



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**ALZHEİMER HASTALIĞINDA UYKUNUN BEYİN LENFATİK  
DRENAJ SİSTEMİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN PLAZMA  
PROTEOM PROFİLİ VE NÖROTOKSİSİTE AÇISINDAN  
ARAŞTIRILMASI**

NAGİHAN MANTAR

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. LÜTFÜ HANOĞLU

İkinci Tez Danışmanı

Prof. Dr. GÜRKAN ÖZTÜRK

İSTANBUL- 2022

## TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ( ) Doktora (X)  
Anabilim Dalı : Sinirbilim  
Tez Sahibi : Nagihan MANTAR  
Tez Başlığı : Alzheimer Hastalığında Uygunun Beyin Lenfatik Drenaj Sistemi Üzerindeki Etkisinin Plazma Proteom Profili Ve Nörotoksisite Açısından Araştırılması

Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Yerleşke  
Sınav Tarihi : 27.07.2022

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

### Danışman

Prof. Dr. Lütfü HANOĞLU

### Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

### İmza

### Sınav Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

İstanbul Medipol Üniversitesi

Doç. Dr. Esra CAĞAVİ

İstanbul Medipol Üniversitesi

Prof. Dr. Burak YULUĞ

Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi

Prof. Dr. Zehra Betül YALÇINER

İstanbul Okan Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve ...../....., ..... sayılı kararı ile 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 ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Nagihan MANTAR

## TEŞEKKÜR

Son altı yılda öğrencilikten akademisyenliğe geçişimde gösterdiği destek ve rehberlik için danışmanım Prof. Dr. Lütfü HANOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK'e tezimin gerçekleşmesi için beni laboratuvarına kabul edip ikinci danışmanım olduğu için ve çalışma boyunca sağlamış olduğu rehberliği, motivasyonu ve değerli tavsiyeleri adına kendisine minnettar olduğumu belirtir sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Süreç içerisinde desteğini hiç esirgemeyip, çalışmanın tamamlanabilmesi için sağlamış olduğu tüm katkıları ve dostluğu için Fadime ÇADIRCI TUNGAÇ'a özellikle teşekkür ederim.

Beni Göztürk laboratuvarına entegre ederek ihtiyacım olan şeyleri öğretme konusunda desteklerini esirgemeyen Dr. Neşe AYŞİT ve Sevginur BOSTAN başta olmak üzere Naciye BİLGİN BADUR, Şeyma KABLAN ÇİMEN, Dr. Sadık BAY, Gülsena BAYDAŞ, Dr. Kemal BAYAT, Dr. Esra Nur YİĞİT, Safiye SERDENGEÇTİ, Ayşe Server SEZER, Dr. Şükriye BİLİR'e ve araştırma grubumuzdaki diğer herkese işbirliği, teşvik ve samimi bir ortam sağladıkları için teşekkür ederim.

Ayrıca proteomiks birimi üyelerine, özellikle Dr. Mustafa Çağlar BEKER, Dr. Melike DİNÇ ve Hayriye Ecem YELKENCİ'ye çalışmaya yapmış oldukları katkılardan dolayı teşekkür etmek istiyorum.

Son olarak ebeveynlerime, sevgileri ve eğitim hayatım boyunca sağlamış oldukları tüm destekleri için teşekkür etmek istiyorum, onlar olmasaydı bu süreci yürütmek mümkün olmazdı.

Nagihan MANTAR

İstanbul-2022

# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU .....	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT .....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER .....	6
4.1. Alzheimer Hastalığı .....	6
4.1.1. Alzheimer hastalığında kan bazlı belirteçler.....	6
4.1.1.1 Amiloid $\beta$ .....	7
4.1.1.2. Tau .....	8
4.1.1.3. Nörofilament hafif zincir.....	8
4.1.1.4. Glial aktivasyon ve kan beyin bariyeri fonksiyonu .....	9
4.2. Beyin Drenaj Sistemleri .....	9
4.2.1. Glimfatik sistem .....	9
4.2.2. Meningeal lenfatik sistem .....	11
4.3. Uyku.....	13
4.3.1. Uykuda yaşa bağlı değişiklikler .....	13
4.3.2. Beyin drenaj sistemleri ve uyku ilişkisi .....	13
4.3.3. Alzheimer hastalığında uyku ve beyin klirensi arasındaki ilişki .....	15

4.4. Klinik ve Translasyonel Alzheimer Çalışmalarında Kan Bazlı Belirteçlerin Yeri .....	17
<b>5. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>21</b>
5.1. Katılımcılar.....	21
5.1.1. Alzheimer hastalarının dâhil edilme ve dışlama ölçütleri.....	21
5.1.2. Sağlıklı yaşlı kontrollerin dâhil edilme ve dışlama ölçütleri.....	22
5.2. Plazma Örneklerinin Toplanması ve Saklanması.....	22
5.3. Primer Hipokampal Nöron Kültürü.....	22
5.3.1. Materyal .....	22
5.3.1.1. <i>Deney hayvanı</i> .....	22
5.3.1.2. <i>Nöron kültürü için kullanılan reaktif ve sarf malzemeleri</i> .....	22
5.3.1.3. <i>Vasatların hazırlanması</i> .....	23
5.3.1.4. <i>Kültür petri kaplarının kaplanması</i> .....	24
5.3.2. Hipokampus diseksiyonu .....	24
5.3.3. Hipokampus hücrelerinin elde edilmesi.....	24
5.4. Plazma Hazırlama ve Optimizasyon Çalışmaları.....	25
5.5. Hücre Canlılığı Analizi .....	26
5.6. Proteomiks Çalışması .....	27
5.6.1. Materyal .....	27
5.6.2. Kütle spektrometresi analizi için örnek hazırlama.....	27
5.6.3. Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) analizi.....	29
5.6.4. Protein tanımlanması ve kantifikasyonu .....	29
5.6.5. Data analizi.....	29
5.7. İstatiksel Analiz.....	30
<b>6. BULGULAR .....</b>	<b>31</b>
6.1. Katılımcıların Klinik ve Demografik Özellikleri .....	31
6.2. Hipokampal Nöron Kültürü ve In Vitro Gün (DIV) Karakterizasyonu .....	31
6.3. Plazma Optimizasyon Sonuçları .....	33

6.3.1. Antikoagulan seçiminin hipokampal nöronların in vitro hayatta kalımı üzerindeki etkisi .....	33
6.3.2. Plazma oranı ve inkübasyon süresinin nöronal hayatