 1. gününde (div1) hücre morfolojileri belirginleşti (20X). Sonraki günlerden itibaren hipokampal nöronların ağ kurma faaliyetleri arttı (Resim 6.1.). Sırasıyla Div 7 için 40X, Div 14 için 20X ve Div 21 için 40x büyütmede hücre görüntüleri çekildi. Kültürün 4. gününde hücre vasatına AAV GCaMP virüsü eklenen kültürün 10-11. gününden sonra hücrelerde GCaMP aktifleştiği izlendi.

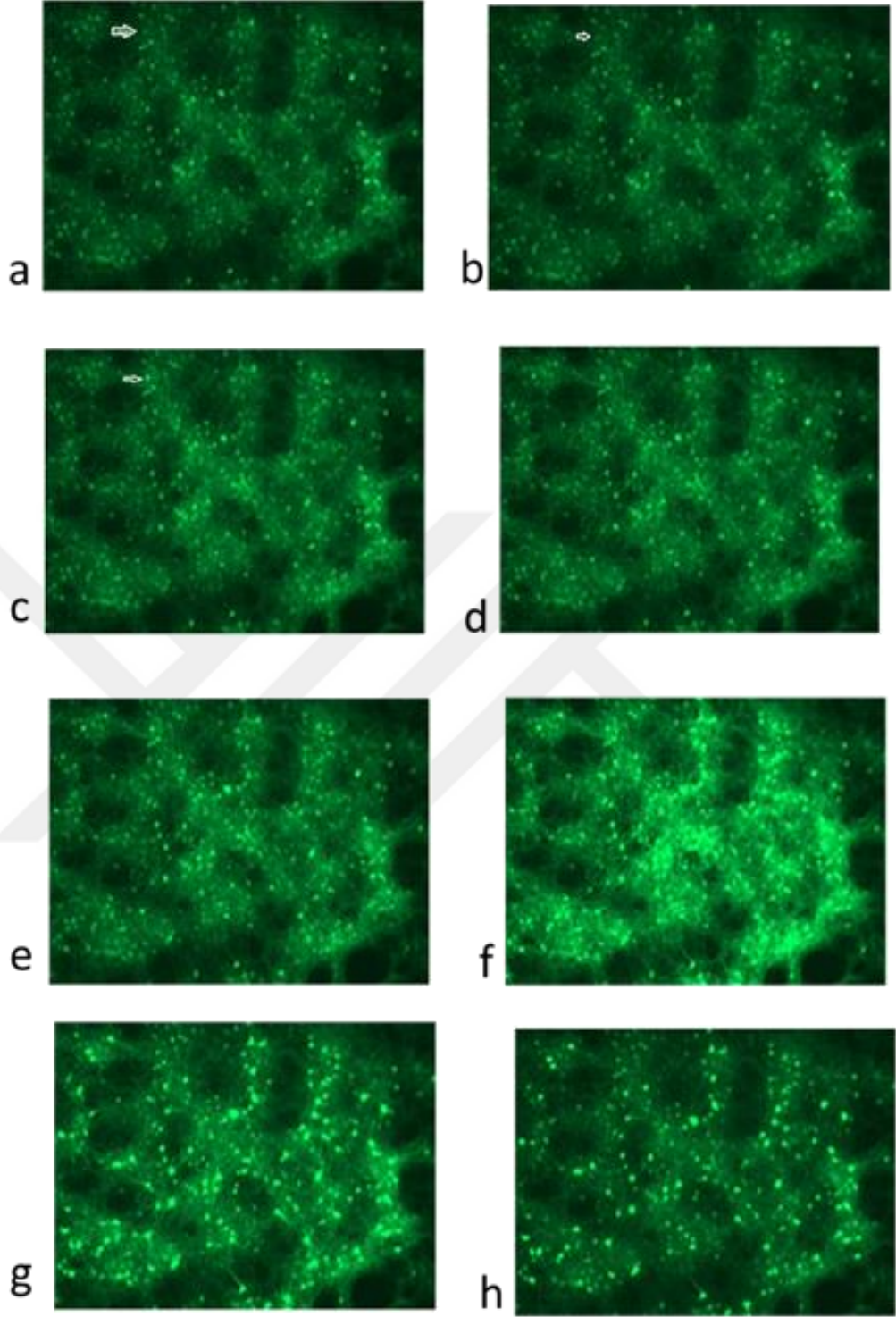


Div 14 kırmızı ile gösterilen bar (50 μ m)

Resim 6. 1. Primer Hipokampus Kültür Deneylerinin Faz kontrast Mikroskopuyla Çekilen Hücre Görüntüleri.

6.2.1. Hipokampal kültürde kalsiyum geçişinin yayılması

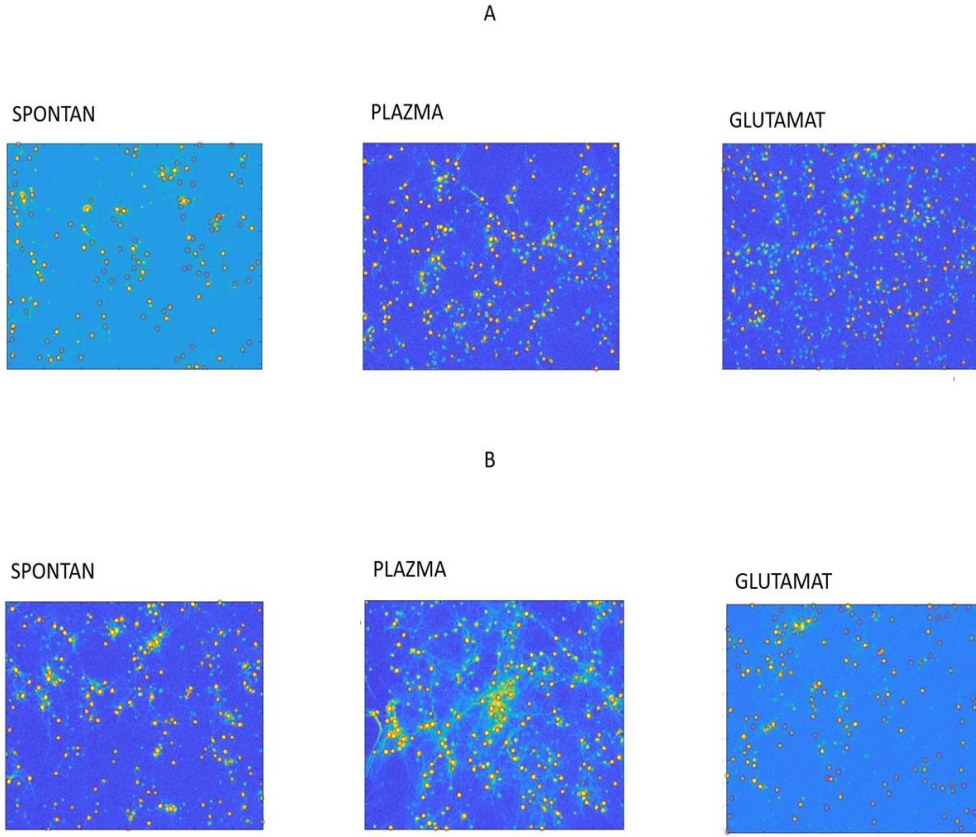
Resim 6.2.'de 26. gününde bir hipokampal nöron kültüründe kalsiyum geçişinin zaman içerisinde yayılması gösterilmiştir. a ve b'de kalsiyum başlangıcının temsili lokasyonu ok ile gösterilirken c-h arası kalsiyum etkinliğinin zamana bağlı olarak yayılmasını temsil etmektedir. f'de kalsiyumun toplu aktivitesi açıkça görülmektedir.



Resim 6. 2. Kalsiyum Geçişinin Zamana Bağlı Yayılma Gösterimi. a-b) Bir Noktadan Kalsiyum Etkinliğinin Başlangıcı (ok işareti ile gösterilen yer), c-h) Kalsiyum Geçişinin Tüm Bölgede Yaygınlığı

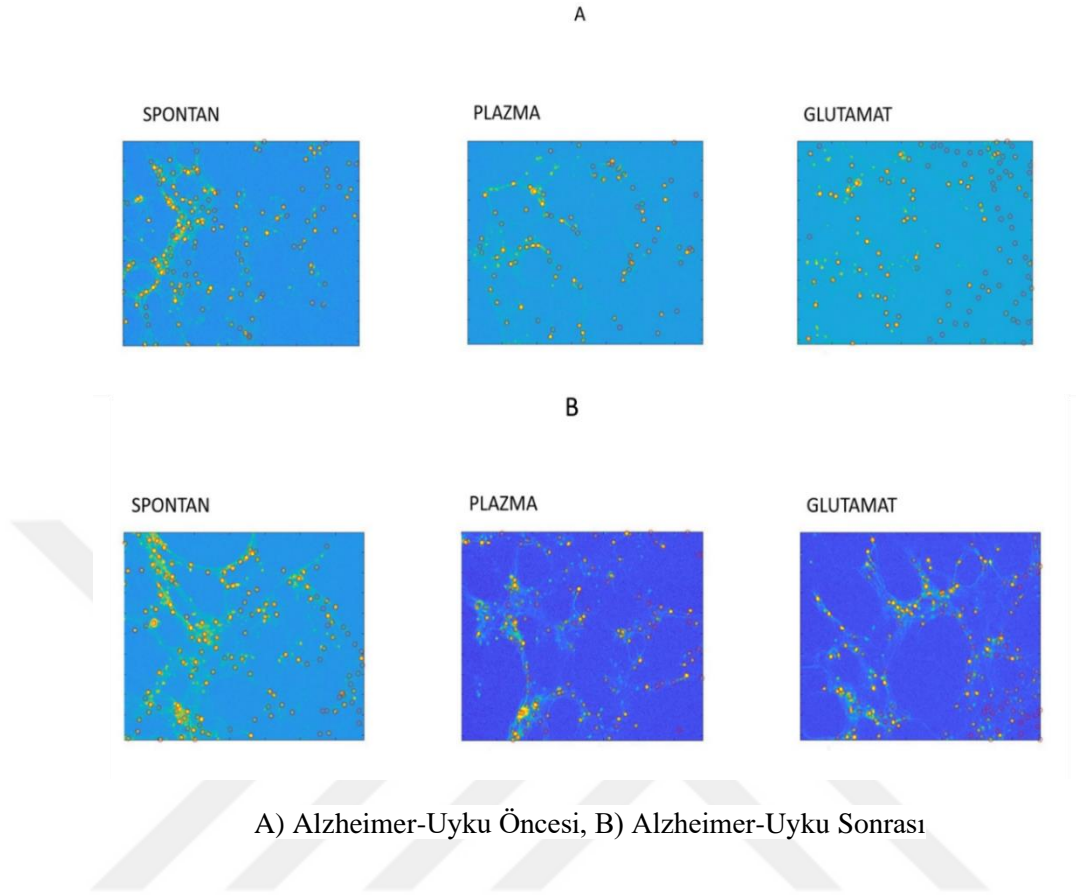
6.3. Hipokampal Nöron Kültüründe Alzheimer ve Kontrol Gruplarından Alınan Uyku Öncesi ve Sonrası Plazma Örneklerinin Etkin Hücre Sayısı, Olay Olma Sıklığı, Olay Genliği ve Süresinin Kalsiyuma Bağlı Aktivitesi

Kontrol grubunun hipokampal nöron kültür deneylerinde uyku öncesi ve sonrası alınan etkin hücre sayısının kalsiyuma bağlı aktivite sonuçları verilmiştir (Şekil 6.2). Bu doğrultuda spontan, plazmalı ve glutamatlı kalsiyum aktivitesine bağlı değişimlerin etkin hücre sayı görüntülerinde uyku öncesi alınan plazma örneğinde spontan aktivite üzerine plazma verildiğinde kalsiyum aktivitesinde etkin hücre artışı izlenmektedir. Aynı şekilde plazma sonrası glutamat verilen kültür kabının görüntü analizinde etkin hücre sayısında artış görülmektedir. Uyku sonrasında alınan plazma deneylerinde ise spontan kalsiyum aktivitesi sonrası plazma verilmiş kültürün kalsiyum aktivitesinde etkin hücre sayı artışı izlenirken plazma sonrası verilen glutamat deneyinde kalsiyum aktivitesinde etkin hücre sayısında azalış gözlemlenmiştir. Bu düşüşün glutamat eksitotoksitesine bağlı olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 6. 2. Spontan, Plazmalı ve Glutamatlı Kalsiyum Aktivitesine Bağlı değişimlerin Etkin Hücre Sayı Görüntüleri, A) Kontrol-Uyku Öncesi, B) Kontrol Uyku Sonrası

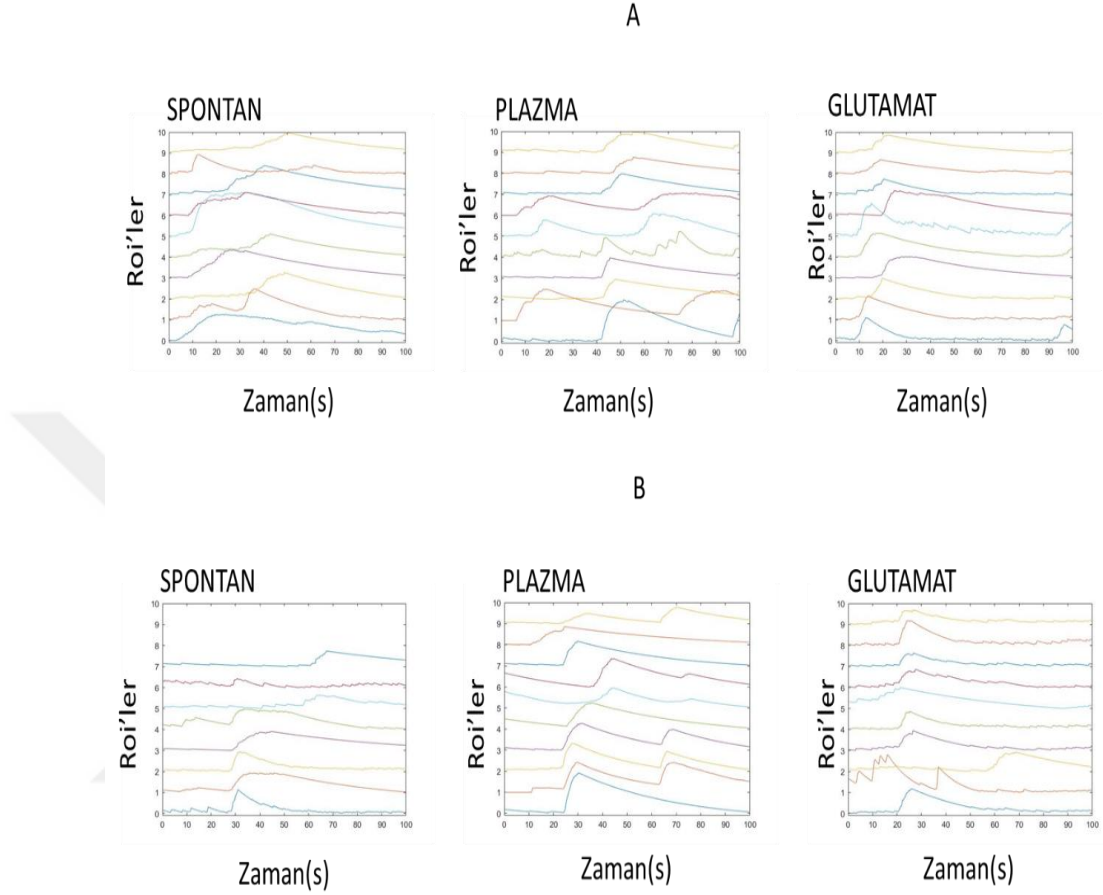
Kalsiyum aktivitesine bağlı etkin hücre sayısında Alzheimer grubundan bir kişinin uyku öncesi ve sonrası alınan plazma deney sonuçları aşağıda verilmiştir (Şekil 6.3). Buna göre uyku öncesi plazması ile yapılan hipokampal nöron kültüründe spontan aktivite üzerine plazma verildiğinde kalsiyum aktivitesinde etkin hücre artışı izlenmektedir. Aynı şekilde plazma sonrası glutamat verildiğinde de 1 saat sonrası sonuçlarında etkin hücre sayısında artış izlenmektedir. Uyku sonrasında alınan plazma deneylerinde ise spontan aktivite sonrası eklenen plazmanın kalsiyum etkin hücre sayısında açık bir şekilde artış izlenirken plazma sonrası eklenen glutamatın kalsiyum etkin hücre sayısında azalma gösterdiği izlenmektedir.



Şekil 6. 3. Spontan, Plazmalı ve Glutamat'ın Kalsiyum Aktivitesine Bağlı Değişimlerin Etkin Hücre Sayı Görüntüleri

Kontrol grubunun hipokampal nöron kültürü deneylerinde uyku önce ve sonrası olay sayısı, olay süresi ve olay genliğinin birlikte verildiği kalsiyum etkinliğine ait ışık şiddeti değişimlerinin kayıt üzerinden seçilmiş ROI' lerde zamana bağlı çizilmiş grafiği verilmiştir (Şekil 6.4). Buna göre hipokampal nöron kültüründe seçilen 10 hücre ve 100 saniye zaman aralığında uyku öncesi plazma deneyinde kalsiyum aktivitesine bağlı olay sayısında artış izlenirken glutamat verilen kalsiyum aktivitesinde spontan aktivitesine benzer bir olay sayısı olduğu izlenmektedir. Olay süresi ve genlikleri hücre içerisine giren kalsiyum miktarının büyüklüğüne göre değişkenlik göstermektedir. Uyku sonrası alınan plazma örneklerinde de plazma ve glutamat deney sonuçlarının spontan kalsiyum

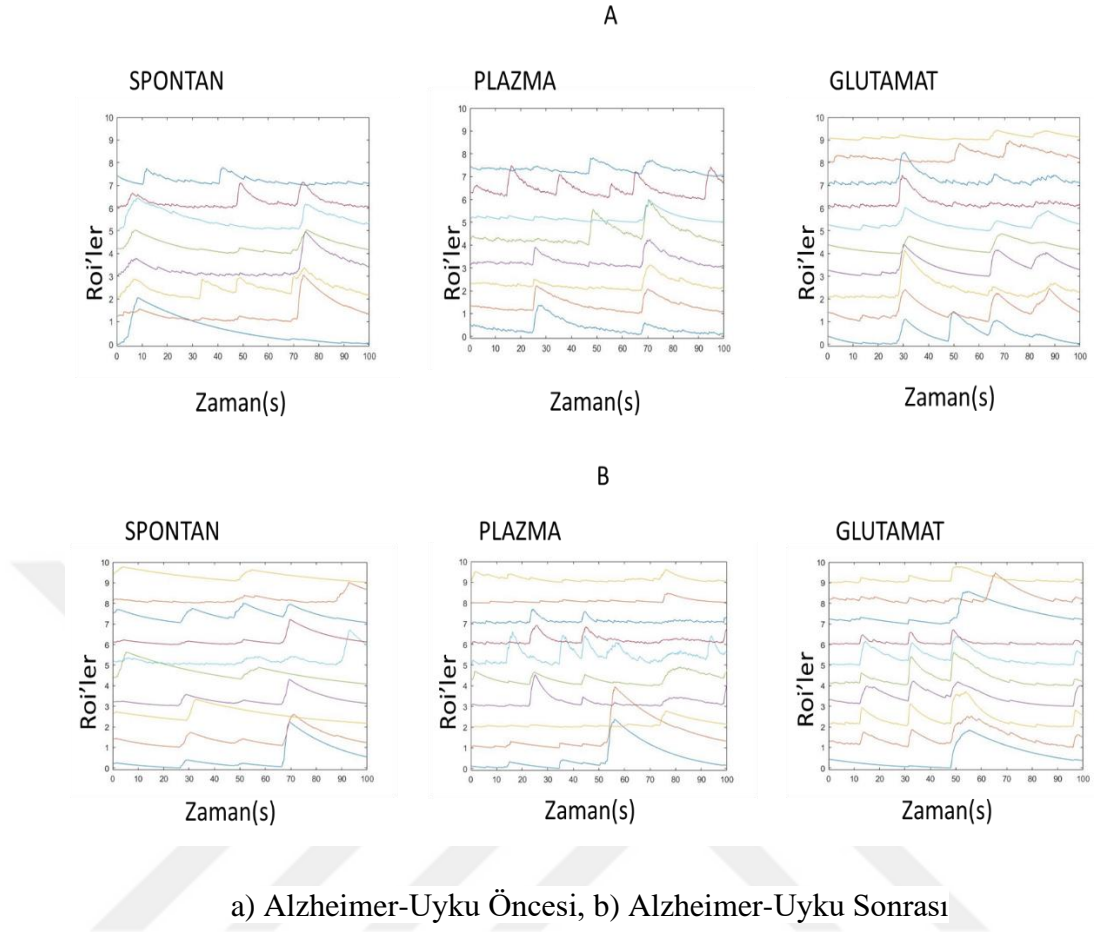
aktivitesine oranla olay sayısında kalsiyuma bağılı artış izlenmektedir. Olay süre ve genlikleri de hücre içi kalsiyuma bağılı değişmektedir.



A) Kontrol-Uyku Öncesi, B) Kontrol-Uyku Sonrası

Şekil 6. 4. Kalsiyum Etkinliğine Ait Kayıt Üzerinden Seçilmiş ROI'ler de Meydana Gelen Işık Şiddeti Değişimlerinin Zamana Bağılı Olarak Çizilmiş Grafiği

Alzheimer grubunun hipokampal nöron kültür deneylerinde uyku önce ve sonrası olay sayısı, olay süresi ve olay genliğinin birlikte verildiği kalsiyum etkinliğine ait ışık şiddeti değişimlerinin kayıt üzerinden seçilmiş ROI'lerde zamana bağılı çizilmiş grafiği verilmiştir (Şekil 6.5). Hem uyku öncesi hem de uyku sonrası alınan plazma örnekleri ile yapılan hipokampal nöron kültürü deney sonuçlarında kalsiyuma bağılı olay süresi, sayısı ve genliğinde kalsiyum aktivite artışı gözlemlenmektedir.



Şekil 6. 5. Kalsiyuma Bağlı Aktivitede ROI'lerde Meydana Gelen Işık Şiddeti Değişimlerinin Zamana Bağlı Olarak Çizilmiş Grafiği

6.4. Hipokampal Nöronlarda Uyku Öncesi ve Sonrası Plazma Etkin Hücre Sayısı, Olay Sıklığı, Olay Süre ve Genlik Ortalamalarının Grup İçi ve Gruplar Arası Parametre Karşılaştırma, Ortalama ve Standart Hata Analizleri

BALB/c ırkı farelerden elde edilen hipokampal nöronlarda kontrol ve Alzheimer gruplarının grup içi ve gruplar arası uyku öncesi ve sonrası plazma etkin hücre sayısı, olay sıklığı, olay süre ve genlik ortalama parametre karşılaştırma, ortalama ve standart hata parametre değerleri incelenmiştir. Her bir parametrenin spontan, plazma ve glutamat ortalamaları (Tablo 6. 2) gösterilmiştir.

Tablo 6. 2 Uyku Önce ve Sonrası Kontrol ve Alzheimer Gruplarının Hipokampal Hücre Kültüründe Kalsiyum Aktivite Parametrelerinin Ortalama ve Standart Hata Değerleri

Parametre	Kontrol	Alzheimer
	n =15	n =14
	Ort ± Std Hata	Ort ± Std Hata
UÖ-Etkin Hücre Sayısı-Spontan	133,86±3,98	105,85±15,04
UÖ-Etkin Hücre Sayısı-Plazma	139,53±5,27	114±10,68
UÖ-Etkin Hücre Sayısı-Glutamat	119,2±10,87	104,92±13,14
US-Etkin Hücre Sayısı-Spontan	138,66±3,61	139,14±3,69
US-Etkin Hücre Sayısı-Plazma	138,53±3	133,21±6,09
US-Etkin Hücre Sayısı-Glutamat	125,6±9,6	117,21±9,8
UÖ- Olay Sıklık- Spontan	1,44±,11	1,6±,12
UÖ- Olay Sıklık- Plazma	1,52±,13	1,9±,14
UÖ- Olay Sıklık- Glutamat	2,23±,34	2,59±,48
US- Olay Sıklık- Spontan	1,94±,2	1,75±,05
US Olay Sıklık- Plazma	2,03±,2	2,05±,18
US- Olay Sıklık- Glutamat	2,13±,31	2,47±,34
UÖ-Süre Ortalama-Spontan	35,46±4,09	30,58±3,13
UÖ-Süre Ortalama-Plazma	35,64±3,44	23,84±1,37
UÖ-Süre Ortalama-Glutamat	25,11±1,83	24,34±1,67
US-Süre Ortalama-Spontan	24,51±1,06	24,6±1,77
US-Süre Ortalama-Plazma	24,44±1,83	23,94±1,68
US-Süre Ortalama-Glutamat	23,47±1,5	23,87±1,71
UÖ-Genlik Ortalama-Spontan	,89±,08	,84±,06
UÖ-Genlik Ortalama-Plazma	,92±,07	,71±,05
UÖ- Genlik Ortalama-Glutamat	,82±,07	,74±,05
US- Genlik Ortalama-Spontan	,89±,07	,84±,05
US- Genlik Ortalama-Plazma	,87±,08	,86±,05
US- Genlik Ortalama-Glutamat	,81±,06	,77±,06

UÖ: Uyku önce; US: Uyku Sonra, Ort: Ortalama, Std Hata:Standart Hata, n=Deney Sayısı

BALB/c ırkı farelerden elde edilen hipokampal nöronlarda kontrol ve Alzheimer gruplarının uyku önce ve sonrası spontan, plazma ve glutamat etkin hücre sayısında grup içi ve gruplar arası analizler gerçekleştirilmiştir (Tablo 6.3). İkili grup karşılaştırma analizleri için Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Analiz sonucunda sadece Alzheimer ve kontrol grubunun uyku öncesi plazma etkin hücre sayısında anlamlı fark bulunmuştur. Sıra ortalamaları sırasıyla 11.07 ve 18.67, $U= 50$, $p = .016$, $r = -.45$. Cohen' nin standartlarına göre orta etki büyüklüğüne işaret etmektedir (102). Ortalamaları göz önünde bulundurulduğunda kontrol grubunun (139.53) plazma etkin hücre sayısının Alzheimer hastalarına (114) göre daha yüksek olduğu izlenmiştir. Etkin hücre sayıları için yapılan kalsiyuma bağlı spontan ve glutamat aktivitelerinin ikili karşılaştırmalarında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > .05$).

Tablo 6. 3. BALB/c ırkı Farelerden Elde Edilen Hipokampal Nöronlarda Grup içi ve Gruplar arası Etkin hücre sayı Karşılaştırmaları

Etkin Hücre Sayısı	Alzheimer-US	Kontrol-UÖ	Kontrol-US
Spontan	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
Alzheimer-UÖ	,056	,498	-
Alzheimer-US	-	-	,645
Kontrol-UÖ	-	-	,383
Etkin Hücre Sayısı			
Plazma			
Alzheimer-UÖ	,147	,016	-
Alzheimer-US	-	-	,793
Kontrol-UÖ	-	-	,204
Etkin Hücre Sayısı			
Glutamat			
Alzheimer-UÖ	,73	,965	-
Alzheimer-US	-	-	,631
Kontrol-UÖ	-	-	,418

Kontrol: Sağlıklı Yaşlı Bireyler; UÖ: Uyku Önce; US: Uyku Sonra

Kalsiyum girişine bağlı değişimlerin uyku öncesi ve sonrası olay olma sıklığı analizleri ikili karşılaştırmalar üzerine yapılarak Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmiştir, Buna göre, analiz sonucunda kontrol grubunun uyku öncesi ve sonrası spontan kalsiyum aktivitesinin olay sıklığı anlamlı bulunmuştur. Sıra ortalamaları sırasıyla 12.33 ve 8.67'dir, $U = 65$, $p = .049$, $r = -.36$. Cohen'e göre orta düzeyde etki büyüklüğüne sahiptir. Buna göre uyku sonrası spontan olay sıklığının uyku öncesine göre daha fazla olduğu izlenmektedir.

Kontrol grubunun plazma kalsiyum aktivitesinin olay olma sıklığı analizlerinde uyku öncesi ve sonrası ikili karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Kontrol grubunun uyku öncesi ve sonrası plazma olay olma sıklığı karşılaştırma analizleri anlamlı bulunmuştur. Buna göre sıra ortalamaları 12,20 ve 8,80, sırasıyla, $U = 63$, $p = .040$, $r = -.37$. Cohen'e göre orta düzeyde etki büyüklüğüne sahiptir. Uyku sonrası plazma olay sıklığının uyku öncesine göre daha fazla olduğu izlenmektedir.

Alzheimer ve kontrol grupları arasında yapılan olay olma sıklığı analizleri de Mann Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir (Tablo 6.4). Buna göre uyku öncesi plazma olay sıklığının iki grup arasında anlamlı olduğu bulunmuştur. Sıra ortalamaları kontrol grubu için 11.90 ve AH için 18.32, $U = 58.5$, $p = .042$, $r = -.38$. Cohen'in etki büyüklüğüne göre orta düzeye sahiptir. Uyku öncesi plazma deneylerinde kalsiyuma bağlı değişimlerde olay olma sıklık ortalamasının Alzheimer hastalarında (1.9) kontrollere göre (1.52) yüksek olduğu izlenmiştir. Kalsiyuma bağlı olay olma sıklıkları için glutamat aktivitelerinin ikili karşılaştırmalarında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > .05$).

Tablo 6. 4. BALB/c Irkı Farelerden Elde Edilen Hipokampal Nöronlarda Grup İçi ve Gruplar Arası Olay Olma Sıklığı Karşılaştırmaları

Olay Olma Sıklığı	Alzheimer-US	Kontrol-UÖ	Kontrol-US
Spontan	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
Alzheimer-UÖ	,369	,275	-
Alzheimer-US	-		,616
Kontrol-UÖ	-		,049
Olay Olma Sıklığı			
Plazma			
Alzheimer-UÖ	,535	,042	-
Alzheimer-US	-		,861
Kontrol-UÖ	-		,040
Olay Olma Sıklığı			
Glutamat			
Alzheimer-UÖ	,872	,647	-
Alzheimer-US	-		,176
Kontrol-UÖ	-		,803

Kontrol: Sağlıklı Yaşlı Bireyler; UÖ: Uyku Önce; US: Uyku Sonra

Kontrol grubunun uyku öncesi ve sonrası plazma deneylerinde kalsiyuma bağlı aktivitenin olay süre ortalamalarında ikili karşılaştırma analizi için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Buna göre kontrol grubunun uyku öncesi ve sonrası kalsiyuma bağlı değişimlerde plazma olay süreleri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Analiz sonucuna göre sıra ortalamaları sırasıyla, 19.40 ve 11.60'tır, $U = 54$, $p = .015$, $r = -.44$. Cohen'in etki büyüklüğüne göre orta-yüksek düzeye sahiptir. Uyku öncesi plazma olay süresinin (35.64) ortalaması incelendiğinde uyku sonrasına (24.44) göre daha uzun kalsiyum aktivitesi izlenmiştir.

Alzheimer ve kontrol grupları arasında yapılan kalsiyuma bağlı olay süresi analizleri Mann Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir (Tablo 6. 5). Buna göre uyku öncesi plazma olay süresi iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Sıra ortalamaları kontrol grubu için 18.93 ve AH için 10.79, $U = 46$, $p = .010$, $r = -.48$. Cohen'e göre orta-yüksek düzeyde etki büyüklüğüne sahiptir. Uyku öncesi plazma olay süre ortalamasının kontrol grubunda (35.64). Alzheimer hastalarına göre (23.84) yüksek olduğu izlenmiştir. Kalsiyuma bağlı olay olma sürelerinde spontan ve

glutamat aktivitelerinin ikili karşılaştırmalarında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > .05$).

Tablo 6. 5. BALB/c Irkı Farelerden Elde Edilen Hipokampal Nöronlarda Grup İçi ve Gruplar Arası Olay Süresi Karşılaştırmaları

Olay Süresi	Alzheimer-US	Kontrol-UÖ	Kontrol-US
Spontan	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
Alzheimer-UÖ	,129	,359	-
Alzheimer-US	-	-	,760
Kontrol-UÖ	-	-	,059
Olay Süresi			
Plazma			
Alzheimer-UÖ	,927	,010	-
Alzheimer-US	-	-	,663
Kontrol-UÖ	-	-	,015
Olay Süresi			
Glutamat			
Alzheimer-UÖ	,854	,694	-
Alzheimer-US	-	-	,965
Kontrol-UÖ	-	-	,494

UÖ: uyku önce; US: Uyku Sonra, Ort: Ortalama, Std hata: ortalama standart hata

Alzheimer hastalarının hipokampal nöron kültürü sonuçlarının uyku öncesi ve sonrası kalsiyum aktivitelerine bağlı plazma olay genliği analizlerinde Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Alzheimer grubunun uyku öncesi ve sonrası plazma olay genliği karşılaştırma analizlerinde anlamlı fark bulunmuştur. Sıra ortalamaları uyku öncesi için 11.36 ve uyku sonrası için 17.64, $U = 54$, $p = .043$, $r = -.37$. Cohen'e göre orta düzeyde etki büyüklüğüne sahiptir. Buna göre ortalamaları incelendiğinde uyku sonrasında (.86) plazma olay genliği uyku öncesine (.71) göre daha fazla olduğu izlenmektedir.

Alzheimer ve kontrol grup karşılaştırmalarında hipokampal nöron kültürü sonuçlarının uyku öncesi kalsiyum aktivitelerine bağlı plazma olay genliği analizlerinde Mann Whitney U testi kullanılmıştır (Tablo 6.6). Sonuç olarak uyku

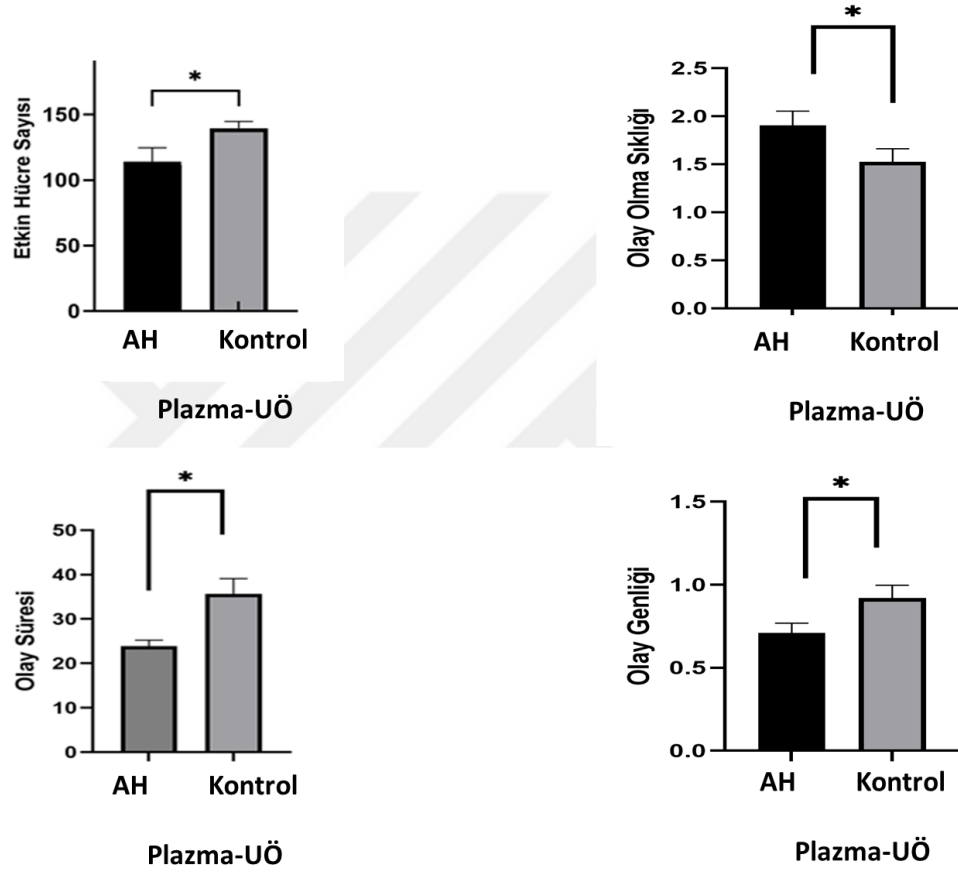
öncesinde plazma olay genlik farkları iki grup arasında anlamlı bulunmuştur Sıra ortalamaları kontrol için 18.10 ve AH için 11.68, $U = 58.5$, $p = .042$, $r = -.38$. Cohen'e göre orta düzeyde etki büyüklüğüne sahiptir. Ortalamaları ele alındığında kontrol grubunda (.92) uyku öncesi olay genliği Alzheimer hastalarına (.71) göre daha fazla bulunmuştur. Olay genliği için yapılan diğer istatistiksel analizlerde anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Tablo 6. 6. BALB/c Irkı Farelerden Elde Edilen Hipokampal Nöronlarda Grup İçi ve Gruplar Arası Olay Genliği Karşılaştırmaları

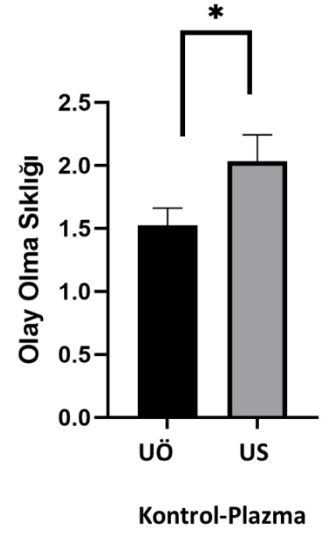
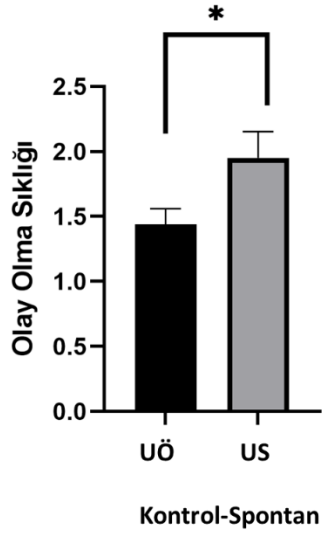
Olay Genliği	Alzheimer-US	Kontrol-UÖ	Kontrol-US
Spontan	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
Alzheimer-UÖ	,854	,485	-
Alzheimer-US	-	-	,383
Kontrol-UÖ	-	-	,983
Olay Genliği			
Plazma			
Alzheimer-UÖ	,043	,042	-
Alzheimer-US	-	-	,965
Kontrol-UÖ	-	-	,633
Olay Genliği			
Glutamat			
Alzheimer-UÖ	,818	,407	-
Alzheimer-US	-	-	,727
Kontrol-UÖ	-	-	,901

UÖ: uyku önce; US: Uyku Sonra, Ort: Ortalama, Std hata: ortalama standart hata

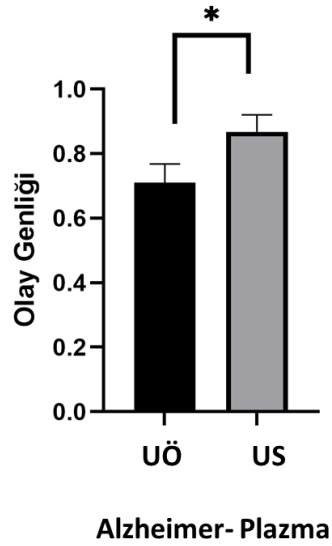
Anlamalı bulunan karşılaştırmalardan bazıları (Şekil 6.6), (Şekil 6.7) ve (Şekil 6.8) gösterilmiştir. Tabloda yer alan p değeri ($p < .05$) kabul edilip, ikili karşılaştırmalar görselleştirilerek verilmiştir.



Şekil 6. 6. Uyku Öncesi Plazma Etkin Hücre Sayısı, Olay Olma Sıklığı, Olay Süre ve Genlik Grup Karşılaştırmaları



Şekil 6. 7. Uyku Öncesi ve Sonrası Plazma Etkin Hücre Sayısı, Olay Olma Sıklığı, Olay Süre ve Genlik Grup İçi Karşılaştırmaları



Şekil 6. 8. Uyku Öncesi ve Sonrası Plazma Olay Genlik Grup İçi Karşılaştırmaları

6. 5. BALB/c ırkı Farelerden Elde Edilen Hipokampal Nöronlarda Alzheimer Hastalarında ve Yaşlı Sağlıklı Kontrollerde Kalsiyum aktivitesine Bağlı Spontan-Plazma, Spontan-Glutamat ve Plazma-Glutamat DeneYlerinde Uyku Önce Grup İçi ve Uyku Sonra Grup İçi Karşılaştırma Analizleri

Alzheimer hastalarının plazma örnekleriyle yapılan hipokampal nöron kültür deneyi sonuçlarının spontan-plazma, spontan-glutamat ve plazma-glutamat kalsiyuma bağlı aktivite karşılaştırma analizlerinde uyku öncesi ve uyku sonrası grup içi karşılaştırma analizlerinde bağımlı değişkenler için her birinin ikili karşılaştırma analizleri parametrik olmayan Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapılmıştır (Tablo 6.7). Tüm bağımlı değişken karşılaştırmalarında etkin hücre sayımı bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > .05$).

Çalışma yordamımızda hipokampal nöron kültüründe kalsiyuma bağlı aktivitede sırasıyla spontan, plazma ve glutamat görüntüleri alınmıştır. Buna göre spontan-plazma, spontan glutamat ve plazma-glutamat çiftleri arasında kalsiyuma bağlı aktivitede bağımlı değişkenlerin fark analizi için Wilcoxon işaretli sıralar testi yapılmıştır. Alzheimer hastalarının plazma örnekleriyle yapılan hipokampal nöron kültürü sonucu kalsiyum aktivitesinde spontan-plazma ile aralarında olay olma sıklığı bakımından anlamlı farklı bulunmuştur, $z = 2.10$, $p = .035$, $r = -.56$, yüksek etki büyüklüğüne sahiptir. Aynı zamanda spontan ve glutamat aktiviteleri arasında da anlamlı fark çıkmıştır, $z = 2.16$, $p = .030$, $r = -.58$, yüksek etki büyüklüğüne sahiptir.

Alzheimer hastalarında, BALB/c ırkı farelerden elde edilen hipokampal nöron kültüründe kalsiyuma bağlı spontan-plazma, spontan-glutamat ve plazma-glutamat aktivitelerinde uyku önce ve uyku sonrası grup içi olay süresi karşılaştırma analizlerinde Wilcoxon işaretli sıralar testi yapılmıştır. Bu analiz sonucunda, kalsiyum aktivitesinde spontan ve plazma ile aralarında olay süresi bakımından anlamlı farklı bulunmuştur, $z = 2.35$, $p = .019$, $r = -.63$, Cohen' e göre yüksek etki büyüklüğüne sahiptir. Aynı zamanda spontan ve glutamat aktiviteleri arasında da anlamlı fark çıkmıştır, $z = 2.54$, $p = .011$, $r = -.68$, Cohen' e göre yüksek etki büyüklüğüne sahiptir. Plazma ve glutamat çiftleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p > .05$).

Alzheimer hastalarında, BALB/c ırkı farelerden elde edilen hipokampal nöron kültüründe spontan-plazma, spontan-glutamat ve plazma-glutamat deneylerinde kalsiyuma bağlı aktivitenin uyku öncesi ve uyku sonrası grup içi olay genliği karşılaştırma analizleri Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapılmış ve tüm bağımlı karşılaştırma kombinasyonlarında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>.05$).

Sağlıklı yaşlı grupta BALB/c ırkı farelerden elde edilen hipokampal nöronlarda spontan-plazma, spontan-glutamat ve plazma-glutamat deneylerinde kalsiyuma bağlı aktivitenin uyku öncesi ve uyku sonrası grup içi etkin hücre sayısı karşılaştırma analizleri Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapılmıştır (Tablo.6.4). Analiz sonucunda sadece uyku öncesi plazma ve glutamat etkin hücre sayımı arasında anlamlı fark bulunmuştur, $z= 3.2$, $p =.001$, $r = -.83$, Cohen' e göre çok yüksek etki büyüklüğüne sahiptir.

BALB/c ırkı farelerden elde edilen hipokampal nöronlarda sağlıklı yaşlı grupta spontan-plazma, spontan-glutamat ve plazma-glutamat deneylerinde kalsiyuma bağlı aktivitenin uyku öncesi ve uyku sonra grup içi olay olma sıklığı karşılaştırma analizleri Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapılmıştır. Analiz sonucunda sadece uyku öncesi olay olma sıklığı spontan ve glutamat aktiviteleri arasında anlamlı fark bulunmuştur, $z= 2.72$, $p =.023$, $r = -.70$, Cohen' e göre çok yüksek etki büyüklüğüne sahiptir.

BALB/c ırkı farelerden elde edilen hipokampal nöronlarda sağlıklı yaşlı grupta spontan-plazma, spontan-glutamat ve plazma-glutamat deneylerinde kalsiyuma bağlı aktivitenin uyku önce grup içi ve uyku sonra grup içi olay süresi karşılaştırma analizleri Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapılmıştır. Analiz sonucunda uyku öncesi olay süresi spontan-glutamat aktiviteleri arasında anlamlı fark bulunmuştur, $z= 2.66$, $p = .008$, $r = - .69$, Cohen' e göre yüksek etki büyüklüğüne sahiptir ve plazma-glutamat aktiviteleri arasında anlamlı fark bulunmuştur, $z= 2.78$ $p =.005$ $r = -.71$, Cohen' e göre çok yüksek etki büyüklüğüne sahiptir.

BALB/c ırkı farelerden elde edilen hipokampal nöronlarda sağlıklı yaşlı grupta spontan-plazma, spontan-glutamat ve plazma-glutamat deneylerinde kalsiyuma bağlı uyku öncesi ve uyku sonrası grup içi olay genliği karşılaştırma analizleri Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapılmıştır. Tüm bağımlı karşılaştırma kombinasyonlarında

olay genliği karşılaştırmaları için uyku öncesi ve sonrası kalsiyuma bağlı aktivite de anlamlı fark bulunmamıştır ($p>.05$).

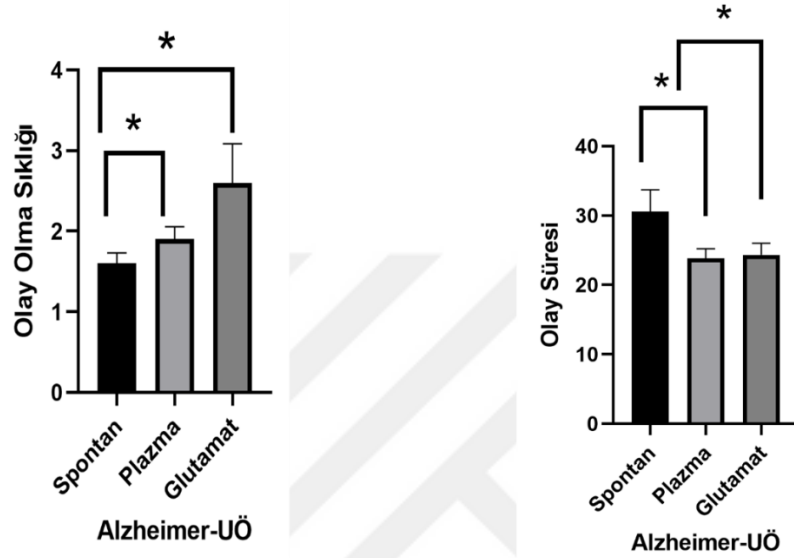
Bağımlı değişkenler için yapılan analizlerde uyku sonrası alınan plazmalar ile yapılan hipokampal nöron kültürü deney sonuçlarında kalsiyuma bağlı aktivitede spontan-plazma, spontan-glutamat ve plazma-glutamat deneyleri sonuçlarında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>.05$).

Tablo 6. 7. Alzheimer Hastalarında ve Kontrollerde Spontan-Plazma, Spontan-Glutamat ve Plazma-Glutamat Deneylerinde Uyku önce ve Sonra Grup İçi Olay Olma Sıklığı

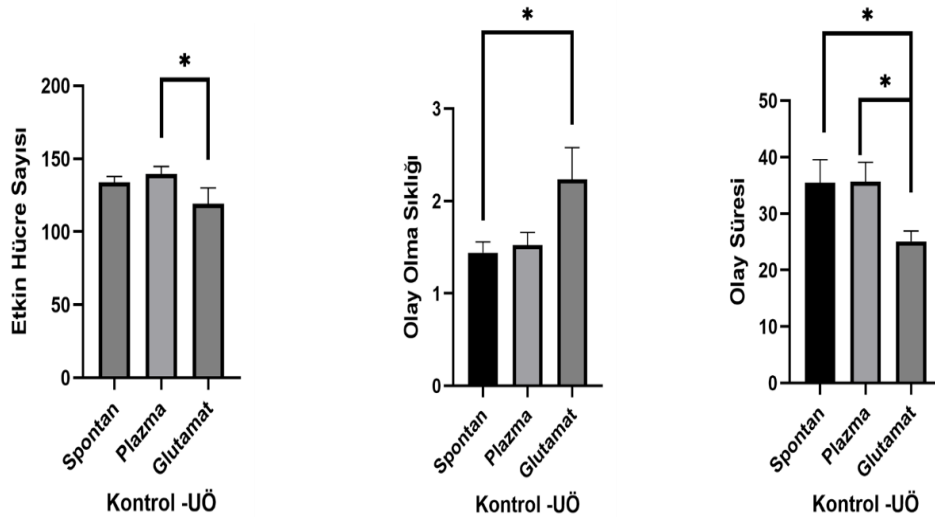
Olay Olma Sıklığı (Alzheimer-U)	Plazma <i>p</i> değeri	Glutamat <i>p</i> değeri
Spontan	,035	,030
Plazma	-	,173
Olay Süresi (Alzheimer-U)	Plazma <i>p</i> değeri	Glutamat <i>p</i> değeri
Spontan	,019	,011
Plazma	-	,730
Etkin Hücre Sayımı (Kontrol-U)	Plazma <i>p</i> değeri	Glutamat <i>p</i> değeri
Spontan	,133	,280
Plazma	-	,001
Olay Olma Sıklığı (Kontrol-U)	Plazma <i>p</i> değeri	Glutamat <i>p</i> değeri
Spontan	,427	,023
Plazma	-	,053
Olay Süresi (Kontrol-U)	Plazma <i>p</i> değeri	Glutamat <i>p</i> değeri
Spontan	,955	,008
Plazma	-	,005

U: Uyku ncesi, Kontrol: Sağlıklı Yaşlı Kontrol

Alzheimer hastalarında spontan-plazma, spontan-glutamat ve plazma-glutamat deneylerinde uyku önce grup içi ve uyku sonra grup içi karşılaştırma analizlerinde bağımlı değişkenler için her birinin ikili karşılaştırma analizlerinde anlamlı bulunan karşılaştırmalar (Şekil 6.9) ve (Şekil 6.10) gösterilmiştir. Tabloda yer alan p değeri ($p < .05$) kabul edilip, karşılaştırmalar görselleştirilerek verilmiştir.



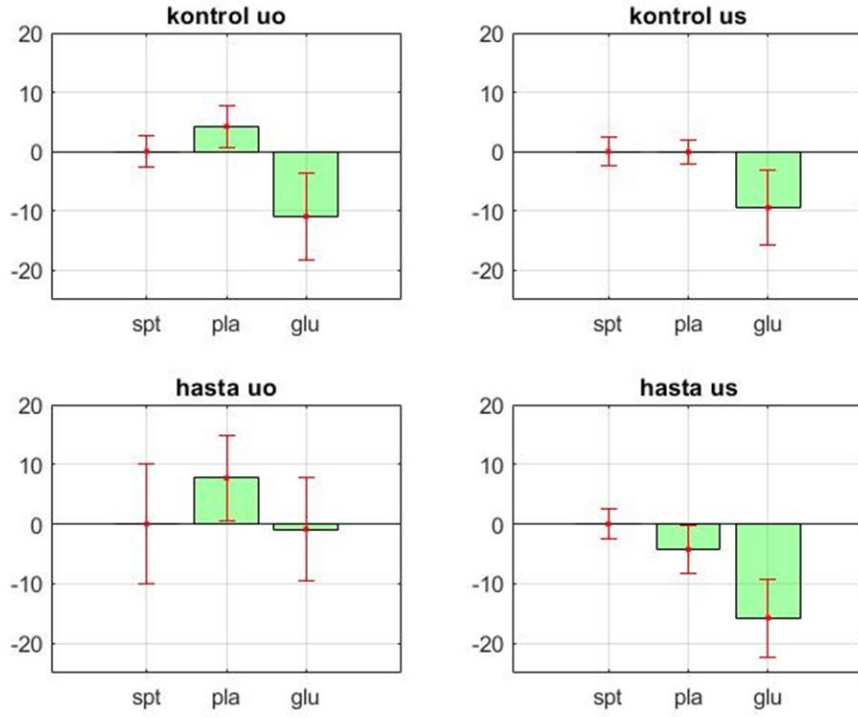
Şekil 6. 9. Alzheimer Hastalarında Spontan-Plazma, Spontan-Glutamat ve Plazma-Glutamat Deneylerinde Uyku Öncesi Grup İçi Olay Olma Sıklığı



Şekil 6. 10. Kontrol Grubunda Spontan-Plazma, Spontan-Glutamat ve Plazma-Glutamat Deneylerinde Uyku Öncesi Grup İçi Olay Olma Sıklığı

6. 6. BALB/c ırkı Farelerden Elde Edilen Hipokampal Nöronlarda Alzheimer Hastalarında ve Yaşlı Sağlıklı Kontrollerde Kalsiyum aktivitesine Bağlı Spontan, Glutamat ve Plazma Deneylelerinde Uyku Öncesi ve Sonrası etkin hücre sayısı, olay sıklığı, olay süre ve genlik ortalamalarının Yüzdelerik Değişimleri

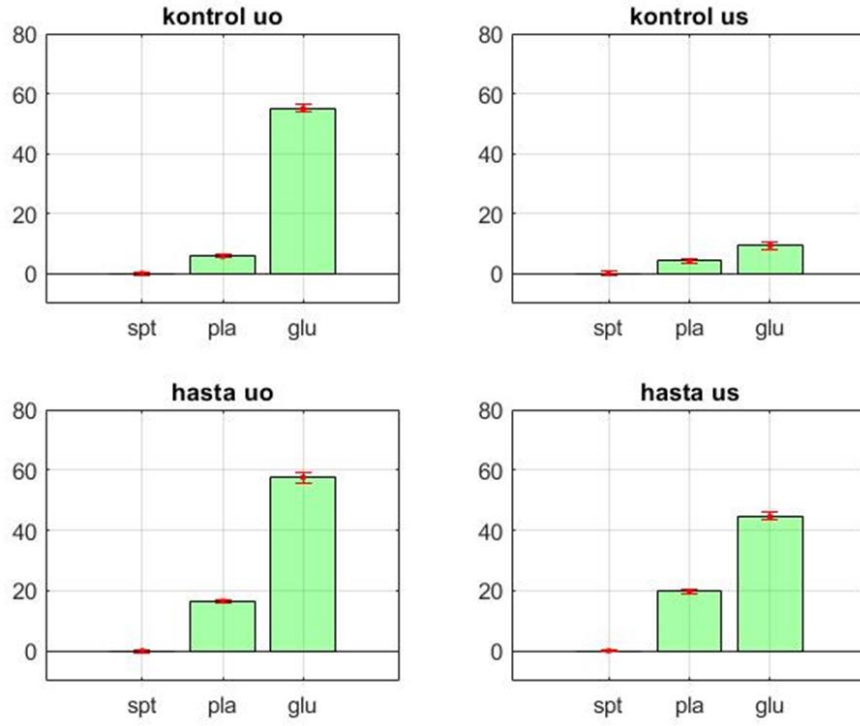
Alzheimer ve kontrol gruplarının hipokampal nöron kültüründe kalsiyuma bağlı aktivitenin uyku önce ve sonrası alınan plazma örneklerinin spontana bağlı plazma ve glutamat deneylelerinden elde edilen etkin hücre sayısı, olay sıklığı, genliği ve süresinin yüzdelerik değişimleri verilmiştir (Şekil 6.11). Buna göre spontan aktivitenin 100 kabul edildiği duruma göre artış azalış grafiğinde, etkin hücre sayısında kontrol grubunun uyku öncesinde plazmanın kalsiyum aktivitesini arttırdığı görülürken glutamat verildiği durumda kalsiyum aktivitesinin azaldığı gözlemlenmektedir. Kontrol grubunun uyku sonrası etkin hücre sayısında plazma verildiği durumda kalsiyuma bağlı değişiklik yokken glutamat verildiği durumda kalsiyum aktivitesini azalttığı izlenmiştir. Alzheimer grubunda da etkin hücre sayısında uyku öncesi plazma verildiği durumda kalsiyum aktivitesinin yaklaşık %10 arttığı izlenirken, glutamatın aktiviteyi %3 civarında azalttığı gözlemlenmiştir. Uyku sonrası plazmanın spontan aktiviteye etkisine baktığımızda da kalsiyum aktivitesine bağlı bir azalma izlenmiştir. Uyku sonrası etkin hücre sayısında kalsiyuma bağlı glutamatın %15 oranında aktiviteyi azalttığı izlenmiştir.



Spt:Spontan, Pla:Plazma,Glu:Glutamat, Uo:Uyku Öncesi, Us:Uyku Sonrası

Şekil 6. 11. Alzheimer ve Yaşlı Sağlıklı Kontrollerin Hipokampal Nöron Kültüründe Kalsiyuma Bağlı Etkin Hücre Sayısının Yüzdelerik Değişimlerinin Artış-Azalış Grafiği

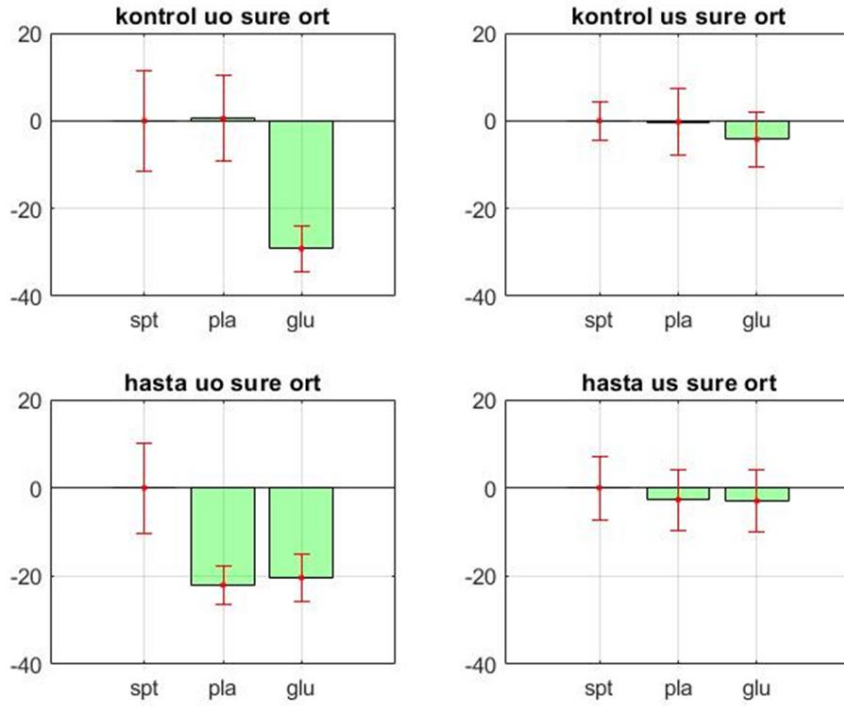
Alzheimer ve kontrol gruplarının hipokampal nöron kültüründe kalsiyuma bağlı aktivitenin uyku önce ve sonrası alınan plazma örneklerinin spontana bağlı plazma ve glutamat deneylerinden elde edilen olay sıklığının yüzdelerik değişimleri verilmiştir (Şekil 6.12). Buna göre spontan aktivitenin 100 kabul edildiği duruma göre artış azalış grafiğinde, olay sıklık analizlerinde kontrol grubunun uyku öncesi plazma aktivitesinin %5 arttırdığı, glutamat deney sonucunda da açık bir şekilde %50 kalsiyum aktivitesinde artış saptanmıştır. Bu grubun uyku sonrası deneylerin de ise plazma da yine artış varken, glutamattaki artışın %7 civarında olduğu izlenmektedir. Alzheimer grubunun hipokampal nöron kültür deneylerinde uyku öncesi olay sıklık parametresinde plazmada yaklaşık %20 artış, glutamat verildiğinde ise yaklaşık %60 kalsiyum aktivitesini arttırdığı izlenmiştir. Bu grubun uyku sonrası olay sıklık parametresinde ise plazma da ki artışın %21 civarında olduğu, glutamat artışının %45 olduğu bir tablo gözlemlenmektedir.



Spt:Spontan, Pla:Plazma, Glu:Glutamat, Uo:Uyku Öncesi, Us:Uyku Sonrası

Şekil 6. 12. Alzheimer ve Yaşlı Sağlıklı Kontrollerin Hipokampal Nöron Kültüründe Kalsiyuma Bağlı Aktivitesinin Olay Sıklık Parametresinde Yüzdeler Değişimlerinin Artış-Azalış Grafiği

Alzheimer ve kontrol gruplarının hipokampal nöron kültüründe kalsiyuma bağlı aktivitenin uyku önce ve sonrası alınan plazma örneklerinin spontana bağlı plazma ve glutamat deneylerinden elde edilen olay süresinin yüzdeler değişimleri verilmiştir (Şekil 6.13). Buna göre spontan aktivitenin 100 kabul edildiği duruma göre artış azalış grafiğinde, olay süresi analizlerinde kontrol grubunun uyku öncesi plazmanın kalsiyum aktivitesini %1 civarında arttırdığı, glutamat'ın %30 civarında aktiviteyi azalttığı izlenirken, bu grubun uyku sonrası olay süre analizinde plazmanın kalsiyum aktivitesini %1 civarında azalttığı, glutamat'ın %5 oranında azalttığı izlenmektedir. Alzheimer grubunun hipokampal nöron kültür deneylerinde uyku öncesi olay süresi parametresinde plazmada %25 civarında kalsiyum aktivite olay süresi azalmış bunun yanında glutamat'ın da yaklaşık %20 civarında kalsiyum aktivitesinin olay süresini azalttığı gözlemlenmektedir. Bu grubun uyku sonrası olay süresi kalsiyum aktivite sonuçlarında ise plazma %3, glutamat'ın da hemen hemen aynı oranda aktivite süresini azalttığı izlenmiştir.

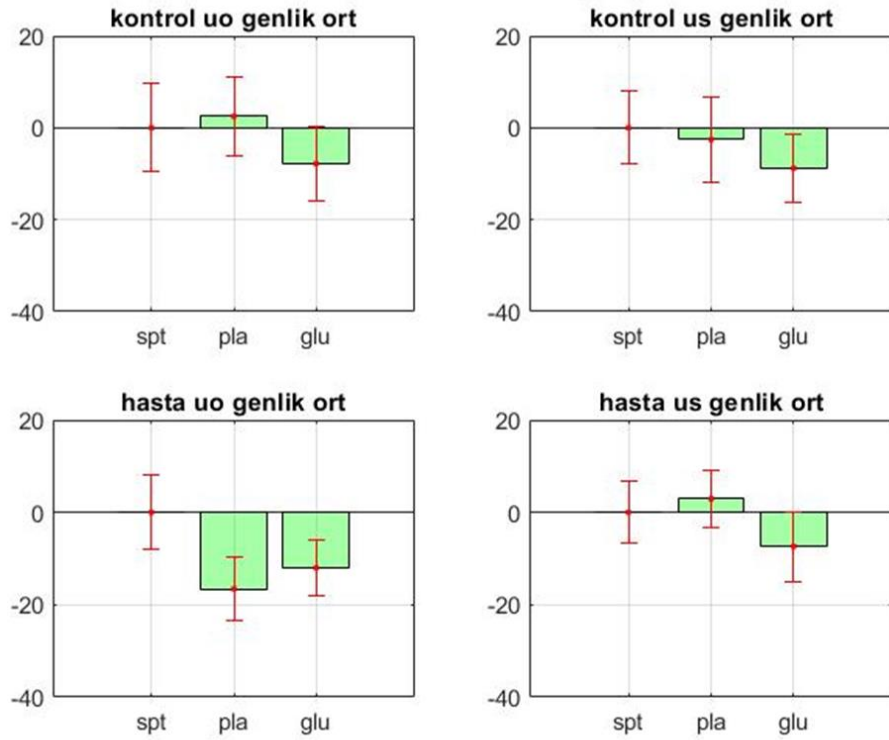


Spt:Spontan, Pla:Plazma, Glu:Glutamat, Uo:Uyku Öncesi, Us:Uyku Sonrası

Şekil 6. 13. Alzheimer ve Yaşlı Sağlıklı Kontrollerin Hipokampal Nöron Kültüründe Kalsiyuma Bağlı Aktivitesinin Olay Süresi Parametresinde Yüzelik Değişimlerinin Artış-Azalış Grafiği

Alzheimer ve kontrol gruplarının hipokampal nöron kültüründe kalsiyuma bağlı aktivitenin uyku önce ve sonrası alınan plazma örneklerinin spontana bağlı plazma ve glutamat deneylerinden elde edilen olay genliğinin yüzelik değişimleri verilmiştir (Şekil 6.14). Buna göre spontan aktivitenin 100 kabul edildiği duruma göre artış azalış grafiğinde, olay genliği ortalama analizlerinde kontrol grubunun uyku öncesi plazmanın kalsiyum aktivitesini %3 arttırdığı, glutamatın ise kalsiyum aktivitesini %8 civarında azalttığı saptanmıştır. Bu grubun uyku sonrası olay genlik ortalama analizlerinde plazmanın yaklaşık %2 civarında iken, glutamatın %8 kalsiyum aktivitesini azalttığı izlenmiştir. Alzheimer grubunun hipokampal nöron kültür deneylerinde uyku öncesi olay genliği ortalamasında plazmanın yaklaşık %18 civarında kalsiyum genlik aktivitesini azalttığı, glutamatında %10 civarında azalttığı

gözlemlenmektedir. Bu grubun uyku sonrası olay genlik ortalama analizlerinde ise plazmanın %3 genlik aktivitesini arttırdığı yönde bir sonuç gözlemlenirken, glutamat'ın %7 civarında kalsiyuma bağlı genlik ortalama aktivitesini azalttığı izlenmiştir.



Spt:Spontan, Pla:Plazma,Glu:Glutamat, Uo:Uyku Öncesi, Us:Uyku Sonrası

Şekil 6. 14. Alzheimer ve Yaşlı Sağlıklı Kontrollerin Hipokampal Nöron Kültüründe Kalsiyuma Bağlı Aktivitesinin Olay Genlik Parametresinde Yüzdelerik Değişimlerinin Artış-Azalış Grafiği

6.7. LC-MS/MS ile Yapılan Plazma Protein Analiz Sonuçları

Alzheimer ve kontrol gruplarının uyku önce ve sonrası alınan kan plazma örneklerinde LC-MS/MS ile bulunan protein tanımlamaları aşağıda gösterilmiştir. Protein tanımlamalarında anlamlılık değerinin $p < .05$ olduğu ve maksimum katlanma değerinin >1.4 olduğu değerler dikkate alınarak gruplamalar yapılmıştır. Tüm protein tanımlamalarında 2 ve fazlası olan özgün peptitler (unique peptid) dahil edilerek analiz yapılmıştır. Gruplama tabloları şu şekilde oluşturulmuştur;



Tablo 6. 8. Uyku Sonrası Alınan Plazma Örneklerinde Alzheimer Grubunun Kontrol Grubuna Göre Fazla Bulunan Proteinleri ve Bu Proteinlerin p Değeri ve Maksimum Katlanma Değişimleri

Erişim Numarası	p değeri	Protein ismi	Max Katlama değişimi
1. A4UGR9	0,00	Xin actin-binding repeat-containing protein 2	2,78
2. P37802	0,00	Transgelin-2	3,65
3. P02775	0,00	Platelet basic protein	1,85
4. Q5T097	0,00	Utrophin	2,39
5. Q99666	0,00	RANBP2-like and GRIP domain-containing protein 5/6	1,61
6. Q8N4Y2	0,00	EF-hand calcium-binding domain-containing protein 4A	3,83
7. Q92966	0,00	snRNA-activating protein complex subunit 3	1,89
8. O75146	0,01	Huntingtin-interacting protein 1-related protein	2,02
9. A0A0B4J278	0,01	Alpha-1-antitrypsin (Fragment)	2,47
10. D6REY8	0,01	Rap guanine nucleotide exchange factor 2 (Fragment)	9,80
11. A0A804CDA6	0,01	Dynactin subunit 1 OS=Homo sapiens	3,12
12. H0Y755	0,01	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-A	1,47
13. O14976	0,01	Cyclin-G-associated kinase	2,41
14. P07737	0,01	Profilin-1	1,81
15. C9J7L7	0,02	Glutamate-rich protein 6 (Fragment)	1,56
16. O14672	0,03	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	1,42
17. Q502W6	0,04	von Willebrand factor A domain-containing protein 3B	1,63
18. O75970	0,04	Multiple PDZ domain protein	2,16

Tablo 6. 9. Uyku Sonrası Alınan Plazma Örneklerinde Kontrollerin Alzheimer Grubuna Göre Fazla Bulunan Proteinleri ve Bu Proteinlerin p Değeri ve Maksimum Katlanma Değişimleri

Erişim Numarası	<i>p</i> değeri	Protein ismi	Max Katlama değişimi
1. Q8N859	0,00	Zinc finger protein	2,16
2. Q14766	0,00	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	3,88
3. P02751	0,00	Fibronectin	2,01
4. A0A087WWN1	0,00	Coiled-coil domain-containing protein 122 (Fragment)	4,16
5. Q9BYX7	0,00	Putative beta-actin-like protein 3	3,11
6. O95235	0,00	Kinesin-like protein	3,44
7. Q7Z3J3	0,00	RanBP2-like and GRIP domain- containing protein	5,33
8. P05109	0,00	Protein S100-A8	1,48
9. O43861	0,00	Probable phospholipid-transporting ATPase IIB	1,66
10. P00488	0,00	Coagulation factor XIII A chain	1,81
11. A0A140T9W2	0,01	HLA class I histocompatibility antigen, C alpha chain	1,65
12. Q8N9Z9	0,01	Lamin tail domain-containing protein 1	2,03
13. Q16401	0,01	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5	1,96
14. Q8N7Z5	0,02	Ankyrin repeat domain-containing protein 31	3,14
15. Q14980	0,03	Nuclear mitotic apparatus protein 1	1,41
16. Q6P5X7	0,04	Transmembrane protein 71	1,66
17. Q9UEF7	0,04	Klotho	1,40
18. Q76L82	0,04	Additional sex combs like 1 (Drosophila), isoform CRA_d	1,41

Tablo 6. 10. Uyku Öncesi Alınan Plazma Örneklerinde Alzheimer Grubunun Kontrol Grubuna Göre Fazla Bulunan Proteinleri ve Bu Proteinlerin p Değeri ve Maksimum Katlanma Değişimleri

Erişim Numarası	<i>p</i> değeri	Protein ismi	Max Katlama değişimi
1. Q8N7Z5	0,00	Ankyrin repeat domain-containing protein 31	2,97
2. A0A804CDA6	0,00	Dynactin subunit 1	2,03
3. P18428	0,01	Lipopolysaccharide-binding protein	2,01
4. P01266	0,01	Thyroglobulin	1,79
5. Q92820	0,01	Gamma-glutamyl hydrolase	2,03
6. P02750	0,02	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	1,75
7. P61769	0,02	Beta-2-microglobulin	1,63
8. P02775	0,03	Platelet basic protein	1,78
9. H7BXH2	0,03	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit 3	1,41

Tablo 6. 11. Uyku Öncesi Alınan Plazma Örneklerinde Kontrollerin Alzheimer Grubuna Göre Fazla Bulunan Proteinleri ve Bu Proteinlerin p Değeri ve Maksimum Katlanma Değişimleri

Erişim Numarası	<i>p</i> değeri	Protein ismi	Max Katlama değişimi
1. A0A140T9W2	0,01	HLA class I histocompatibility antigen, C alpha chain	1,67
2. Q8IXS6	0,02	Paralemm-2	1,51
3. E5RK28	0,02	Serine/threonine-protein kinase Sgk3 (Fragment)	1,85
4. A0A087WV90	0,03	Dystrophin	4,99
5. Q7M4L6	0,04	SH2 domain-containing adapter protein F	1,42
6. H0Y781	0,04	Transmembrane protein KIAA1109 (Fragment)	1,98

Tablo 6. 12. Kontrollerin Uyku Öncesinde Alınan Plazma Örneklerinin Uyku Sonrasına Göre Fazla Bulunan Proteinleri ve Bu Proteinlerin p Değeri ve Maksimum Katlanma Değişimleri

Erişim Numarası	<i>p</i> değeri	Protein ismi	Max Katlama değişimi
1. C9J7L7	0,00	Glutamate-rich protein 6 (Fragment)	1,44
2. P57740	0,00	Nuclear pore complex protein Nup107	2,00
3. A0A5S6RJB7	0,00	Receptor protein-tyrosine kinase (Fragment)	1,54
4. Q8N9V7	0,00	Protein TOPAZ1	1,68
5. P08253	0,02	72 kDa type IV collagenase	1,48
6. Q502W6	0,02	von Willebrand factor A domain- containing protein 3B	1,69
7. A0A5F9ZHJ2	0,02	Non-specific protein-tyrosine kinase	1,75
8. A0A087WTU7	0,03	Dystrophin	16,85
9. D6RIG3	0,03	Deoxycytidylate deaminase	2,03
10. P07737	0,03	Profilin-1	1,45
11. X6RCW6	0,03	N-terminal EF-hand calcium-binding protein 3 (Fragment)	1,43

Tablo 6. 13. Kontrollerin Uyku Sonrasında Alınan Plazma Örneklerinin Uyku öncesine Göre Fazla Bulunan Proteinleri ve Bu Proteinlerin p Değeri ve Maksimum Katlanma Değişimleri

Erişim Numarası	<i>p</i> değeri	Protein ismi	Max Katlama değişimi
1. I3L2X4	0,00	Sex hormone-binding globülin	1,42
2. Q9BYV9	0,00	Transcription regulator protein BACH2	3,12
3. P04180	0,00	Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase	1,95
4. A0A0A0MR22	0,01	Phospholipid-transporting ATPase	1,42
5. Q5VW36	0,02	Focadhesin	1,54
6. O75460	0,02	Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease IRE1	1,64
7. A0A494C1F8	0,03	Pro-neuregulin-1, membrane-bound isoform	2,55
8. A0A7I2YQE9	0,03	Acyl-CoA-binding domain- containing protein 5	3,18
9. P18206	0,04	Vinculin	1,55
10. A0A2R8Y5P7	0,04	Histidine--tRNA ligase	7,63

Tablo 6. 14. Alzheimer Hastalarının Uyku Öncesinde Alınan Plazma Örneklerinin Uyku sonrasında Göre Fazla Bulunan Proteinleri ve Bu Proteinlerin p Değeri ve Maksimum Katlanma Değişimleri

Erişim Numarası	p değeri	Protein ismi	Max Katlama değışımi
1. Q8N859	0,00	Zinc finger protein 713	2,02
2. A0A7I2Y1C3	0,00	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma	1,53
3. P53618	0,00	Coatomer subunit beta	1,40
4. Q8N7Z5	0,00	Ankyrin repeat domain-containing protein 31	3,38
5. Q7L311	0,01	Armadillo repeat-containing X-linked protein 2	16,63
6. A0A087WWN1	0,02	Coiled-coil domain-containing protein 122 (Fragment)	5,02
7. F8VRK9	0,02	Sulfite oxidase, mitochondrial (Fragment)	1,47
8. K7EJ87	0,03	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1	1,52
9. A0A0U1RQJ2	0,04	Dystonin	1,44

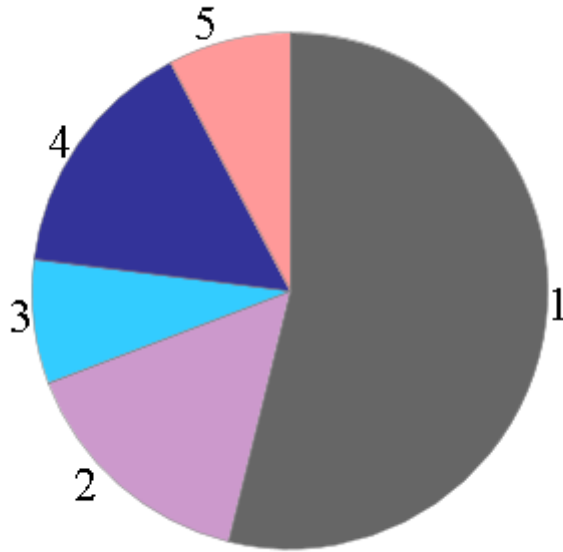
Tablo 6. 15. Alzheimer Hastalarının Uyku Sonralarının Uyku Öncesine Göre Fazla Bulunan Proteinler Ve Proteinlerin p Değeri ve Maksimum Katlanma Değişimleri

Erişim Numarası	<i>p</i> değeri	Protein ismi	Max Katlama değışımi
1. A0A0B4J278	0,00	Alpha-1-antitrypsin (Fragment)	1,73
2. A4UGR9	0,01	Xin actin-binding repeat-containing protein 2	2,07
3. C9J7L7	0,01	Glutamate-rich protein 6 (Fragment)	1,53
4. P08253	0,01	72 kDa type IV collagenase	1,71
5. P37802	0,03	Transgelin	1,88
6. O75038	0,04	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase eta-2	1,43
7. P40121	0,04	Macrophage-capping protein	1,50
8. C9JYA4	0,04	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12 (Fragment)	2,25
9. O95267	0,04	RAS guanyl-releasing protein 1	2,30

6.7.1 LC-MS/MS ile yapılan plazma protein analizlerinin panther sınıflandırma sistemi ile analiz edilmesi

6.7.1.1 Alzheimer hastalarının yaşlı sağlıklı kontrollere göre fazla bulunan uyku sonrası plazma protein sonuçlarının PANTHER sınıflandırma sistemi ile analiz edilmesi

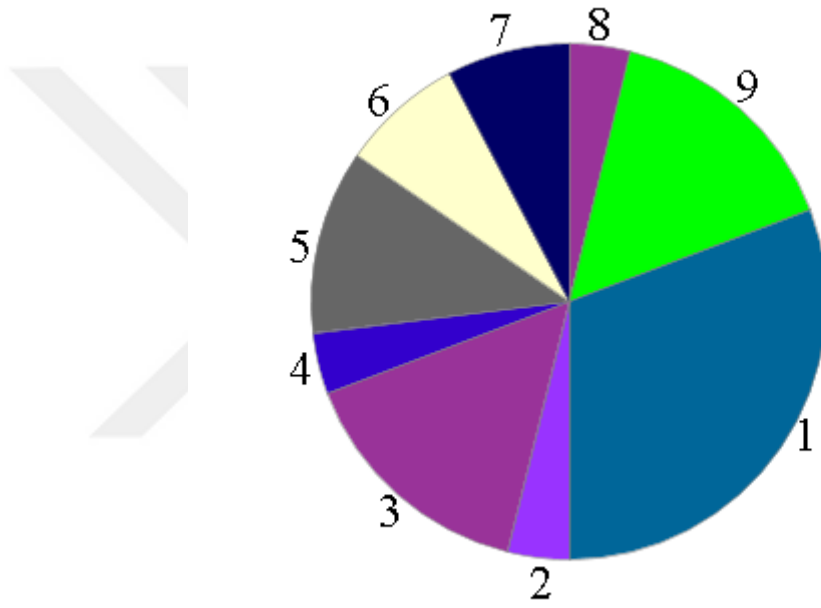
Protein analizleri sonucunda Alzheimer hastalarının kontrollere göre yüksek çıkan uyku sonrası plazma proteinlerinde PANTHER sınıflandırma sistemi ile moleküler fonksiyonları (Şekil 6.15), biyolojik süreç (Şekil 6.16), protein sınıflandırmaları (Şekil 6.17) ve pathway (yolak) (Şekil 6.18) analizleri gerçekleştirilmiştir. Buna göre moleküler fonksiyonlarında ilgili proteinlerin daha çok bağlanma (%53.8), moleküler fonksiyon düzenleme (%15.4), katalitik aktivitesi (%15.4), moleküler transdüksiyonel aktivite (%7.7) ve moleküler adaptör aktivitesinde görevli oldukları izlenmektedir.



1)Bağlanma 2) Katalitik Aktivitesi. 3) Moleküler Adaptör Aktivitesi.4) Moleküler Fonksiyon Düzenleme. 5) Moleküler Transdüksiyonel Aktivite

Şekil 6. 15. Alzheimer Hastalarının Kontrollere Göre Yüksek Çıkan Uyku Sonrası Plazma Proteinlerinde PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Moleküler Fonksiyonları

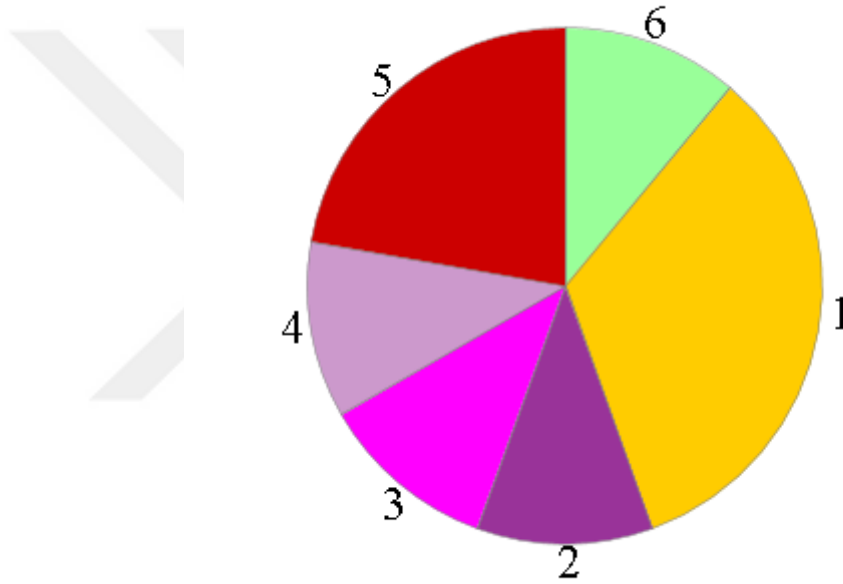
Biyolojik süreçlerin analizlerine baktığımızda (Şekil 6.16) proteinlerin yaygın olarak hücresel süreçler (% 30.8), lokalizasyon (%15.4) ve biyolojik regülasyonda (%15.4) bu proteinlerin yer aldığı görülmektedir. Bunun yanı sıra türler arasında etkileşimde yer alan biyolojik süreç, uyarana tepki, hareket, metabolik ve bağışıklık sistemi sürecinde sınıflandırıldığı izlenmektedir.



1) Hücresel Süreçler. 2) Bağışıklık Sistemi Süreci.3) Lokalizasyon. 4)Hareket. 5)Metabolik Süreç. 6) Uyarana Tepki. 7) Sinyalleme 8) Biyolojik Süreç. 9)Biyolojik Düzenleme

Şekil 6. 16. Alzheimer Hastalarının Kontrollere Göre Yüksek Çıkan Uyku Sonrası Plazma Proteinlerinde Panther Sınıflandırma Sistemi ile Biyolojik Süreçleri.

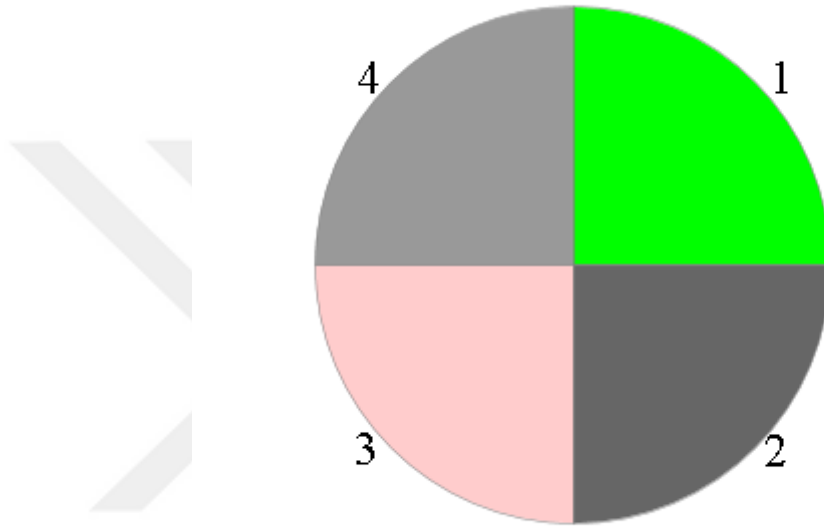
Protein sınıflandırma analizlerinde daha yaygın bir şekilde sitoskeletal protein (%33.3) ve destek/adaptör proteini (%22.2) olarak görev alırken bir diğer kısımda da hücre içi sinyal molekülü, protein modifiye edici enzim, RNA metabolizması protein ve membran traffic proteini olarak ayrıca sınıflandırılmıştır.



1) Sitoskeletal Protein.2) Hücre içi Sinyal Molekülü. 3) Membran Traffic Proteini. 4) Protein Modifiye Edici Enzim. 5) Destek/Adaptör Protein. 6) RNA Metabolizma Proteini

Şekil 6. 17. Alzheimer Hastalarının Kontrollere Göre Yüksek Çıkan Uyku Sonrası Plazma Proteinlerinde Panther Sınıflandırma Sistemi İle Protein Sınıflandırılması

Pathway analizinde eşit dağılım olarak çentik sinyal yolak (%25), Huntington hastalığı (%25), Rho GTPaz ile sitoskelet regülasyonu (%25) ve son olarak Alzheimer hastalığı-amiloid sekretaz yolu (%25) sınıflandırılmıştır.

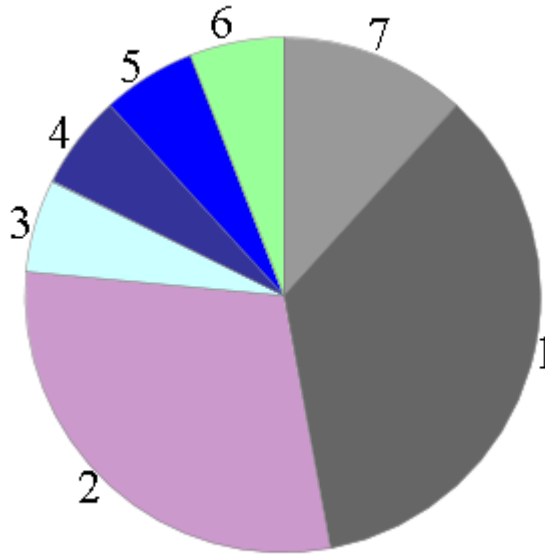


1) Alzheimer Hastalığı-Amiloid Sekretaz Yolu. 2) Rho Gtpaz İle Sitoskelet Regülasyonu. 3) Huntington Hastalığı. 4) Çentik Sinyal Yolak

Şekil 6. 18. Alzheimer Hastalarının Kontrollere Göre Yüksek Çıkan Uyku Sonrası Plazma Proteinlerinde Panther Sınıflandırma Sistemi İle Yolak Analizleri.

6.7.1.2 Yaşlı sağlıklı kontrollerin Alzheimer hastalarına göre fazla bulunan uyku sonrası plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile analiz edilmesi

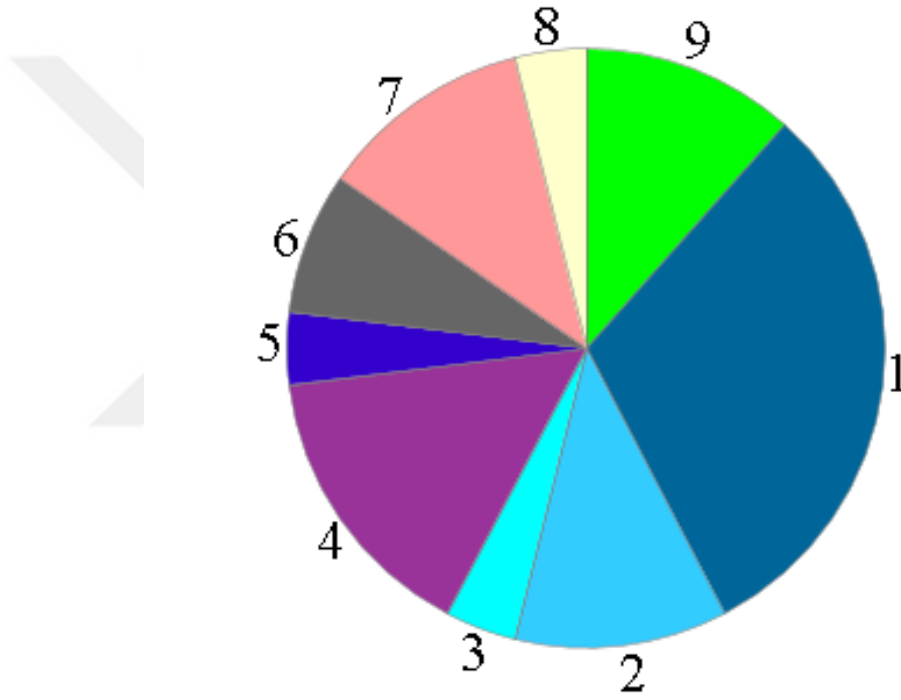
Protein analizleri sonucunda yaşlı sağlıklı kontrollerin Alzheimer hastalarına göre yüksek çıkan Uyku sonrası proteinlerinde PANTHER sınıflandırma sistemi ile moleküler fonksiyonları (Şekil 6.19), pathway (yolakları) (Şekil 6.22), biyolojik süreç (Şekil 6.20), ve protein sınıflandırmaları (Şekil 6.21), analizleri gerçekleştirilmiştir. Buna göre moleküler fonksiyonlarında ilgili proteinlerin daha çok bağlanma (%35.3) ve katalitik aktivitesi (%29.4) bunun yanında transkripsiyon regülatörü aktivitesi, ATP'ye bağlı aktivite, fonksiyon regülatörü, sitoskeletal motor aktivitesi ve taşıyıcı aktivitede görevli oldukları görülmüştür.



1) Bağlanma. 2) Katalitik Aktivite. 3) Sitoskeletal Motor Aktivite. 4) Moleküler Fonksiyon Düzenleme. 5) Transkripsiyon Regülatör Aktivite 6) Taşıyıcı Aktivite 7) ATP'ye Bağlı Aktivite

Şekil 6. 19.Yaşlı Sağlıklı Kontrollerin Alzheimer Hastalarına Göre Yüksek Çıkan Uyku Sonrası Proteinlerinde PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Moleküler Fonksiyonları.

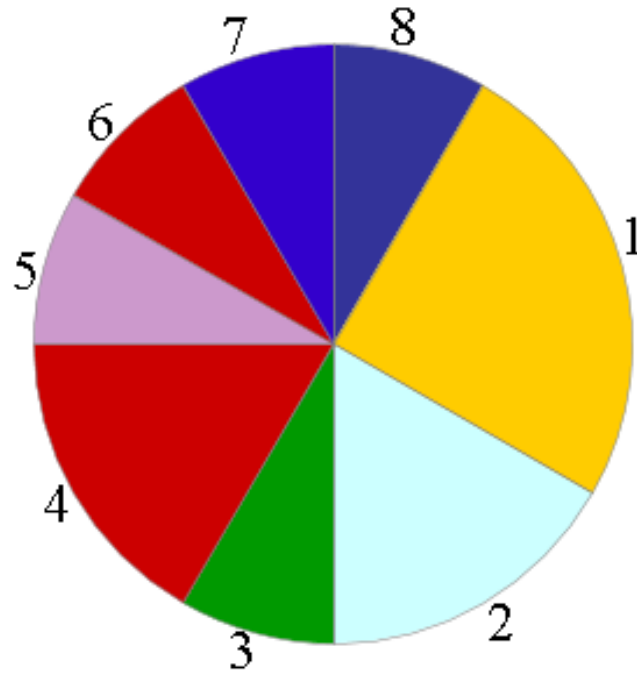
Biyolojik süreçlerin analizlerine baktığımızda proteinlerin yaygın olarak hücrel süreçler (% 30.8), ve lokalizasyonda (% 15.4) ve bir diğer kısmı da biyolojik regülasyonda (%11.5), uyarana tepki, gelişimsel süreç, çok hücreli organizma süreci, hareket, metabolik süreç ve büyümede başlıkları altında sınıflandırıldığı izlenmektedir.



1) Hücrel Süreç 2) Gelişimsel Süreç 3) Büyüme 4) Lokalizasyon 5) Hareket 6) Metabolik Süreç 7) Çok Hücreli Organizma Süreci 8) Uyarana Tepki 9) Biyolojik Düzenleme

Şekil 6. 20. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerin Alzheimer Hastalarına Göre Yüksek Çıkan Uyku Sonrası Proteinlerinde PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Biyolojik Süreçleri

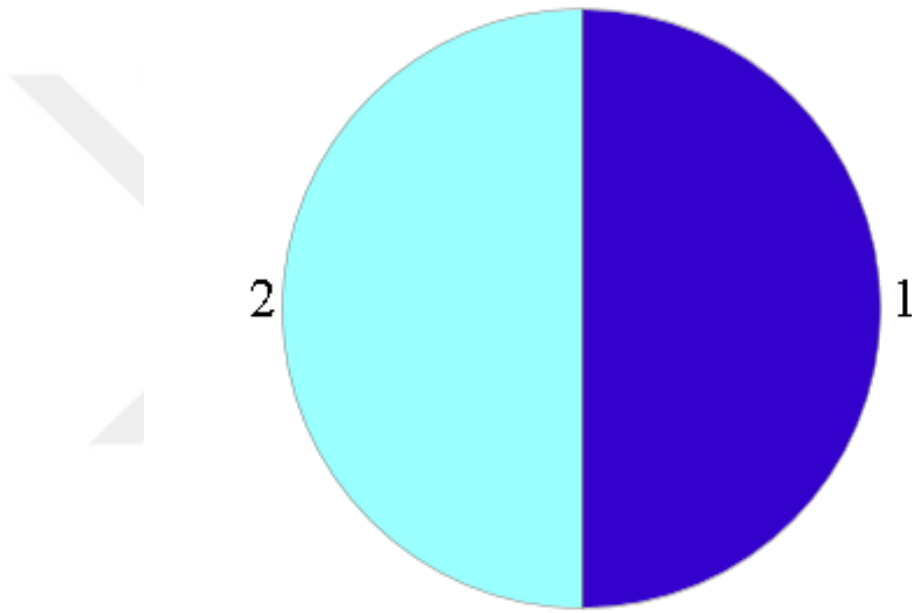
Protein sınıflandırma analizlerinde daha yaygın bir şekilde sitoskeletal protein (%25) metabolit interkonversiyon enzimi (%16.7) ve hücre dışı matriks proteini (%16.7) görev alır. Diğerleri kalsiyum bağlayıcı protein, destek/adaptör proteini, taşıyıcı, gen-spesifik transkripsiyonel düzenleyici, protein modifiye edici enzim olarak sınıflandırılmıştır.



1) Sitoskeletal Protein 2) Hücre Dışı Matriks Proteini 3) Gen-Spesifik Transkripsiyonel Düzenleyici 4) Metabolit İnterkonversiyon Enzimi 5) Protein Modifiye Edici Enzim 6) Destek/Adaptör Proteini 7) Taşıyıcı 8) Kalsiyum Bağlayıcı Protein

Şekil 6. 21. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerin Alzheimer Hastalarına Göre Yüksek Çıkan Uyku Sonrası Proteinlerinde PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Protein Sınıflandırılması.

Yaşlı sağlıklı kontrollerin Alzheimer hastalarına göre yüksek çıkan uyku sonrası proteinlerinde PANTHER sınıflandırma sistemi ile pathway analizinde eşit dağılım olarak integrin sinyal yolu (%50) ve kan koagülasyonu (%50) sınıflandırılmıştır.

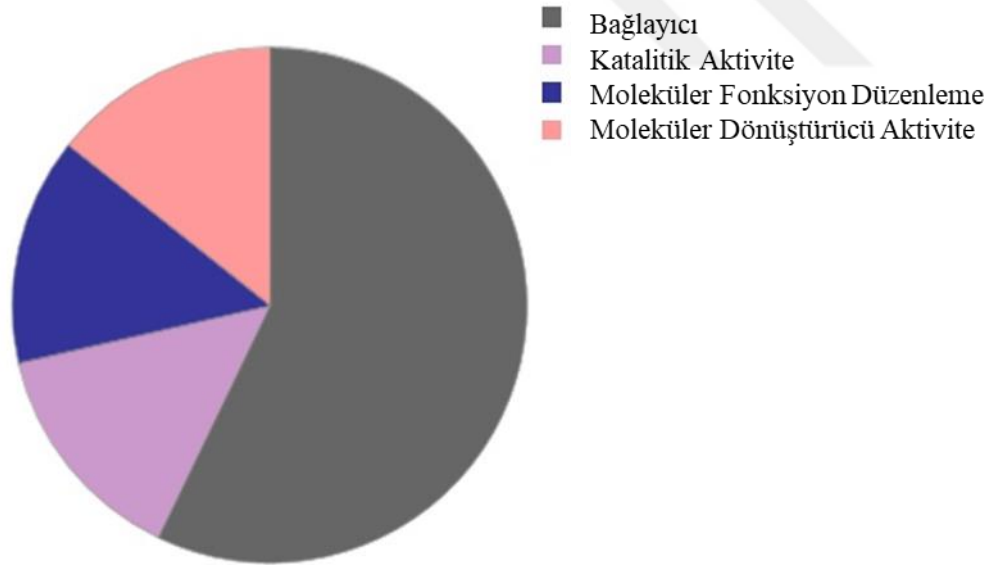


1) Kan Koagülasyonu 2) İntegrin Sinyal Yolu

Şekil 6. 22. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerin Alzheimer Hastalarına Göre Yüksek Çıkan Uyku Sonrası Proteinlerinde PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Yolak Analizleri.

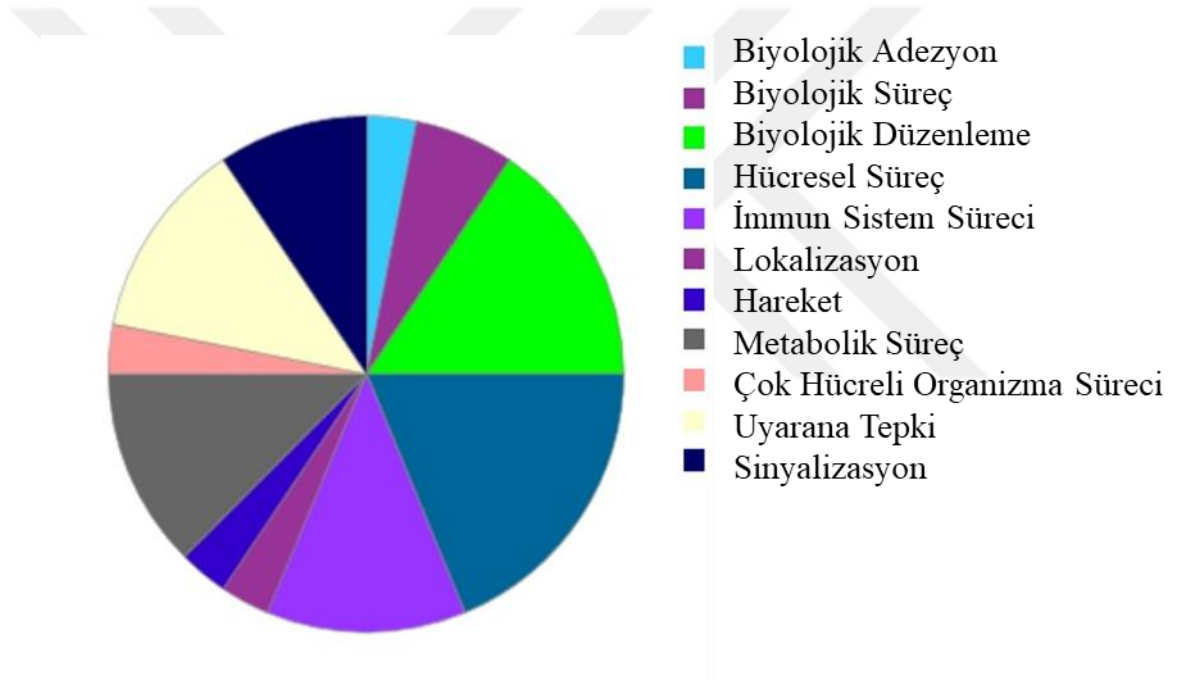
6.7.1.3. Alzheimer hastalarının yaşlı sağlıklı kontrollere göre fazla bulunan uyku öncesi plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile analiz edilmesi

Protein analizleri sonucunda Alzheimer hastalarının yaşlı sağlıklı kontrollere göre yüksek çıkan uyku öncesi plazma proteinlerinde PANTHER sınıflandırma sistemi ile moleküler fonksiyonları (Şekil 6.23), biyolojik süreç (Şekil 6.24), protein sınıflandırmaları (Şekil 6.25) ve pathway (yolak) (Şekil 6.26) analizleri gerçekleştirilmiştir. Buna göre moleküler fonksiyonlarında ilgili proteinlerin (Tablo 6.10) daha çok bağlayıcı ve geri kalanında yaklaşık eşit olarak moleküler fonksiyon düzenleme, katalitik aktivitesi ve moleküler dönüştürücü aktivitesinde görevli oldukları izlenmektedir.



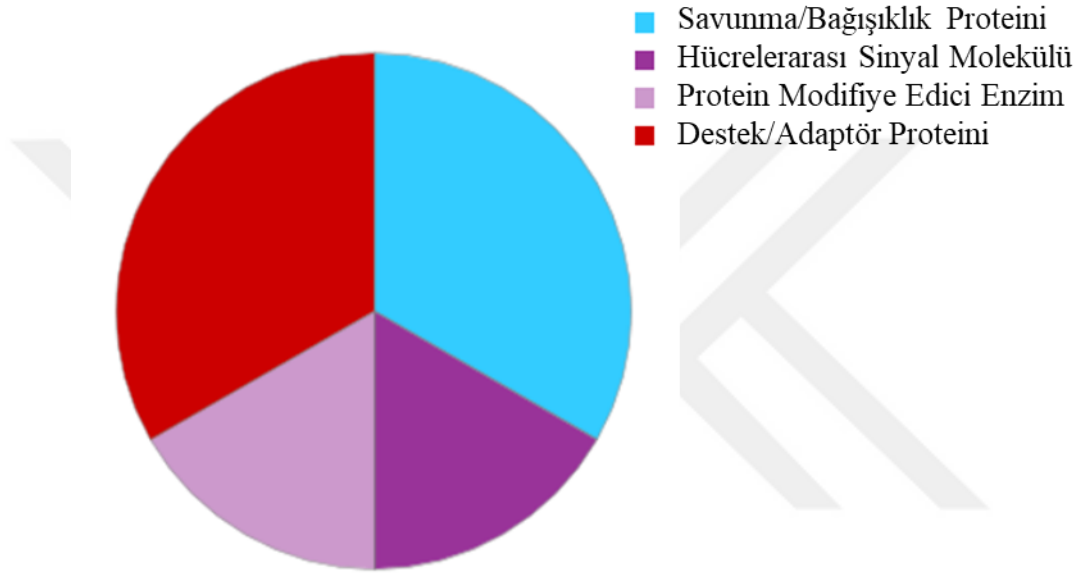
Şekil 6. 23. Alzheimer Hastalarının Yaşlı Sağlıklı Kontrollere Göre Fazla Bulunan Uyku Öncesi Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi İle Moleküler Fonksiyonları

Alzheimer hastalarının yaşlı sağlıklı kontrollere göre yüksek çıkan uyku öncesi plazma proteinlerinde PANTHER sınıflandırma sistemi ile biyolojik süreçlerin analizlerine baktığımızda proteinlerin yaygın olarak hücresel süreç ve biyolojik düzenlemede rol aldıklarını bunu izleyen diğer süreçlerde, uyarana tepki, immün sistem süreci, sinyalizasyon, metabolik süreç, lokalizasyon, biyolojik adezyon, hareket ve çok hücreli organizma sürecinde yer aldığı görülmektedir.



Şekil 6. 24. Alzheimer Hastalarının Yaşlı Sağlıklı Kontrollere Göre Fazla Bulunan Uyku Öncesi Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Biyolojik Süreçleri

Protein sınıflandırma analizlerinde daha yaygın bir şekilde savunma/bağıışıklık protein ve destek/adaptör proteini olarak görev alırken bir diğerk kısımda da hücrelerarası sinyal molekölü ve protein modifiye edici enzim olarak ayrıca sınıflandırılmıştır.



Şekil 6. 25. Alzheimer Hastalarının Yaşlı Sağlıklı Kontrollere Göre Fazla Bulunan Uyku Öncesi Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Protein Sınıflandırması

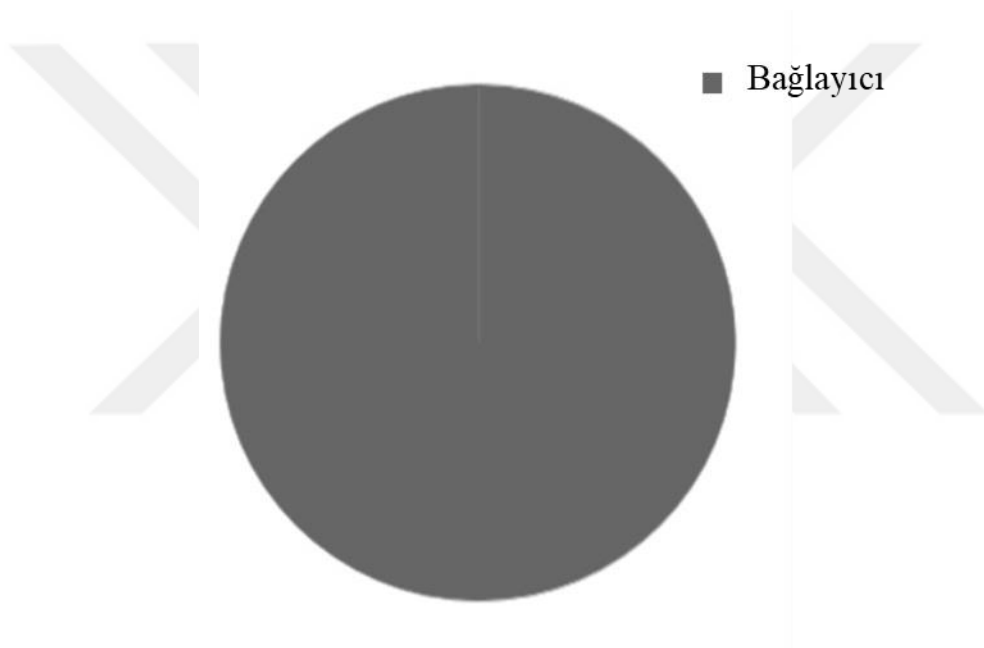
Alzheimer hastalarının yaşı sağlıklı kontrollere göre fazla bulunan uyku öncesi plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile yolak Analizi T hücre aktivasyonu sınıflandırılmıştır.



Şekil 6. 26. Alzheimer Hastalarının Yaşlı Sağlıklı Kontrollere Göre Fazla Bulunan Uyku Öncesi Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Yolak Analizi

6.7.1.4. Yaşlı sağlıklı kontrollerin Alzheimer hastalarına göre fazla bulunan uyku öncesi plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile analiz edilmesi

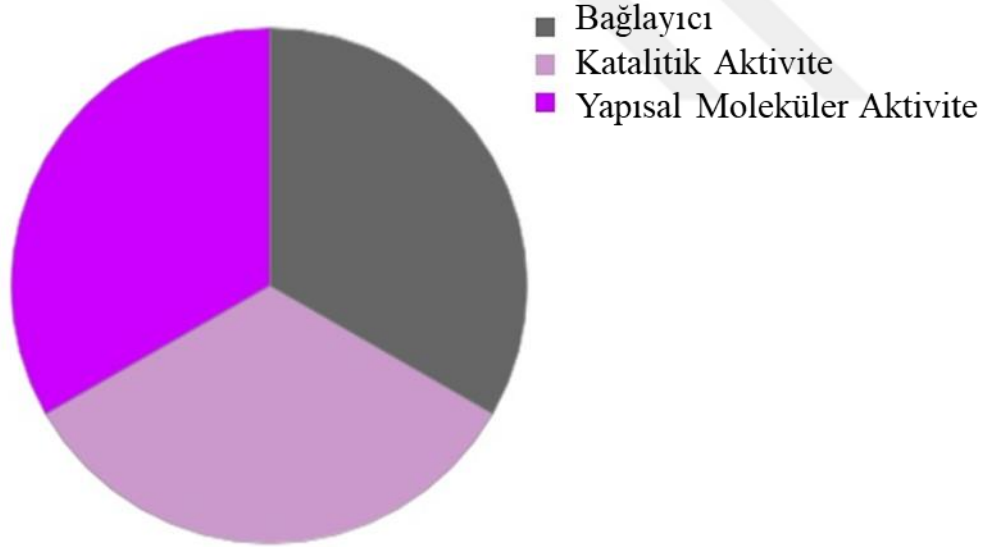
Yaşlı sağlıklı kontrollerin Alzheimer hastalarına göre fazla bulunan uyku öncesi plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sisteminde veritabanı sadece moleküler fonksiyonlar için sınıflandırma (Şekil 6.27) verisi saptamıştır. Buna göre moleküler fonksiyonlarında ilgili proteinlerin (Tablo) daha çok bağlayıcı görevinde oldukları izlenmektedir.



Şekil 6. 27. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerin Alzheimer Hastalarına Göre Fazla Bulunan Uyku Öncesi Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Moleküler Fonksiyonları

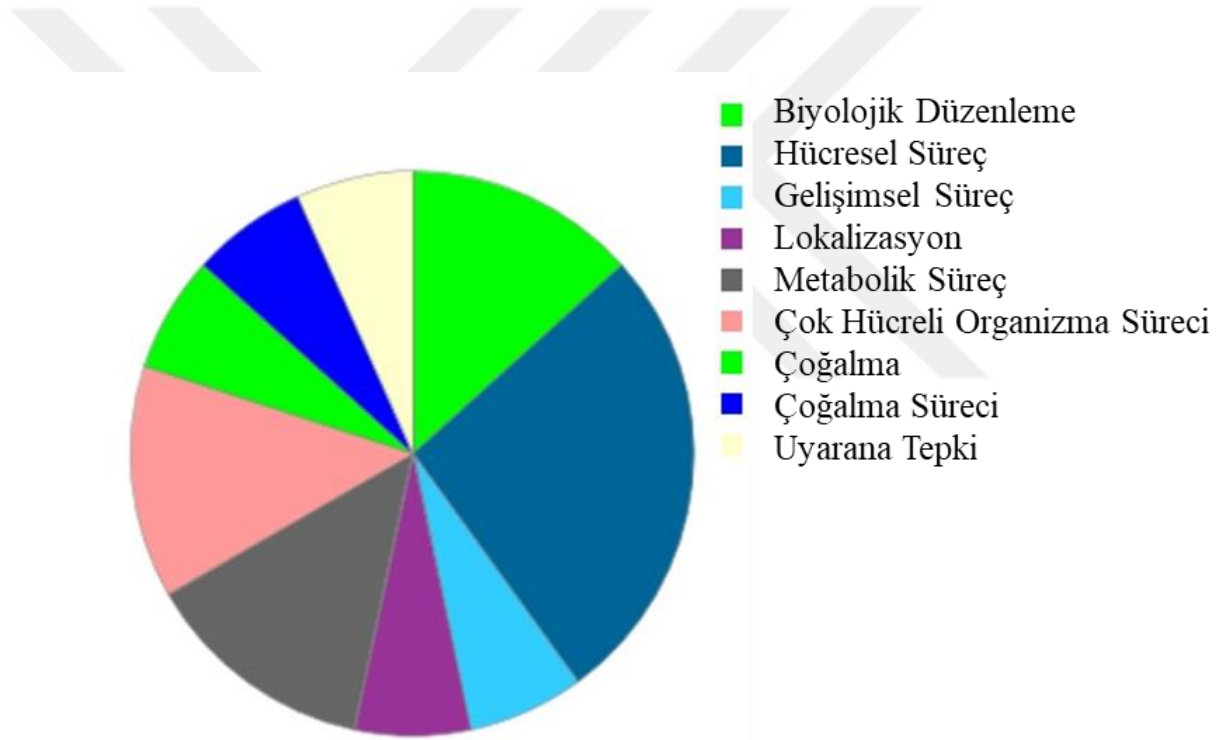
6.7.1.5. Yaşlı sağlıklı kontrollerde Uyku öncesinin uyku sonrasına göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile analiz edilmesi

Protein analizleri sonucunda yaşlı sağlıklı kontrollerde uyku öncesinin uyku sonrasına göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile moleküler fonksiyonları (Şekil 6.28), biyolojik süreç (Şekil 6.29), protein sınıflandırmaları (Şekil 6.30) ve pathway (yolak) (Şekil 6.31) analizleri gerçekleştirilmiştir. Buna göre moleküler fonksiyonlarında ilgili proteinlerin bağlayıcı, yapısal moleküler aktivite ve katalitik aktivitesinde görevli oldukları izlenmektedir.



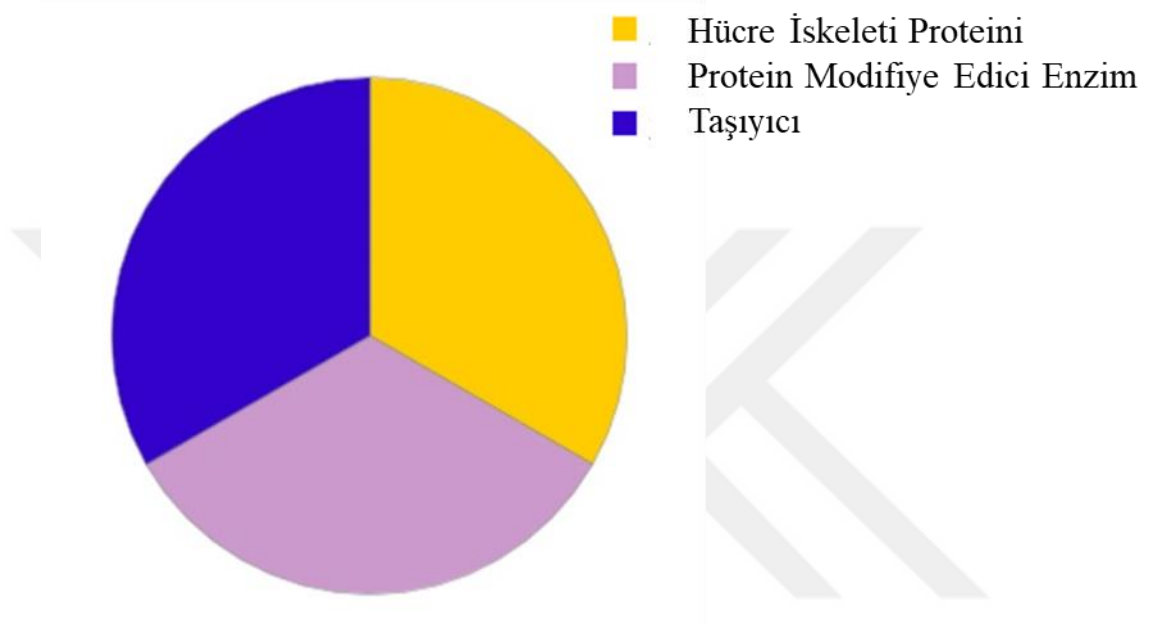
Şekil 6. 28. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerde Uyku Öncesinde Uyku Sonrasına Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi İle Moleküler Fonksiyonları

Yaşlı sağlıklı kontrollerde uyku öncesinde uyku sonrasına göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile biyolojik süreçlerin analizlerine baktığımızda proteinlerin yaygın olarak çoğalma süreci, çok hücreli organizma süreci, biyolojik düzenlemede rol aldıklarını bunu izleyen diğer süreçlerde, uyarana tepki, immun sistem süreci, sinyalizasyon, metabolik süreç, lokalizasyon, biyolojik adezyon, hareket ve çok hücreli organizma sürecinde yer aldığı görülmektedir.



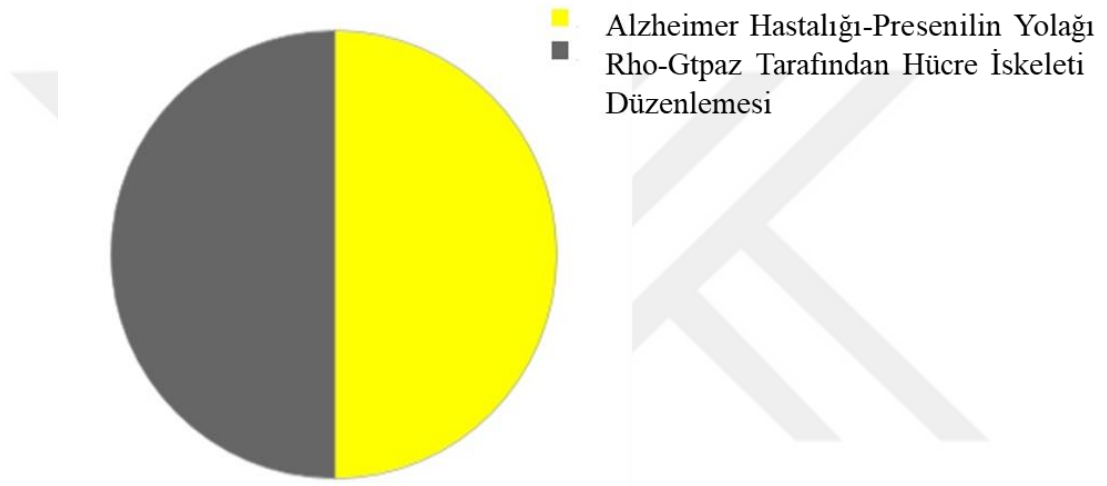
Şekil 6. 29. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerde Uyku Öncesinin Uyku Sonrasına Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi İle Biyolojik Süreçleri

Yaşlı sağlıklı kontrollerde uyku öncesinin uyku sonrasına göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile hücre iskeleti proteini, taşıyıcı ve protein modifiye edici enzim olarak sınıflandırılmıştır.



Şekil 6. 30. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerde Uyku Öncesinde Uyku Sonrasına Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi İle Protein Sınıflandırması

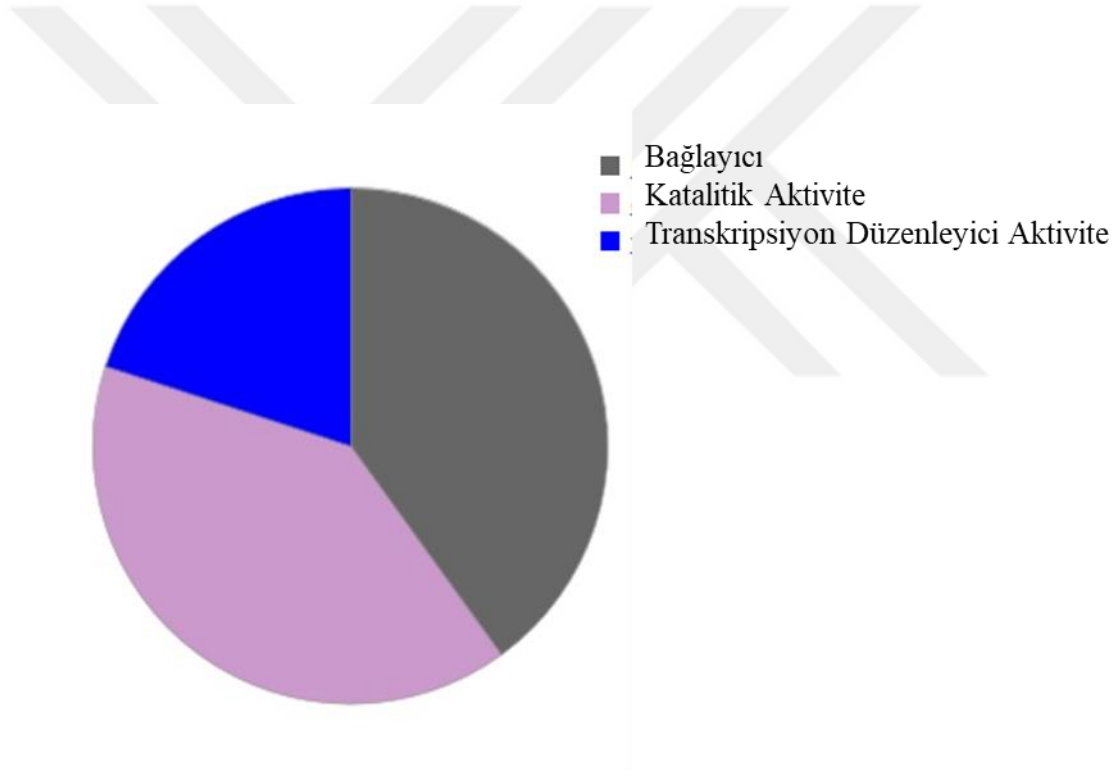
Yaşlı sağlıklı kontrollerde uyku öncesinde uyku sonrasına göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile yolak analizinde Alzheimer hastalığı-presenilin yolağı ve Rho-Gtpaz tarafından hücre iskeleti düzenleme yolakları ile sınıflandırılmıştır.



Şekil 6. 31. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerde Uyku Öncesinde Uyku Sonrasına Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi İle Yolak Analizi

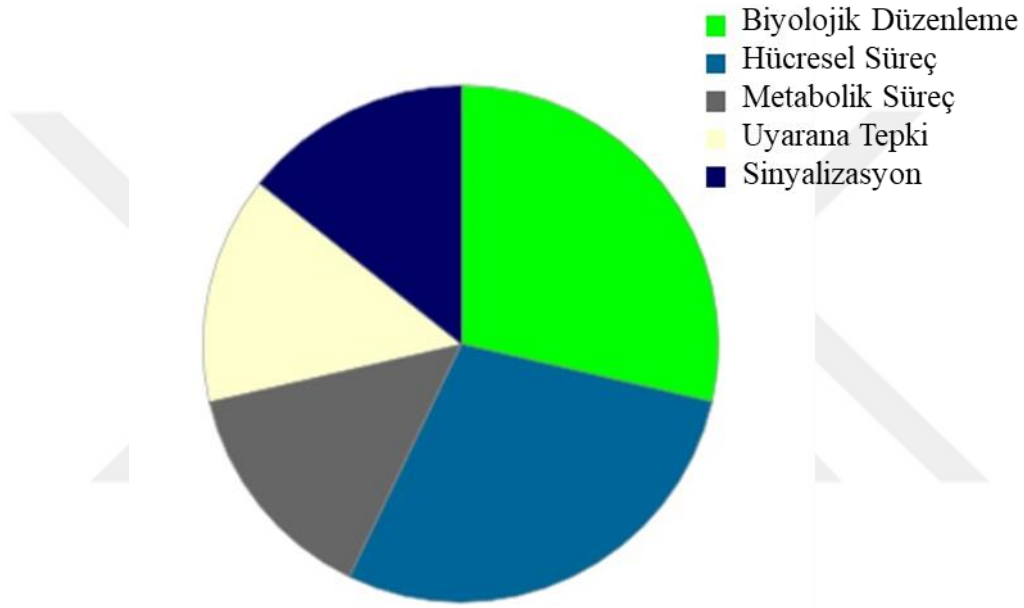
6.7.1.6. Yaşlı sağlıklı kontrollerde uyku sonrasında uyku öncesine göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile analiz edilmesi

Yaşlı sağlıklı kontrollerde Uyku sonrasında uyku öncesine göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile moleküler fonksiyonları (Şekil), biyolojik süreç (Şekil), protein sınıflandırmaları (Şekil) ve pathway (yolak) (Şekil) analizleri gerçekleştirilmiştir. Buna göre moleküler fonksiyonlarında ilgili proteinlerin daha çok bağlayıcı, katalitik aktivitesi ve transkripsiyon düzenleyici aktivitesinde görevli oldukları izlenmektedir.



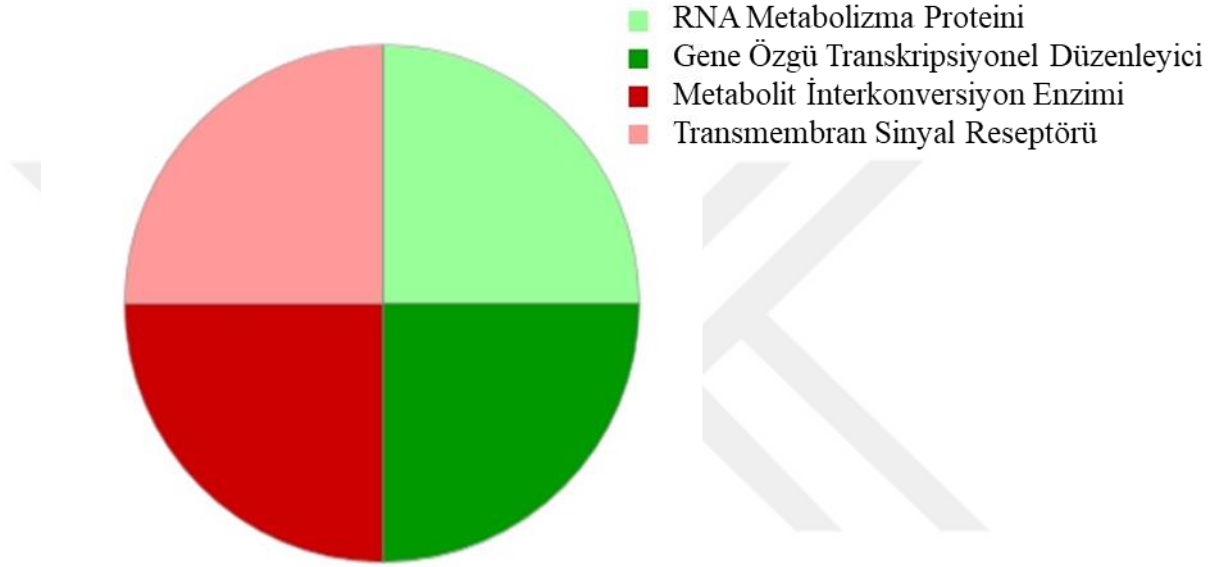
Şekil 6. 32. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerde Uyku Sonrasında Uyku Öncesine Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Moleküler Fonksiyonları

Yaşlı sağlıklı kontrollerde uyku sonrasında uyku öncesine göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile biyolojik süreçlerinde daha yaygın olarak biyolojik düzenleme ve hücresel süreçte diğerleri de metabolik süreç, uyarana tepki ve son olarak sinyalizasyonda sınıflandırıldığı izlenmektedir.



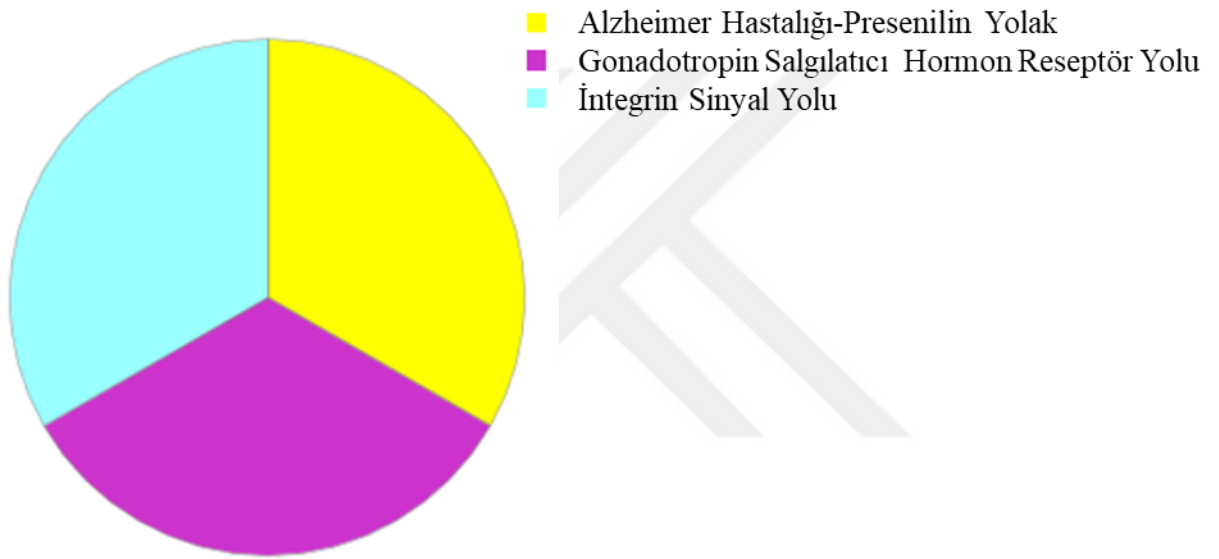
Şekil 6. 33. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerde Uyku Sonrasının Uyku Öncesine Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi İle Biyolojik Süreçleri

Yaşlı sağlıklı kontrollerde uyku sonrasında uyku öncesine göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile protein sınıflandırılmasında eşit oranda RNA metabolizma proteini, gene özgü transkripsiyonel düzenleyici, metabolit interkonversiyon enzimi ve son olarak transmembran sinyal reseptörü sınıflandırılmıştır.



Şekil 6. 34. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerde Uyku Sonrasında Uyku Öncesine Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Protein Sınıflandırılması

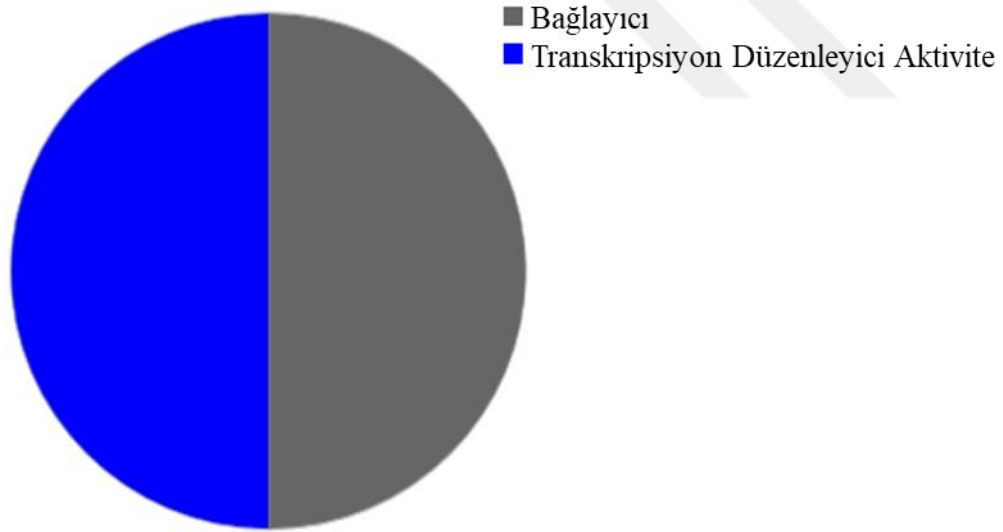
Yaşlı sağlıklı kontrollerde uyku sonrasında uyku öncesine göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile yolak analizinde Alzheimer hastalığı-presenilin yolak, gonadotropin salgılatıcı hormon reseptör yolu ve integrin sinyal yolu saptanmıştır.



Şekil 6. 35. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerde Uyku Sonrasının Uyku Öncesine Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi İle Yolak Analizi

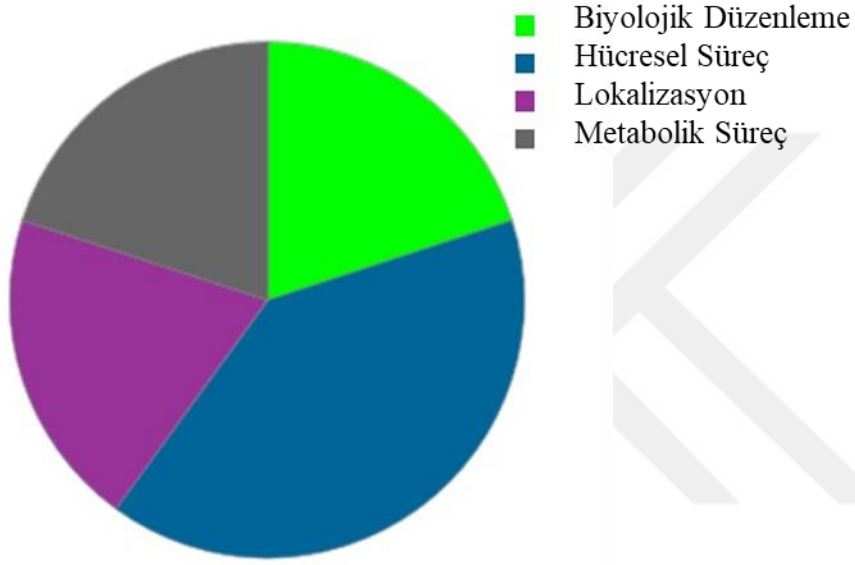
6.7.1.7. Alzheimer hastalarının uyku öncesinde uyku sonrasına göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile analiz edilmesi

Alzheimer hastalarının uyku öncesinde uyku sonrasına göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile analiz edilmesinde moleküler fonksiyonları (Şekil 6.36), biyolojik süreç (Şekil 6.37.), protein sınıflandırmaları (Şekil 6.38) analizleri gerçekleştirilmiştir. Yolak analizi bu grup plazma proteinleri için sınıflandırması oluşmamıştır. Buna göre moleküler fonksiyonlarında ilgili proteinlerin daha çok bağlayıcı ve transkripsiyon düzenleyici aktivitede görevli oldukları bulunmuştur.



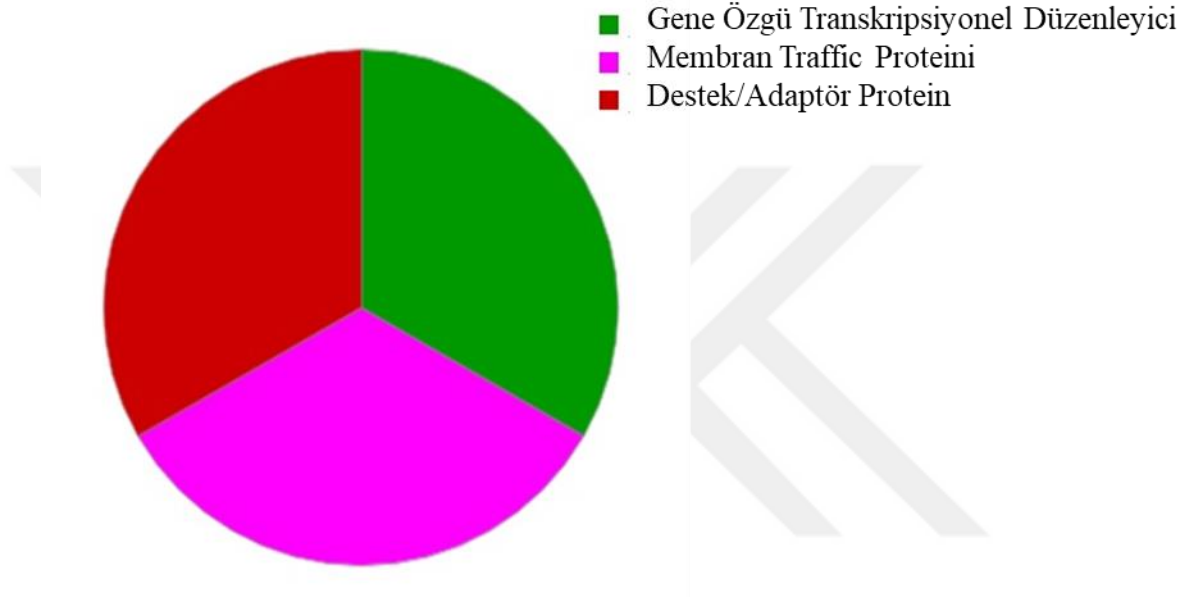
Şekil 6. 36. Alzheimer Hastalarının Uyku Öncesinde Uyku Sonrasına Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi İle Moleküler Fonksiyonları

Alzheimer hastalarının uyku öncesinde uyku sonrasına göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile biyolojik süreçlerinde en yaygın hücresel süreçlerde ve daha sonra biyolojik düzenleme, lokalizasyon ve metabolik süreçinde sınıflandırıldığı izlenmektedir.



Şekil 6. 37. Alzheimer Hastalarının Uyku Öncesinde Uyku Sonrasına Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Biyolojik Süreçleri

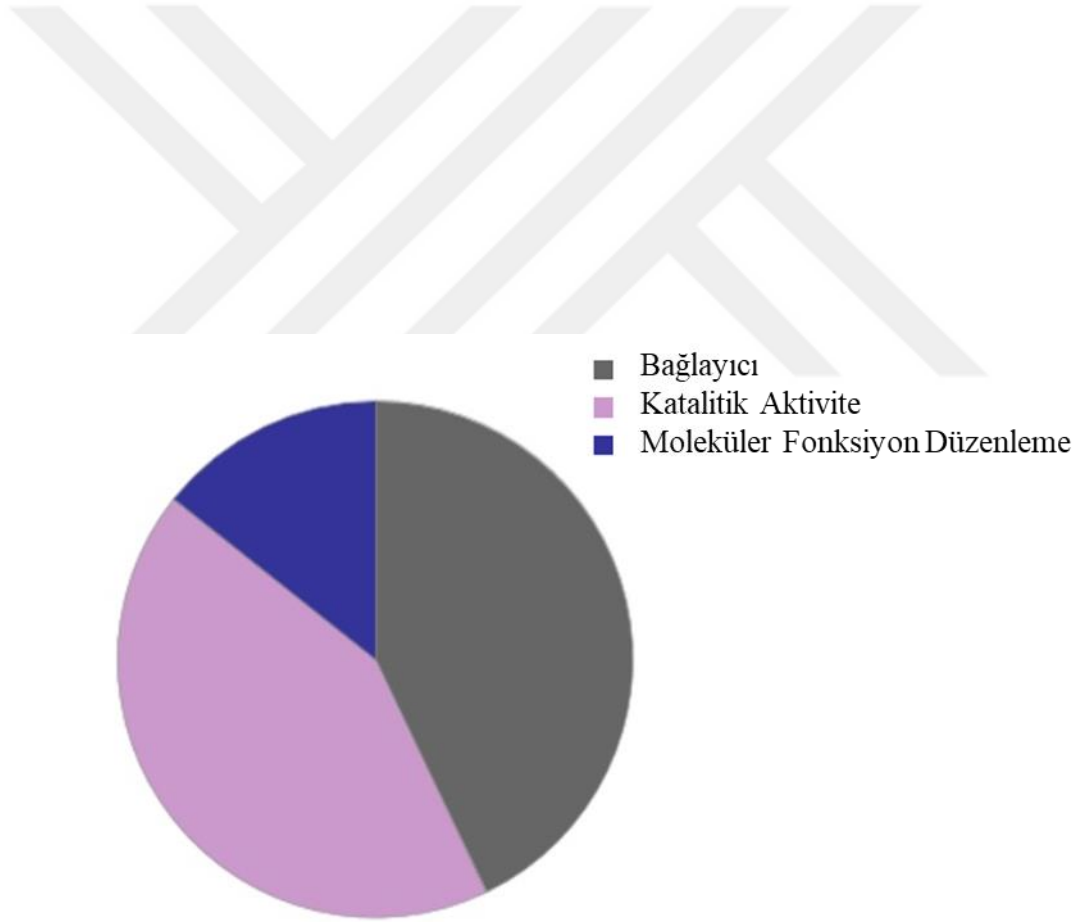
Alzheimer hastalarının uyku öncesinin uyku sonrasına göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile protein sınıflandırmasında gene özgü transkripsiyonel düzenleyici, membran trafik proteini ve destek/adaptör proteini saptanmıştır.



Şekil 6. 38. Alzheimer Hastalarının Uyku Öncesinin Uyku Sonrasına Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Protein Sınıflandırması

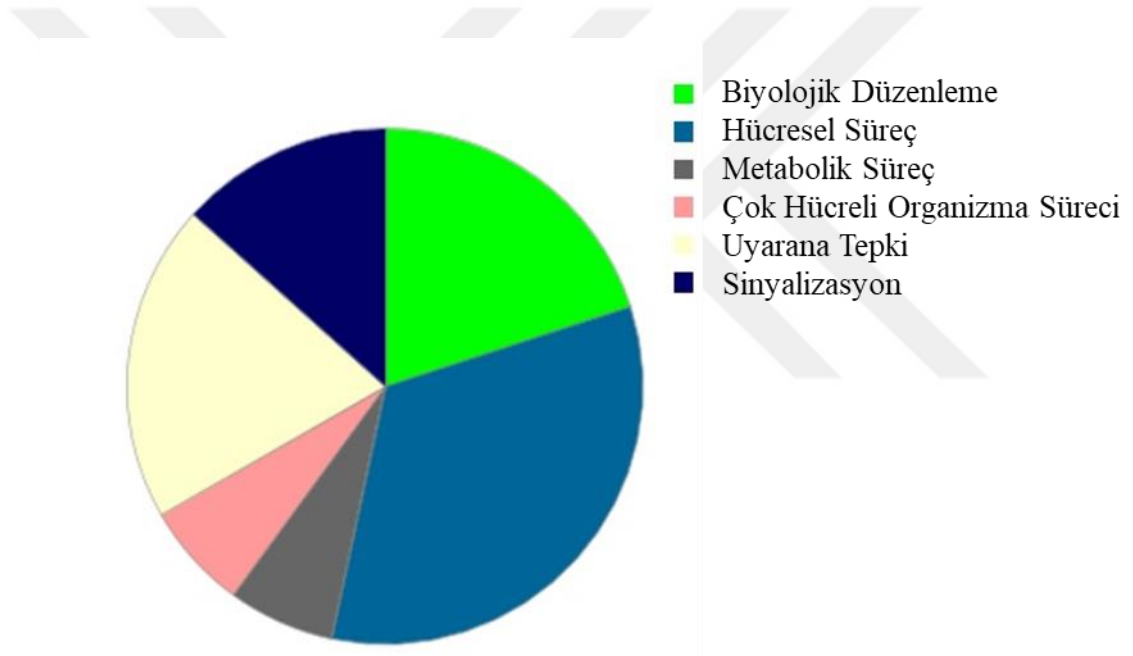
6.7.1.8. Alzheimer hastalarının uyku sonrasında uyku öncesine göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile analiz edilmesi

Alzheimer hastalarının uyku sonrasında uyku öncesine göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sisteminde moleküler fonksiyonları (Şekil 6.39), biyolojik süreç (Şekil 6.40), protein sınıflandırmaları (Şekil 6.41) ve pathway (yolak) (Şekil 6.42) analizleri gerçekleştirilmiştir. Buna göre moleküler fonksiyonlarında ilgili proteinlerin daha çok bağlayıcı ve katalitik aktivitesi ve kalanında moleküler fonksiyon düzenleme aktivitesinde görevli oldukları izlenmektedir.



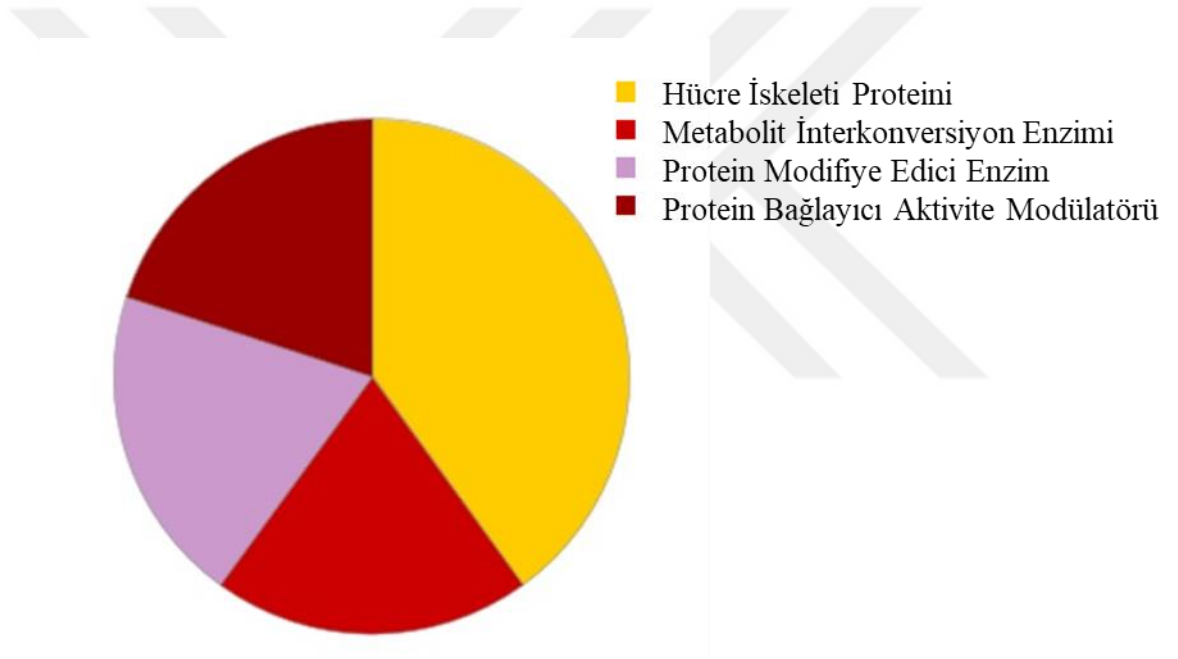
Şekil 6. 39. Alzheimer Hastalarının Uyku Sonrası Uyku Öncesine Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Moleküler Fonksiyonları

Alzheimer hastalarının uyku sonrası uyku öncesine göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile biyolojik süreçlerinde daha çok hücreyel süreç, biyolojik düzenleme ve uyarana tepki olarak sınıflandırılmış, kalanında da sinyalizasyon, çok hücreli organizma süreci ve metabolik süreç saptanmıştır.



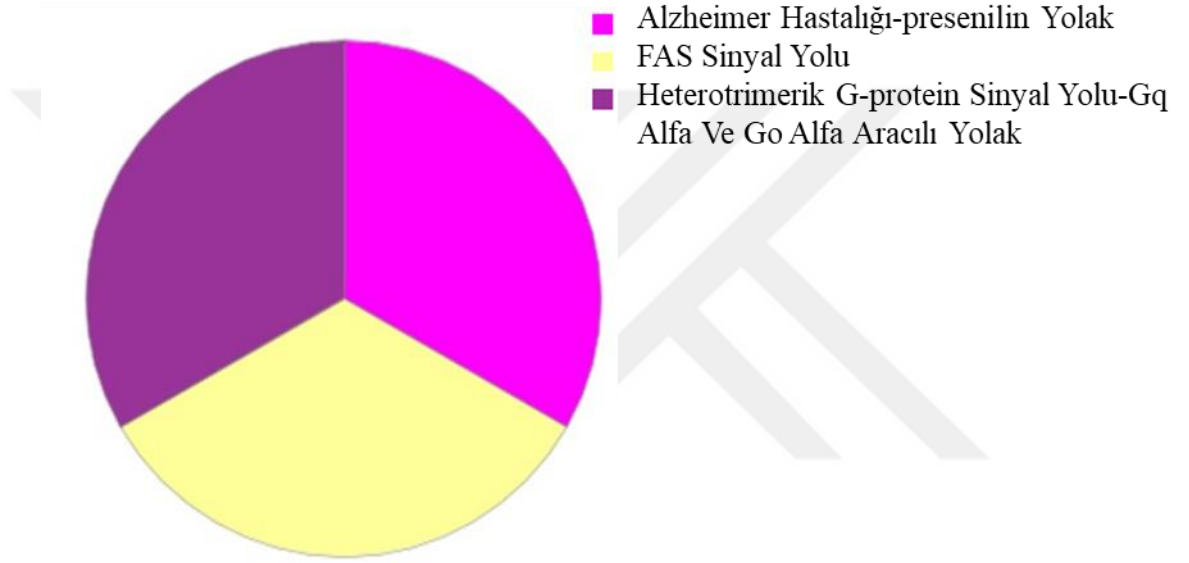
Şekil 6. 40. Alzheimer Hastalarının Uyku Sonrası Uyku Öncesine Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi İle Biyolojik Süreçleri

Alzheimer hastalarının Uyku sonrası uyku öncesine göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile protein sınıflandırılması hücre iskeleti proteinin yaygın olarak yer aldığı bunu metabolit interkonversiyon enzimi, protein modifiye edici enzim ve son olarak da protein bağlayıcı aktivite modikatörü izlemektedir.



Şekil 6. 41. Alzheimer Hastalarının Uyku Sonrası Uyku Öncesine Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile Protein Sınıflandırılması

Alzheimer hastalarının uyku sonrasında uyku öncesine göre fazla bulunan plazma protein analizlerinin PANTHER sınıflandırma sistemi ile yolak analizinde Alzheimer hastalığı-presenilin yolak, FAS sinyal yolu, heterotrimerik G-protein sinyal yolu Gq alfa ve Go alfa aracılı yolağı sınıflandırılmıştır.



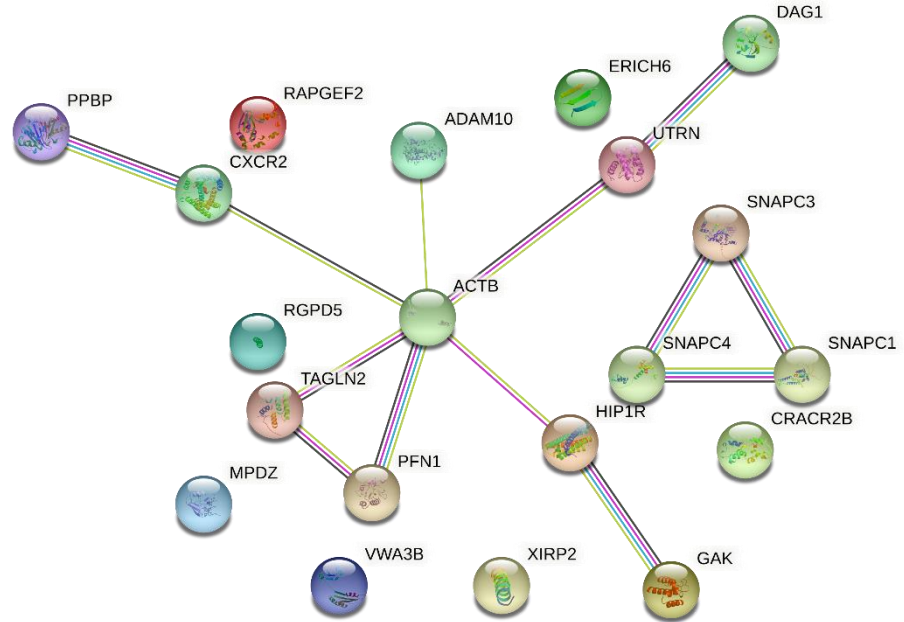
Şekil 6. 42. Alzheimer Hastalarının Uyku Sonrası Uyku Öncesine Göre Fazla Bulunan Plazma Protein Analizlerinin PANTHER Sınıflandırma Sistemi İle Yolak Analizi

6.7.2 STRING veritabanı ile protein-protein etkileşim analizi

Alzheimer ve kontrol gruplarının uyku öncesi ve sonrası alınan plazma örneklerinde Protein-protein etkileşimleri (PPI) hücrenin kontrolü, iletişimi, metaboliksel gelişimi gibi biyolojik süreçlerinin tayini STRING veritabanı kullanılarak analiz edilmiştir.

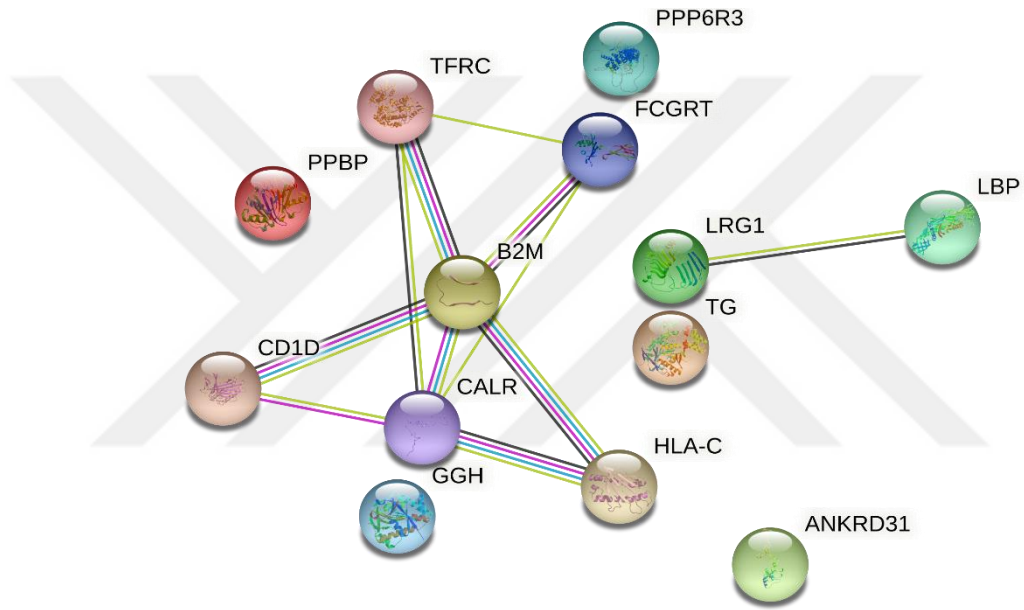
6.7.2.1 Alzheimer hastalarının yaşlı sağlıklı kontrollere göre uyku öncesi ve sonrası fazla bulunan plazma proteinlerinde STRING veritabanı kullanılarak protein-protein etkileşimi

Alzheimer hastalarının yaşlı sağlıklı kontrollere göre fazla bulunan uyku sonrası plazma proteinlerinde STRING veritabanı kullanılarak PPI zenginleştirilmiş p değeri (0.08) olarak bulunmuştur, (20 düğüm, ortalama yerel kümeleme katsayısı .453). Protein etkileşimleri açısından bu değer uyku sonrası alınan plazma proteinlerinde anlamlı etkileşim bulunmamıştır (Şekil 6.43).



Şekil 6. 43. Alzheimer Hastalarının Yaşlı Sağlıklı Kontrollere Göre Fazla Bulunan Uyku Sonrası Plazma Proteinlerinde STRING Veritabanı Kullanılarak Protein Protein Etkileşim Analizi

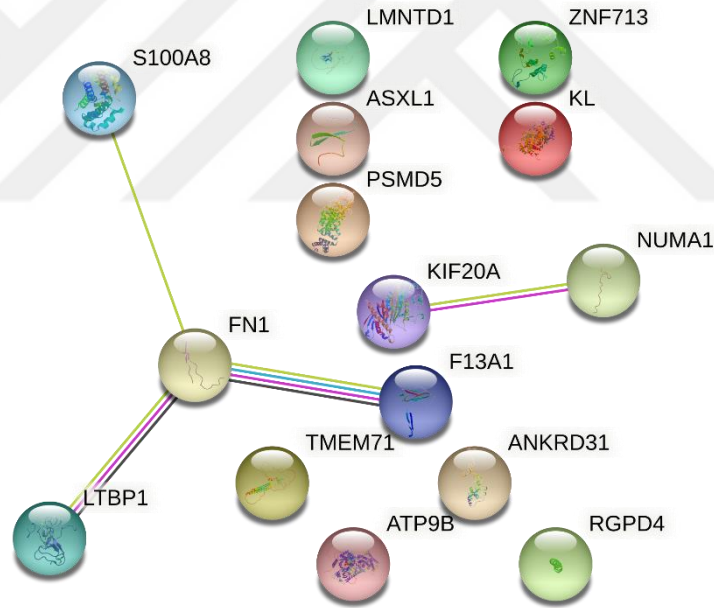
Alzheimer hastalarının uyku öncesi plazma proteinlerinin kontrollere göre STRING veritabanı kullanılarak PPI zenginleştirilmiş p değeri (0.051) olarak bulunmuştur, (13 düğüm, ortalama yerel kümeleme katsayısı .538). Protein etkileşimleri açısından bu değerin uyku öncesi alınan plazma proteinlerinde anlamlı etkileşim bulunmamış (Şekil 6.44) fakat LRG1 ve LBP arasında protein-protein etkileşimi gösterilmiştir.



Şekil 6. 44. Alzheimer Hastalarının Yaşlı Sağlıklı Kontrollere Göre Fazla Bulunan Uyku Öncesi Plazma Proteinlerinin STRING Veritabanı Kullanılarak Protein-Protein Etkileşimi

6.7.2.2 Yaşlı sağlıklı kontrollerin Alzheimer hastalarına göre uyku öncesi ve sonrası fazla bulunan plazma proteinlerinde STRING veritabanı kullanılarak protein-protein etkileşimi

Yaşlı sağlıklı kontrollerin Alzheimer hastalarına göre fazla bulunan uyku sonrası plazma proteinlerinde STRING veritabanı kullanılarak (Şekil 6.45) PPI zenginleştirilmiş p değeri (0.03) olarak bulunmuştur, (15 düğüm, ortalama yerel kümeleme katsayısı .333). Bu proteinlerin (Tablo 6.9) kendi aralarında, genomdan alınan aynı boyut ve derece dağılımındaki rastgele bir dizi protein için beklenenden fazla etkileşimde olduğunu göstermektedir. Böyle bir zenginleştirme, proteinlerin bir grup olarak en azından kısmen biyolojik olarak bağlı olduğunu gösterir.

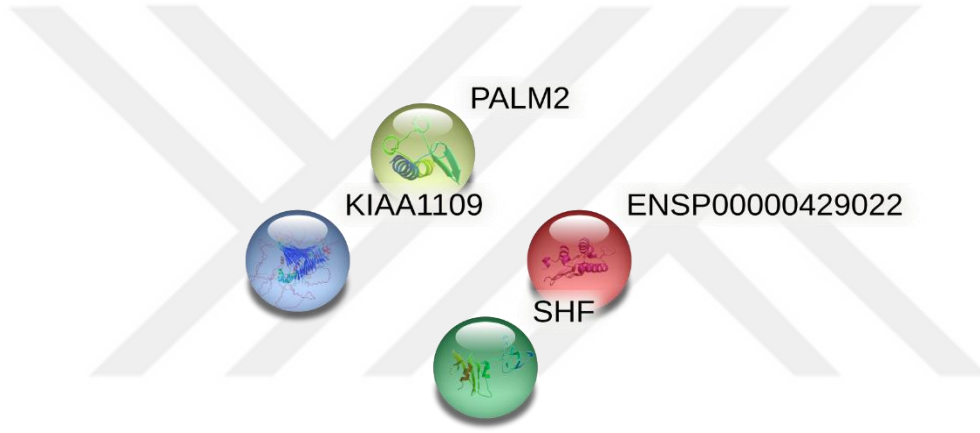


Şekil 6. 45. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerin Uyku Sonrası Plazma Proteinlerinde STRING Veritabanı Kullanılarak Protein-Protein Etkileşimi

STRING veri analizinde uyku sonrası plazma proteinlerinde yaşlı sağlıklı kontrollerin LTBP1'in FN1, S100A8'in FN1 ve F13A1'in kuvvetli bir şekilde FN1

ile etkileşimde olduğu ve buna ek olarak NUMA1 ve KIF20A'nın da birbirleri ile etkileşimde olduğu bulunmuştur (Şekil 6.45).

Yaşlı sağlıklı kontrollerin Alzheimer hastalarına göre fazla bulunan uyku öncesi plazma proteinlerinde STRING veritabanı kullanılarak PPI zenginleştirilmiş p değeri (1.0) olarak bulunmuştur, (4 düğüm, ortalama yerel kümeleme katsayısı= 0). Bu, proteinlerin kendi aralarında, genomdan alınan aynı boyut ve derece dağılımındaki rastgele bir dizi protein için etkileşimin anlamlı bulunmaması mutlaka biyolojik olarak anlamlı bir protein seçimi olmadığı anlamına gelmez sadece bu proteinlerin çok fazla çalışılmamış olması ve etkileşimlerinin henüz STRING tarafından bilinmemesi şeklinde yorumlanabilir.



Şekil 6. 46. Yaşlı Sağlıklı Kontrollerin Alzheimer Hastalarında Uyku Öncesi Plazma Proteinlerinde STRING Veritabanı Kullanılarak Protein-Protein Etkileşimi

Yaşlı sağlıklı kontrollerin uyku öncesinin uyku sonrasına göre fazla olduğu protein tanımlamalarında, yaşlı sağlıklı kontrollerin uyku sonralarının uyku öncesine göre fazla olduğu protein tanımlamalarında, Alzheimer hastalarının uyku öncesinin uyku sonrasına göre fazla olduğu protein tanımlamalarında ve son olarak Alzheimer hastalarının uyku sonralarının uyku öncesine göre fazla olduğu protein tanımlamalarında Protein-protein etkileşimleri (PPI) hücrenin kontrolü, iletişimi, metaboliksel gelişimi gibi biyolojik süreçlerinin tayini STRING veritabanı kullanılarak analiz edildiğinde bir dizi protein için etkileşimin anlamlı bulunmamıştır. Proteinlerin kendi aralarında, genomdan alınan aynı boyut ve derece

dağılımındaki rastgele bir dizi protein için etkileşimin anlamlı bulunmaması mutlaka biyolojik olarak anlamlı bir protein seçimi olmadığı anlamına gelmez sadece bu proteinlerin çok fazla çalışılmamış olması ve etkileşimlerinin henüz STRING tarafından bilinmemesi şeklinde yorumlanabilir.



7. TARTIŞMA

Dünya nüfus oranının büyük çoğunluğunun Amerika Birleşik Devletleri'nde olduğu bilinmektedir ve yapılan bir çalışmada 2020 yılında 65 yaş ve üstü tahmini 6.07 milyon yetişkin klinik AH sahip kişilerin varlığı belirtilmiş ve bu sayının 2060' ta iki katına çıkacağı öngörülmüştür (103). Bu çalışmalar ışığında Alzheimer hastalığının ilerleyen yıllarda artan vakaları ile çözüme kavuşması gereken önemli bir problem haline dönüşeceği tahmin edilmektedir. Çalışmamız, Alzheimer hastalarının uyku öncesi/sonrası plazma proteom profillerinin kalsiyum görüntüleme kullanılarak fare hipokampal kültürlerinde nöronal aktivite üzerindeki etkilerinin araştırılmasını konu alarak ilgili literatürlerin taranmasıyla bu alanda katkı sağlayacak ilk ve özgün çalışma olması bakımından önemlidir.

Kalsiyum görüntüleme, nöronal aktiviteyi dolaylı olarak ölçmeyi sağlar (52). Bireysel veya nöronal popülasyonlar, floresan kalsiyum göstergeleri uygulanarak etiketlenir, böylece hücre içi kalsiyum geçişleri optik yollarla ölçülebilir duruma gelir. Kalsiyum görüntüleme yöntemi ile hücre içi kalsiyum iyon seviyesinin nöronal uyarılabilirlik düzeyinin ölçülmesine olanak sağlar. Yapılan bir çalışmada ortaya çıkan nöbet aktivitesi, genetik olarak kodlanmış bir kalsiyum sensörü (GCaMP6F) kullanılarak kaydedilmiştir (104). Sunulan doktora tezinin nöronal aktivite kısmı için plazma örneklerinin kendi aktivitesine bağlı olarak ayrıca uyarıcı nörotransmitter olan glutamat kullanılarak hipokampal kültürlerdeki etkisi açıklanmaya çalışılmıştır. Hücre içi kalsiyum girişinin varlığı nöronal uyarılabilirlik açısından dolaylı olarak yorumlandığından floresan değişim olayları, süresi, genliği, frekans ve aktif hücre varlığının uyku önce ve sonrasında alınan plazma örneklerinde nasıl farklılaştığını incelemek Alzheimer hastalık sürecinde anlayışımızı ilerletmek için önemli bir zemin hazırlamaktadır.

Uyku eksikliği ile beraber sirkadian ritim bozukluğuna işaret eden çalışmalar yer almaktadır (105). Alzheimer hastalarının da uyku problem varlığı hastalığın semptomları arasında bilinmektedir. Alzheimer hastalarında uyku bozukluklarının yaygın olduğu gözlemine dayanarak, Xie ve arkadaşları (106) subaraknoid boşluk üzerine floresan izleri aşılıyarak uyanıklık ve uyku halindeki farelerde glimfatik

sistemi ölçme çalışmaları yapmışlardır. Bu ölçümlerde uyanık durumda akışın miktarının bozulduğunu bulmuşlardır ve bunu, anestezi kaynaklı uyku sırasında interstisyel hacmin %60'a kadar arttığını buldukları için hücre dışı boşluk değişikliklerine bağlamışlardır. Daha sonra radyoaktif olarak etiketlenmiş Aβ'nin klirensini test edip ve uyuyan farelerde klirensin iki kat artışı saptamışlardır (106).

İnsanlarda glimfatik sistemin varlığına işaret eden az sayıda çalışmalar mevcuttur (107, 108). Nörodejeneratif hastalıklardan biri olan idiopatik normal basınçlı hidrosefali hastalarında glimfatik ölçülmüştür (109). Bu hastalarda, lomber'den BOS alınarak hastanın tedavi edilmesi gerekliliğine dayanır. Bu hastalık ile yapılan bir çalışmada, verilen kontrast madde gadobutanol intratekal olarak uygulandığında hem hasta hem de sağlıklı kontrol gruplarında leptomeningeal arterler boyunca kontrast girişini gözlemlədiler (107). İlginç bir şekilde, güçlendirme gece boyunca zirve yapmıştır. Bu, uykunun glimfatik fonksiyonun bir geliştiricisi olduğu kemirgenlerde bildirilen gözlemlerle uyumludur (106). İnsanlarla yapılan bu çalışma, insan glimfatik sistem çalışmalarını aydınlatmada fayda sağlamıştır.

Memelilerde BOS, kafa boşluğu içindeki toplam sıvı hacminin %10'unu meydana getirir (110). BOS akışı kanallar veya foramaneller yoluyla bağlanan dört ventrikülden geçer. Nakada ve arkadaşları (39) beyin omurilik sıvısının (BOS) klasik dolaşım modelinin artık geçerli olmadığını belirtmişlerdir. BOS üretimi sadece koroid pleksusa değil, aynı zamanda peri-kapiller (Virchow Robin) boşluktaki su akışına da bağlıdır. Virchow Robin boşluğu boyunca geçen BOS akışı, ISF olarak bilinmektedir. Virchow-Robin, özellikle de merkezi sinir sistemi nöral aktiviteleri işlevselliği için önemlidir. Bu boşluğa su akışı ve dolayısıyla interstisyel akış, astrositlerin hücre içi sitozolik sıvı boşluğunu ve Virchow Robin boşluğunu birbirine bağlayan astrositlerin uçlarında lokalize olan AQP-4 tarafından düzenlenir. İnterstisyel akış, beta-amiloid klirensinin büyük ölçüde bağımlı olduğu sistemik lenfatiklere eşdeğer bir işlevselliğe sahiptir. (39). Yapılan bu çalışmalar doğrultusunda bu su kanalının glimfatik sistem işlevselliğini açıklamada yardımcı olabileceği kuvvetle bildirilmektedir. Aquaporin-4 su kanalı proteininin beyin homeostazı ve glimfatik fonksiyonun korunmasındaki rolünü gösteren çok sayıda kanıtla birlikte, bu su kanalının araştırılması, insan beynindeki glimfatik fonksiyonu

ve bu sistemdeki olası bozulmaları ölçmek için vekil bir ölçüm sağlar. Hastalık fizyolojisini anlamaya yardımcı olmak ve yeni bakış açısıyla bilime yol gösterici katkısı Alzheimer gibi yıkıcı semptomları olan hastalıkların anlaşılmasını kolaylaştırması bakımından önemlidir. Ek olarak, Iliff ve ark. (38) yaptıkları bir çalışmada astrositlerde su kanalı AQP4'ten yoksun hayvanlar, bu sistem yoluyla yavaşlamış BOS akışı ve interstisyel çözünen klirensinde ~%70'lik bir azalmaya varan bir bozulmayı bildirmişlerdir. Bu, anatomik akış ve akış yolları arasındaki toplu sıvı akışının astrositik uç ayaklar aracılığıyla su taşınması tarafından glial su kanalı AQP4'ün, bu sıvı değişim ağını kolaylaştırmada önemli bir sorumluluğa sahip olduğunu göstermiştir. Sistemin beyin lenfatik drenaj ile ilgili olması ve glial temele dayanmasından dolayı "glimfatik" terimi ortaya çıkmıştır (38).

Beyinde metabolik atıkların temizlenme sürecinin uyku esnasında artış gösterildiği bulunmuştur. Bu doğrultuda bulgular ele alındığında çalışmamızın da uyku odaklı olması ve uyku önce ve sonra plazma kalsiyum aktivite değişimlerinin *in vitro* ortamda çalışılması bu zamana kadar insan çalışmalarındaki sınırlı glimfatik sistem çalışmalarına katkı sağlayacak kanıtlara dayanak oluşturacaktır. Bizim çalışmamız da uyku öncesi plazmalarında kalsiyum aktivitelerinin bazı grup içi ve gruplar arası değişimlerde farklar olduğu gözlemlenmiştir. Uyku sonrasında yapılan analizlerin anlamlı bulunmaması uykunun işleyişine bağlı olarak uyku sonrası alınan plazma örneklerinde plazmanın birçok atık içeriğine sahip olabileceği düşünülerek herhangi bir kalsiyum aktivite varlığının olmamasına yorumlanmaktadır. BALB/c ırkı farelerden elde edilen hipokampal nöronlarda uyku öncesi alınan plazmaların etkin hücre sayısı yaşlı sağlıklı kontrollerde Alzheimer hastalarına göre fazla bulunmuştur. Etkin hücre sayısı kültür kabında yer alan kalsiyum aktivitesinin maksimum 150 ROI seçildiği parametre olarak ele alınmıştır. Buna göre kalsiyum olay aktivite sayısı kontrollerde daha yüksektir. Alzheimer hastalarında daha az olması öncesinde yapılan glimfatik sistem çalışmalarına atıfta bulunma kaidesiyle hastalığın patojenitesindeki durum sebebi ile yorumlanabilir. Hipokampal nöronlarda kalsiyum aktivitesine bağlı olayların frekansına da bakılmıştır. Birden fazla olayın yaşandığı kalsiyum aktivitelerinin sayımı esas alınarak yapılan analizlerde uyku öncesi Alzheimer hastalarında daha fazla bulunmuştur. Fakat bu fazlalık standart hatanın bu grupta fazla çıkmış olması sebebiyle kontrol grubunun lehine bir sonuç

olarak yorumlanmaktadır. Kalsiyum olay aktivite sürelerine bakıldığında yine uyku öncesinde iki grupta anlamlı fark bulunmuş bu farkın kontrol grubunda fazla olduğu saptanmıştır. Kontrol grubunun kalsiyum aktivite süresi fazla olmuş olup kalsiyumun içeride kalma süresinin daha uzun sürdüğünü gözlemlemekteyiz. Uykudan önce alınan plazma örneklerinin analizinde, beyinde gün boyu biriken maddelerin mevcut olduğu buna karşın periferik kanda gün boyu atıkların beyin klirensinin gece olduğu varsayılarak toksik olmadığı yönünde hipotez bakımından yorumlamaya gidilmiştir. Bu bulgu da uykunun glimfatik fonksiyonun çalıştığının gösteren kemirgenlerde yapılan deney sonuçları ile uyumlu olduğunu göstermektedir (106). Bu bulguyu güçlü şekilde destekleyen bir diğer sonucumuz da yaşlı sağlıklı kontroller arasında yapılan uyku öncesi ve sonrası plazma kalsiyum aktivitelerindeki olay süreleri arasında bulunmuştur. Buna göre uyku öncesi plazma olay süresi daha uzun sürmüştür. Aktivitenin devamlılığı noktasında uykunun etkili olduğu düşünülmektedir. Olay genliği kalsiyum aktivitesinin şiddetine dair bilgi vermektedir. Alzheimer ve yaşlı sağlıklı kontrollerin uyku öncesi alınan kalsiyuma bağlı nöral aktivitede kalsiyumun büyüklüğünün uyku öncesi yaşlı sağlıklı kontrolde arttığı bulunmuştur. Bu mekanizmanın Alzheimer üzerindeki etkisinin klirens dayalı bir değişim göstermediğini, dalganın büyüklüğüne etki yapmadığını düşündürmektedir.

Sunulan bu tezde, glutamat eksitotoksitesinin hipokampal nöronlar üzerine olası etkisini araştırıldı. Eksitotoksiste, uyarıcı glutamatın hücre dışı boşlukta aşırı birikmesi merkezi sinir sisteminde nöronal bozulmayla karakterize bir terimdir (111). İnme, hipoglisemi, travma ve epilepsi gibi akut rahatsızlıklar ve Huntington hastalığı, Alzheimer hastalığı gibi kronik nörodejeneratif durumların patogeneğinde glutamat uyarıcı amino asitlerden biri olan glutamatın aşırı uyarılmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir için reseptörlerin aşırı uyarılmasından kaynaklanabilir (112). Glutamat beyindeki başlıca uyarıcı nörotransmitterdir ve spesifik membran reseptörleri ile etkileşimleri, biliş, hafıza, hareket ve duyum gibi birçok nörolojik fonksiyondan sorumludur. Uyku öncesi ve sonrası alınan plazma deneylerinde hipokampal nöronları plazma maruziyetini takiben 1 saat sonunda glutamata 1 saat boyunca maruz bırakarak yapılan deneylerde kalsiyuma bağlı etkin hücre sayısının nöronal aktiviteleri incelendi. Buna göre etkin hücre sayısında kontrol grubunun uyku

öncesinde plazmanın kalsiyum aktivitesini arttırdığı görülürken glutamata maruz bırakılan kalsiyum aktivitesinin azaldığı gözlemlenmektedir. Alzheimer grubunda da etkin hücre sayısında uyku öncesi plazma verildiği durumda kalsiyum aktivitesinin yaklaşık %10 arttığı izlenirken, glutamatın aktiviteyi %3 civarında azalttığı gözlemlenmiştir. Bu düşüşün glutamat eksitotoksitesine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Glutamata maruziyetin kalsiyum aktivitesinde etkin hücre sayısını düşürmede nöronları şişirip aktivitelerinin yanıp parlak şekilde kalması görüntüleri alınan aktivitelerde de saptanmıştır. Bu azalmayı eksitotoksitesiteye bağlı olabileceği yönünde destekler niteliktedir.

Paravenöz akış yoluyla temizleme, nörodejeneratif koşullarla ilgili proteinlerin hücre dışı seviyelerini de düzenleyebilir, bunun bozulması, belki de çözünür proteinlerin yanlış birikmesine sebebiyet verebilir. Protein üretimi ve klirens arasındaki dengesizlik, proteinopatiler sırasında agregasyona katkıda bulunan potansiyel bir mekanizma olarak klirensin bozulmasına neden olmuştur (113). Yakın zamanda AQP4 ve AH ile ilgili çalışmalarda (114) bozulmuş glimfatik fonksiyonun yaşlanan beyni anormal protein birikimine karşı savunmasız hale getirmede bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, glimfatik değişiklikleri ve sıvı hareketine yönelik AQP4 kaynaklı düzensizlikleri görselleştirme yeteneği, AH beyninde protein birikiminden önceki değişiklikler hakkında önemli bilgiler sağlayabilir. Daha önceki çalışmalar genetik bilimi üzerine yoğunlaşmıştır. AH'li insan deneklerde yapılan genetik çalışmalar, AQP4'teki tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP), AH biyobelirteçleri ile anlamlı ilişkiler gösterdikleri için AQP4'ün astrositik uç ayakları üzerinde çalışmak AH durumunu öngörebileceğini ortaya koymuştur (115). Böyle bir aday, AQP4'ü membrana bağlayan distrobrevin'i (DTNA) ilgi çekici bir gen kılmaktadır. Yakın zamanda yapılan genetik ve ekspresyon çalışmaları, DTNA'nın AQP4'e benzer bir gelişimsel ekspresyon profili paylaştığını (116) ve DTNA'nın Alzheimer hastalarında hipokampal ekspresyonunun yükseldiğini, bu yükselmenin DTNA'daki P-tau patolojisi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmalar ışığında protein çalışmaları hastalığın aydınlatılması konusunda önemli bir yer tutmaktadır. Proteomiks çalışmaları son zamanlarda bilimde rağbet gören protein tanımlamalarını açığa çıkaran yeni ilgici çekici bir

alandır. AH tedavisi için yeni fikirler geliştirmede proteomiks çalışmalarının genişletilmesi için ihtiyatlı bir alan haline gelmektedir.

Bu tez çalışmasında, LC-MS/MS yöntemi ile uyku öncesi ve sonrası plazma protein analizleri gerçekleştirilmiştir. Protein tanımları gruplar arası uyku öncesi ve sonrası karşılaştırmalarında 800'den fazla protein bulunmuştur. Fakat çalışmanın analizlerinde protein sayıları t-testine bağlı olarak anlamlı olan ve aynı zamanda maksimum katlanma değişiminin 1.4 ten büyük olduğu proteinler dahil edilmiştir. Anlamlı olan proteinlerde beyinde ekspresyonun varlığı, anatomik açıdan bir bölgeye özgül olması ve tek bir hücreye özgül bir protein olup olmaması bakımından The Human Protein Atlas sitesinden (<https://www.proteinatlas.org/>) bu özellikler doğrultusunda araştırıldı. Kontrol grubunun uyku öncesinde uyku sonrasına göre daha fazla bulunan proteinler incelendiğinde profilin-1 proteinin aynı zamanda Alzheimer hastalarının kontrollere göre uyku sonrasında fazla olan protein listesinde de ortak olarak varlığı bulunmuştur. Glutamate-rich protein 6'nın da Alzheimer hastalarının uyku sonrası uyku öncelerine göre fazla olan protein listesinde ve aynı zamanda Alzheimer uyku sonrası proteinlerinin kontrollere göre fazla olduğu listede var olduğu bulunmuştur. Zinc finger protein 713 Alzheimer hastalarında hem uyku öncesi hem de uyku sonrası protein listesinde bulunmuştur. Bu proteinin Alzheimer hastalığı ile ilişkili olduğu çalışmalar mevcuttur (117).

Proteomiks sonuçları sonrası protein sınıflandırmalarına olanak veren bazı veri tabanları ile bulgularımızı daha detaylı araştırma fırsatı bu yöntem ile sağlanmıştır. Protein analizleri sonucunda Alzheimer hastalarının kontrollere göre yüksek çıkan uyku sonrası plazma proteinlerinde PANTHER sınıflandırma sistemi ile moleküler fonksiyonlarında daha çok bağlanma ve katalitik işlevlerde görev aldığı bulunmuştur. Bu veri tabanı biyolojik süreçlerin de analizlerine olanak vermiştir. Uyku sonrası plazma proteinlerinde yaygın olarak hücresel süreçler, lokalizasyon ve biyolojik regülasyonda ilgili proteinler yer almaktadır. Protein sınıflandırmada da yaygın bir şekilde sitoskeletal protein ve destek/adaptör proteini olarak sınıflandırılmaktadır. Hücre içi sinyal molekülü ve RNA metabolizması proteini olarak ayrıca sınıflandırılmıştır. Bu veritabanının çalışmalara sağladığı en iyi fonksiyonlardan biri yolak analizi göstermesidir. Yolak analizinde kendi çalışmamızın sonuçları ile

uyumlu bir şekilde nörodejeneratif hastalıklar karşımıza çıkmaktadır. Huntington ve Alzheimer hastalığı-amiloid sekretaz yolu uyku sonrası plazma proteinlerinde bulunmuştur. Bu çalışmalar birlikte, AD ve diğer tauopatileri önlemeye yönelik bir müdahale olarak sağlıklı bir uyku-uyanıklık döngüsünün önemini araştırmamız gerektiğini önermektedir.

Protein analizleri sonucunda Alzheimer hastalarının kontrollere göre yüksek çıkan uyku sonrası plazma proteinlerinde PANTHER sınıflandırma sistemi ile moleküler fonksiyonlarında daha çok bağlanma ve katalitik işlevlerde görev aldığı bulunmuştur. Bu veri tabanı biyolojik süreçlerin de analizlerine olanak vermiştir. Uyku sonrası plazma proteinlerinde yaygın olarak hücreyel süreçler, lokalizasyon ve biyolojik regülasyonda ilgili proteinler yer almaktadır. Protein sınıflandırmada da yaygın bir şekilde sitoskeletal protein ve destek/adaptör proteini olarak sınıflandırılmaktadır. Hücre içi sinyal molekülü ve RNA metabolizması proteini olarak ayrıca sınıflandırılmıştır. Bu veritabanının çalışmalara sağladığı en iyi fonksiyonlardan biri yolak analizi göstermesidir. Yolak analizinde kendi çalışmamızın sonuçları ile uyumlu bir şekilde nörodejeneratif hastalıklar karşımıza çıkmaktadır. Huntington ve Alzheimer hastalığı-amiloid sekretaz yolu uyku sonrası plazma proteinlerinde bulunmuştur. Bu çalışmalar birlikte, AD ve diğer tauopatileri önlemeye yönelik bir müdahale olarak sağlıklı bir uyku-uyanıklık döngüsünün önemini araştırmamız gerektiğini önermektedir.

8. SONUÇ

Bu tezde sunulan çalışma, Alzheimer hastalığı biyolojisinde yeni bir araştırma koluna odaklanmaktadır. Alzheimer hastalarının uyku öncesi ve sonrası farklı bulunan plazma proteom profillerinin primer hipokampal hücre kültür deneylerinde kalsiyuma bağlı değişen nöronal aktivitede farklılıklar saptanmıştır. Kalsiyuma bağlı nöronal aktivitedeki glutamata maruziyetin bu farklılığa neden olabilecek glutamat eksitotoksisine dair sonuçlar elde edilmiştir. Bu bağlamda, Alzheimer hastalığının araştırılmasında proteomiks biliminin ilerleyen yıllarda önemli bir tanı aracı olma yönünde önem kazacaktır. Çalışmamızın LC-MS/MS analizlerine göre çıkan Zinc finger proteinin Alzheimer ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Sunulan bu tezde, çıkan yüzlerce proteinin detaylı araştırılması sonucunda biyobelirteç bulunabileceği yönünde sonuçlar saptanmıştır. Kalsiyuma bağlı nöronal aktivitedeki değişimin iki farklı zamanda alınan plazma örneklerine göre değişmesi özellikle aktivitenin uyku öncesinde alınan plazmalarda anlamlı farklar bulunması literatürde az karşılaşılan insan glimfatik çalışmalara yol gösterici olacağı düşünülmektedir. Glimfatik araştırmaları, sinirbilim araştırma alanında yeni fakat hızla gelişen bir konudur. Bu sistemin yeni çağın önemli yöntemlerinden biri olan proteomiks biliminden yararlanılarak hem klinik hem de temel bilim araştırmalarının beraber yapılması gibi translasyonel çalışmalarla araştırmanın ilerlemesi açısından faydalı olacağı öngörülmektedir. İleri ki çalışmalarda genç sağlıklı kontrol, hafif bilişsel bozukluk tanımlı hastalarla aynı zamanda diğer nörodejeneratif hastalıklarda uyku önce ve sonrası plazma proteom profillerinin in vitro nöronal aktivite üzerindeki etkilerini incelemek nörodejeneratif hastalıkların temelinde yatan prognozunu anlaşılmasına ışık tutacaktır.

9. KAYNAKLAR

1. Cass SP. Alzheimer's Disease and Exercise: A Literature Review. *Curr Sports Med Rep.* 2017;16(1):19-22.
2. Yu TW, Lane HY, Lin CH. Novel Therapeutic Approaches for Alzheimer's Disease: An Updated Review. *Int J Mol Sci.* 2021;22(15).
3. Baharudin AD, Din NC, Subramaniam P, Razali RJBph. The associations between behavioral-psychological symptoms of dementia (BPSD) and coping strategy, burden of care and personality style among low-income caregivers of patients with dementia. 2019;19(4):1-12.
4. Hansen NJFin. Brain stimulation for combating Alzheimer's disease. 2014;5:80.
5. Duncan MJ, Veasey SC, Zee P. Editorial: Roles of Sleep Disruption and Circadian Rhythm Alterations on Neurodegeneration and Alzheimer's Disease. *Front Neurosci.* 2021;15:737895.
6. Uddin MS, Tewari D, Mamun AA, Kabir MT, Niaz K, Wahed MII, et al. Circadian and sleep dysfunction in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev.* 2020;60:101046.
7. Wang C, Holtzman DMJN. Bidirectional relationship between sleep and Alzheimer's disease: role of amyloid, tau, and other factors. 2020;45(1):104-20.
8. Sun BL, Wang LH, Yang T, Sun JY, Mao LL, Yang MF, et al. Lymphatic drainage system of the brain: A novel target for intervention of neurological diseases. *Prog Neurobiol.* 2018;163-164:118-43.
9. Jessen NA, Munk AS, Lundgaard I, Nedergaard M. The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem Res.* 2015;40(12):2583-99.
10. Hippus H, Neundorfer G. The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci.* 2003;5(1):101-8.
11. Crous-Bou M, Minguillón C, Gramunt N, Molinuevo JLJAsr, therapy. Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention. 2017;9(1):1-9.
12. Weller J, Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Res.* 2018;7.
13. Niikura T, Tajima H, Kita Y. Neuronal cell death in Alzheimer's disease and a neuroprotective factor, humanin. *Curr Neuropharmacol.* 2006;4(2):139-47.
14. Gilman S. Alzheimer's disease. *Perspect Biol Med.* 1997;40(2):230-45.
15. Szarka A. [THE ROLE OF beta-AMYLOID AND MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN THE PATHOGENESIS OF ALZHEIMER'S DISEASE]. *Ideggyogy Sz.* 2015;68(7-8):222-8.
16. Eratne D, Loi SM, Farrand S, Kelso W, Velakoulis D, Looi JC. Alzheimer's disease: clinical update on epidemiology, pathophysiology and diagnosis. *Australas Psychiatry.* 2018;26(4):347-57.
17. Buchanan H, Mackay M, Palmer K, Tothová K, Katsur M, Platt B, et al. Synaptic Loss, ER Stress and Neuro-Inflammation Emerge Late in the Lateral Temporal Cortex and Associate with Progressive Tau Pathology in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology.* 2020;57(8):3258-72.
18. Counil H, Krantic S. Synaptic Activity and (Neuro)Inflammation in Alzheimer's Disease: Could Exosomes be an Additional Link? *Journal of Alzheimer's Disease.* 2020;74:1029-43.

19. van Duijn CM, Tanja TA, Haaxma R, Schulte W, Saan RJ, Lameris AJ, et al. Head trauma and the risk of Alzheimer's disease. *American journal of epidemiology*. 1992;135(7):775-82.
20. Vogt BA, Vogt LJ, Hof PR. 10 - Patterns of Cortical Neurodegeneration in Alzheimer's Disease: Subgroups, Subtypes, and Implications for Staging Strategies. In: Hof PR, Mobbs CV, editors. *Functional Neurobiology of Aging*. San Diego: Academic Press; 2001. p. 111-29.
21. Sheppard O CM. Alzheimer's Disease: Etiology, Neuropathology and Pathogenesis. Sheppard O, Coleman M Alzheimer's Disease: Etiology, Neuropathology and Pathogenesis In: Huang X, editor *Alzheimer's Disease: Drug Discovery [Internet]* Brisbane (AU): Exon Publications; 2020 Dec 18 Chapter 1. 2020.
22. Hunsberger HC, Pinky PD, Smith W, Suppiramaniam V, Reed MN. The role of APOE4 in Alzheimer's disease: strategies for future therapeutic interventions. *Neuronal signaling*. 2019;3(2):Ns20180203.
23. Schrijvers EM, Verhaaren BF, Koudstaal PJ, Hofman A, Ikram MA, Breteler MM. Is dementia incidence declining?: Trends in dementia incidence since 1990 in the Rotterdam Study. *Neurology*. 2012;78(19):1456-63.
24. Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL. Alzheimer's disease. *Nature Reviews Disease Primers*. 2015;1(1):15056.
25. Talwar P, Sinha J, Grover S, Rawat C, Kushwaha S, Agarwal R, et al. Dissecting Complex and Multifactorial Nature of Alzheimer's Disease Pathogenesis: a Clinical, Genomic, and Systems Biology Perspective. *Molecular Neurobiology*. 2016;53(7):4833-64.
26. Cuyvers E, Sleegers K. Genetic variations underlying Alzheimer's disease: evidence from genome-wide association studies and beyond. *The Lancet Neurology*. 2016;15(8):857-68.
27. Fan L, Mao C, Hu X, Zhang S, Yang Z, Hu Z, et al. New Insights Into the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. 2020;10.
28. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. 1984. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;425(3):534-9.
29. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin*. 2017;38(9):1205-35.
30. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(5):1858-62.
31. Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ, Binder LI. Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(11):4040-3.
32. Woerman AL, Aoyagi A, Patel S, Kazmi SA, Lobach I, Grinberg LT, et al. Tau prions from Alzheimer's disease and chronic traumatic encephalopathy patients propagate in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(50):E8187-E96.
33. Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM, Anderson L, et al. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol*. 1998;43(6):815-25.
34. Hanoglu LA, B. Alzheimer Hastalığının Klinik Tanısı Bak ı rköy Ruh ve Sinir Hastal ı kları Hastanesi 1 Nöroloji Kliniği.

35. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984;34(7):939-44.
36. American Psychiatric Association (APA). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Arlington, VA. 2013;Fifth Edition.
37. Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol*. 2015;25(23):R1116-21.
38. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *J Neurosci*. 2012;32(147):147ra11-11.
39. Nakada T. Virchow-Robin space and aquaporin-4: new insights on an old friend. *Croat Med J*. 2014;55(4):328-36.
40. Nakada T, Igarashi H, Suzuki Y, Kwee I. Alzheimer Patients Show Significant Disturbance in Water Influx into CSF Space Strongly Supporting β -amyloid Clearance Hypothesis (S58. 001). *AAN Enterprises*; 2014.
41. Buzsáki G. Memory consolidation during sleep: a neurophysiological perspective. *Neurosci Biobehav Rev*. 1998;22(1):17-23.
42. Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiyagarajan M, et al. Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science*. 2013;342(6156):373-7.
43. Bower NI, Hogan BM. Brain drains: new insights into brain clearance pathways from lymphatic biology. *J Mol Med (Berl)*. 2018;96(5):383-90.
44. Zisapel N. New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. *Br J Pharmacol*. 2018;175(16):3190-9.
45. Lowrey PL, Takahashi JS. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004;5:407-41.
46. Abbott SM, Zee PC. Irregular Sleep-Wake Rhythm Disorder. *Sleep Med Clin*. 2015;10(4):517-22.
47. Rijo-Ferreira F, Takahashi JS. Genomics of circadian rhythms in health and disease. *Genome Medicine*. 2019;11(1):82.
48. Holth JK, Fritsch SK, Wang C, Pedersen NP, Cirrito JR, Mahan TE, et al. The sleep-wake cycle regulates brain interstitial fluid tau in mice and CSF tau in humans. *Neuron*. 2019;103(6):1037-48.
49. Musiek ES, Bhimasani M, Zangrilli MA, Morris JC, Holtzman DM, Ju Y-ES. Circadian rest-activity pattern changes in aging and preclinical Alzheimer disease. *JAMA Neurol*. 2018;75(5):582-90.
50. Vosko AM, Colwell CS, Avidan AY. Jet lag syndrome: circadian organization, pathophysiology, and management strategies. *Nat Sci Sleep*. 2010;2:187-98.
51. Rahmati V, Kirmse K, Markovic D, Holthoff K, Kiebel SJ. Inferring Neuronal Dynamics from Calcium Imaging Data Using Biophysical Models and Bayesian Inference. *PLoS Comput Biol*. 2016;12(2):e1004736.
52. Grienberger C, Konnerth A. Imaging calcium in neurons. *Neuron*. 2012;73(5):862-85.
53. Dulhunty AF. Excitation-contraction coupling from the 1950s into the new millennium. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33(9):763-72.
54. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(7):552-65.

55. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(7):517-29.
56. Gobel W, Helmchen F. In vivo calcium imaging of neural network function. *Physiology (Bethesda).* 2007;22:358-65.
57. Luo L, Callaway EM, Svoboda K. Genetic dissection of neural circuits. *Neuron.* 2008;57(5):634-60.
58. Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD. Chemical calcium indicators. *Methods.* 2008;46(3):143-51.
59. Kao J, Tsien RY. Ca²⁺ binding kinetics of fura-2 and azo-1 from temperature-jump relaxation measurements. 1988;53(4):635-9.
60. Jezek P, Hanus J, Semrad C, Garlid KDJ. Photoactivated azido fatty acid irreversibly inhibits anion and proton transport through the mitochondrial uncoupling protein. 1996;271(11):6199-205.
61. Gee KR, Brown K, Chen WU, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson IJC. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes. 2000;27(2):97-106.
62. Zhong C, Schleifenbaum J. Genetically Encoded Calcium Indicators: A New Tool in Renal Hypertension Research. 2019;6.
63. Ashley C, Ridgway E. Simultaneous recording of membrane potential, calcium transient and tension in single muscle fibres. 1968;219(5159):1168-9.
64. Arun K, Kaul C, Ramarao P. Green fluorescent proteins in receptor research: an emerging tool for drug discovery. 2005;51(1):1-23.
65. Dombeck DA, Harvey CD, Tian L, Looger LL, Tank DW. Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation. 2010;13(11):1433-40.
66. Nakai J, Ohkura M, Imoto K. A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein. 2001;19(2):137-41.
67. Tian L, Hires SA, Mao T, Huber D, Chiappe ME, Chalasani SH, et al. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. 2009;6(12):875-81.
68. Dong X-x, Wang Y, Qin Z-h. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta pharmacologica Sinica.* 2009;30(4):379-87.
69. Olloquequi J, Cornejo-Córdova E, Verdaguer E, Soriano FX, Binignat O, Auladell C, et al. Excitotoxicity in the pathogenesis of neurological and psychiatric disorders: Therapeutic implications. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England).* 2018;32(3):265-75.
70. Scott DB, Ehlers MD. Glutamate Receptors, Ionotropic. In: Lennarz WJ, Lane MD, editors. *Encyclopedia of Biological Chemistry.* New York: Elsevier; 2004. p. 213-9.
71. Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. 1987;7(2):369-79.
72. Hara MR, Snyder SH. Cell signaling and neuronal death. 2007;47:117-41.
73. Mattson MP. Chapter 11 - Excitotoxicity. In: Fink G, editor. *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology.* Academic Press; 2019. p. 125-34.

74. Abramov AY, Duchen MRJBeBA-B. Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity. 2008;1777(7-8):953-64.
75. Prentice H, Modi JP, Wu J-Y. Mechanisms of Neuronal Protection against Excitotoxicity, Endoplasmic Reticulum Stress, and Mitochondrial Dysfunction in Stroke and Neurodegenerative Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015;2015:964518-.
76. Agrawal GK, Sarkar A, Righetti PG, Pedreschi R, Carpentier S, Wang T, et al. A decade of plant proteomics and mass spectrometry: translation of technical advancements to food security and safety issues. *Mass Spectrom Rev*. 2013;32(5):335-65.
77. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 1996;13:19-50.
78. Holman JD, Dasari S, Tabb DL. Informatics of protein and posttranslational modification detection via shotgun proteomics. *Methods Mol Biol*. 2013;1002:167-79.
79. Al-Amrani S, Al-Jabri Z, Al-Zaabi A, Alshekaili J, Al-Khabori M. Proteomics: Concepts and applications in human medicine. *World J Biol Chem*. 2021;12(5):57-69.
80. Vercauteren FG, Bergeron JJ, Vandesande F, Arckens L, Quirion R. Proteomic approaches in brain research and neuropharmacology. *Eur J Pharmacol*. 2004;500(1-3):385-98.
81. Wolters DA, Washburn MP, Yates JR, 3rd. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem*. 2001;73(23):5683-90.
82. Cutler P. Protein arrays: the current state-of-the-art. *Proteomics*. 2003;3(1):3-18.
83. Yoithappabhunath TR, Nirmal RM, Santhadevy A, Anusushanth A, Charanya D, Rojiluke, et al. Role of proteomics in physiologic and pathologic conditions of dentistry: Overview. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015;7(Suppl 2):S344-9.
84. Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, McDowall RD. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J Pharm Biomed Anal*. 1998;17(2):193-218.
85. Castano EM, Maarouf CL, Wu T, Leal MC, Whiteside CM, Lue LF, et al. Alzheimer disease periventricular white matter lesions exhibit specific proteomic profile alterations. *Neurochem Int*. 2013;62(2):145-56.
86. Begcevic I, Kosanam H, Martinez-Morillo E, Dimitromanolakis A, Diamandis P, Kuzmanov U, et al. Semiquantitative proteomic analysis of human hippocampal tissues from Alzheimer's disease and age-matched control brains. *Clin Proteomics*. 2013;10(1):5.
87. Seyfried NT, Dammer EB, Swarup V, Nandakumar D, Duong DM, Yin L, et al. A Multi-network Approach Identifies Protein-Specific Co-expression in Asymptomatic and Symptomatic Alzheimer's Disease. *Cell Syst*. 2017;4(1):60-72 e4.
88. Berezki E, Branca RM, Francis PT, Pereira JB, Baek JH, Hortobagyi T, et al. Synaptic markers of cognitive decline in neurodegenerative diseases: a proteomic approach. *Brain*. 2018;141(2):582-95.

89. Drummond E, Wisniewski T. Using Proteomics to Understand Alzheimer's Disease Pathogenesis. In: Wisniewski T, editor. Alzheimer's Disease. Brisbane (AU)2019.
90. Braun P, Gingras AC. History of protein-protein interactions: from egg-white to complex networks. *Proteomics*. 2012;12(10):1478-98.
91. Yan C, Wu F, Jernigan RL, Dobbs D, Honavar V. Characterization of protein-protein interfaces. *Protein J*. 2008;27(1):59-70.
92. Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology*. 1993;43(11):2412-4.
93. Gungen C, Ertan T, Eker E, Yasar R, Engin F. [Reliability and validity of the standardized Mini Mental State Examination in the diagnosis of mild dementia in Turkish population]. *Turk Psikiyatri Derg*. 2002;13(4):273-81.
94. Bostan S. Mikro Elektrot Düzenegi Ve Optogenetik Araçlar Kullanılarak Hipokampal Nöronlarda Bellek Oluşumunun İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul. 2020:18-22.
95. Louis KS, Siegel AC. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol Biol*. 2011;740:7-12.
96. Croce N, Bernardini S, Di Cecca S, Caltagirone C, Angelucci F. Hydrochloric acid alters the effect of L-glutamic acid on cell viability in human neuroblastoma cell cultures. *J Neurosci Methods*. 2013;217(1-2):26-30.
97. Li Y, Chen X, Dzakpasu R, Conant K. Dopamine-dependent effects on basal and glutamate stimulated network dynamics in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem*. 2017;140(4):550-60.
98. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-82.
99. Cantu DA, Wang B, Gongwer MW, He CX, Goel A, Suresh A, et al. EZcalcium: Open-Source Toolbox for Analysis of Calcium Imaging Data. *Front Neural Circuits*. 2020;14:25.
100. Beker MC, Caglayan B, Caglayan AB, Kelestemur T, Yalcin E, Caglayan A, et al. Interaction of melatonin and Bmal1 in the regulation of PI3K/AKT pathway components and cellular survival. *Sci Rep*. 2019;9(1):19082.
101. Sibai M, Altuntas E, Suzek BE, Sahin B, Parlayan C, Ozturk G, et al. Comparison of protein expression profile of limb regeneration between neotenic and metamorphic axolotl. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;522(2):428-34.
102. Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. 2nd ed. Hillsdale, N.J.: L. Erlbaum Associates; 1988. xxi, 567 p. p.
103. Rajan KB, Weuve J, Barnes LL, McAninch EA, Wilson RS, Evans DA. Population estimate of people with clinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment in the United States (2020-2060). *Alzheimers Dement*. 2021;17(12):1966-75.
104. Rosch RE, Hunter PR, Baldeweg T, Friston KJ, Meyer MP. Calcium imaging and dynamic causal modelling reveal brain-wide changes in effective connectivity and synaptic dynamics during epileptic seizures. *PLoS Comput Biol*. 2018;14(8):e1006375.
105. Arnardottir ES, Nikonova EV, Shockley KR, Podtelezchnikov AA, Anafi RC, Tanis KQ, et al. Blood-gene expression reveals reduced circadian rhythmicity in individuals resistant to sleep deprivation. 2014;37(10):1589-600.

106. Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiyagarajan M, et al. Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science*. 2013;342(6156):373-7.
107. Ringstad G, Vatnehol SAS, Eide PK. Glymphatic MRI in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Brain*. 2017;140(10):2691-705.
108. Eide PK, Vatnehol SAS, Emblem KE, Ringstad G. Magnetic resonance imaging provides evidence of glymphatic drainage from human brain to cervical lymph nodes. *Sci Rep*. 2018;8(1):7194.
109. Eide PK, Ringstad G. Delayed clearance of cerebrospinal fluid tracer from entorhinal cortex in idiopathic normal pressure hydrocephalus: A glymphatic magnetic resonance imaging study. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2019;39(7):1355-68.
110. Thrane AS, Rangroo Thrane V, Nedergaard M. Drowning stars: reassessing the role of astrocytes in brain edema. *Trends Neurosci*. 2014;37(11):620-8.
111. Michaels RL, Rothman SM. Glutamate neurotoxicity in vitro: antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations. *J Neurosci*. 1990;10(1):283-92.
112. Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med*. 1994;330(9):613-22.
113. Lim J, Yue Z. Neuronal aggregates: formation, clearance, and spreading. *Dev Cell*. 2015;32(4):491-501.
114. Zeppenfeld DM, Simon M, Haswell JD, D'Abreo D, Murchison C, Quinn JF, et al. Association of Perivascular Localization of Aquaporin-4 With Cognition and Alzheimer Disease in Aging Brains. *JAMA Neurol*. 2017;74(1):91-9.
115. Burfeind KG, Murchison CF, Westaway SK, Simon MJ, Erten-Lyons D, Kaye JA, et al. The effects of noncoding aquaporin-4 single-nucleotide polymorphisms on cognition and functional progression of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)*. 2017;3(3):348-59.
116. Simon MJ, Murchison C, Iliff JJ. A transcriptome-based assessment of the astrocytic dystrophin-associated complex in the developing human brain. *J Neurosci Res*. 2018;96(2):180-93.
117. Bu S, Lv Y, Liu Y, Qiao S, Wang H. Zinc Finger Proteins in Neuro-Related Diseases Progression. *Front Neurosci*. 2021;15:760567.

10.EKLER

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

Bu araştırmanın amacı, Alzheimer hastalığı (demans/bunama) altında yatan mekanizmaların laboratuvar ortamında araştırılması ve hastalığın altında yatan olası sebeplerin açıklanarak yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için kaynak oluşturmaktır. Bu amaç doğrultusunda invitro düzeyde hedef nörotoksik β amiloid proteininin meydana getirdiği etki hem gündüz hem de gece olmak üzere iki farklı zaman açısından incelenecektir.

Araştırmaya katılmayı kabul ettiğiniz takdirde sizlerden hem gündüz hem de gece olmak üzere iki farklı zaman açısından 10 mililitre kan örneği alınacaktır. İsminiz tamamen gizli tutulacaktır.

Ayrıca hastaların kognitif düzeylerini değerlendirmek açısından hastalara uzman nöropsikolog tarafından nöropsikolojik testler uygulanacaktır. Nöropsikolojik değerlendirmeyi içeren testler, hasta- hasta olmayan kişilerin nöropsikolojik potansiyellerin açığa çıkarılması ve tanıya yönelik çıkarım yapılmasına yönelik olacaktır. Uygulanan nöropsikolojik testlerin herhangi bir yan etkisi bulunmamaktadır.

Yapmak istediğimiz araştırmanın size risk getirmesi beklenmemektedir. Kan aldırmanın genelde hiçbir zararı olmamasına karşın, nadiren ve çok az kanama ve morarmaya yol açabilir.

Sizden alınan örnek ileride başka çalışmalar için de kullanılabilir. İsteddiğiniz zaman çalışmaya katılmaktan vazgeçebilirsiniz. Bu durumda sizden almış olduğumuz örnek imha edilecektir. Aynı şekilde nöropsikolojik test sonuçlarınızda üçüncü şahıslarla paylaşılmayacaktır.

Bu çalışmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Sizden veya güvence altında bulunduğunuz herhangi bir kurum ve kuruluş tarafından ödeme alınmamaktadır ve size herhangi bir ödeme yapılmayacaktır. Araştırmada yer almayı reddedebilir ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararınıza engel duruma yol açmayacaktır.

Araştırmacı bilginiz dâhilinde veya isteğiniz dışında sizi araştırmadan çıkarabilir. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir. Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar, ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde tıbbi bilgilerinize ulaşabilirsiniz.

Çalışmaya Katılma Onayı

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Gönüllünün:

Adı Soyadı:

Adresi:

Tel:

Tarih ve İmza :

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin:

Adı Soyadı:

Adresi:

Tel:

Tarih ve İmza :

Araştırma yapan araştırmacının :

Adı Soyad:

Görevi:

Adresi:

Tel:

Tarih ve İmza:

Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin /görüşme tanığının:

Adı Soyadı:

Görev :

Adresi:

Tel:

Tarih ve İmza:

11.ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 10840098-604.01.01-E.23857
Konu : Etik Kurulu Kararı

05/07/2018

Sayın Fadime ÇADIRCI

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğumuz “ β -Amiloid Proteinin Nöronal Uyarılabilirlik Üzerine Etkilerinin Glimfatik Döngü Esaslı Araştırılması” isimli başvurumuz incelenmiş olup etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Ek:
-Karar Formu (2 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 05.07.2018 tarihinde e-imzalanmıştır.
Evrakımıza <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 185B1EF4X8 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi
Kavacak Mah. Ekinçiler Cad.No:19 Kavacak Kavşağı 34810
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KLURLU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	β-Amiloid Proteinin Nöronal Uyarılabilirlik Üzerine Etkilerinin Glimfatik Döngü Esaslı Araştırılması			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVAN/ADI/SOYADI	Fadime ÇADIRCI			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Nöropsikolog			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARAST <input type="checkbox"/>

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU		19.06.2018		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
Karar Bilgileri	Karar No: 352	Tarih: 27/06/2018		
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Sibel DOĞAN	Psiko-onkoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Devrim TARAKCI	Ergoterapi	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi İlknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Hikmet ÜÇİŞİK	Biyoteknoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Keziban OLCAY	Endodonti	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Toplantıda Bulunma



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.17481
Konu : Etik Kurulu Kararı

20/06/2018

Sayın Fadime ÇADIRCI

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “ β -Amiloid Proteinin Nöronal Uyarılabilirlik Üzerine Etkilerinin Glimfatik Döngü Esaslı Araştırılması” isimli başvurumuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

EK:
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 20.06.2018 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 1080B026X3 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi
Kavacak Mah. Ekinçiler Cad.No:19 Kavacak Kavşağı 34810
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
20/06/2018	38		Fadime ÇADIRCI

“ β -Amiloid Proteinin Nöronal Uyarılabilirlik Üzerine Etkilerinin Glimfatik Döngü Esaslı Araştırılması” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “**Oybirliği**” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 24 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Turan DEMİRCAN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet OZANSOY	
Üye	Dr. Öğr. Gör. Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm. Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

Sayı : E-10840098-772.02-5031
Konu : Etik Kurulu Kararı

12/02/2021

Sayın Fadime ÇADIRCI TUNGAÇ

Üniversitemizin Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 27/06/2018 tarihli 352 karar no ile onay verilen "β-Amiloid Proteinin Nöronal Uyarılabilirlik Üzerine Etkilerinin Glimfatik Döngü Esaslı Araştırılması" isimli çalışmanızın merkez kısmının "Fatih Sultan Mehmet Eğitim ve Araştırma Hastanesi" olarak değiştirilmesi isteğiniz uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

Dr. Öğr. Üyesi Mahmut TOKAÇ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrakınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 15A27B87X1 kodu ile doğrulayabilirsiniz.



Sayı : E-10840098-772.02-2827
Konu: Etik Kurulu Kararı

12/05/2022

Sayın FADİME ÇADIRCI TUNGAÇ

Üniversitemizin Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 27/06/2018 tarihli 352 karar no ile onay verilen "β-Amiloid Proteinin Nöronal Uyarılabilirlik Üzerine Etkilerinin Glimfatik Döngü Esaslı Araştırılması" isimli çalışmanız için aşağıda verilen değişiklikler uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

- Yukarıda ismi belirtilen araştırma açık adı yerine "Alzheimer Hastalarının Uykusu Önce ve Sonrası Plazma Proteom Profillerinin İn Vitro Nöronal Aktivite Üzerindeki Etkileri" olarak değiştirilmesi isteği.

Dr. Öğr. Üyesi Mahmut TOKAÇ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrakınızı <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden 6124DB4EXB kodu ile doğrulayabilirsiniz.

Medipol Üniversitesi Kavacak Yerleşkesi (Ana Yerleşke Raktörük)
Kavacak Mah. Ekinciler Cad. No: 19, Kavacak Kırcağız, 34810 Beykoz, İstanbul
T: 444 85 44 F: 0212 531 75 55
E-Posta: bilgi@medipol.edu.tr İnternet Adresi: www.medipol.edu.tr
Kop Adresi: medipoluniversitesi@hs03.kop.tr

Ayrıntılı Bilgi İçin: Bilge KAYA
Tel: ~~0212 531 75 55~~



Sayı : E-38828770-772.02-2819
Konu: Etik Kurulu Kararı

12/05/2022

Sayın FADİME ÇADIRCI TUNGAÇ

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 20.06.2018 tarihli 38 karar no ile onay verilen "β-Amyloid Proteinin Nöronal Uyanılabilirlik Üzerine Etkilerinin Glimfatik Döngü Esaslı Araştırılması" isimli çalışmanız için aşağıda verilen değişiklikler uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

- Yukarıda ismi belirtilen araştırma açık adı yerine "Alzheimer Hastalarının Uyku Önce ve Sonrası Plazma Proteom Profillerinin İn Vitro Nöronal Aktivite Üzerindeki Etkileri" olarak değiştirilmesi istediği.

Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrakınızı <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden C36E1084X3 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

Medipol Üniversitesi Kavacak Yerleşkesi (Ana Yerleşke Rektörlük)
Kavacak Mah. Ekinçler Cad. No: 19, Kavacak Kavşağı, 34810 Beykoz, İstanbul
T: 444 85 44 F: 0212 531 75 55
E-Posta: hilezi@medipol.edu.tr İnternet Adresi: www.medipol.edu.tr
Kep Adresi: medipoluniversitesi@hs03.kep.tr

Ayrıntılı Bilgi İçin: Bilgi KAYA
Tel: ~~0212 531 75 55~~

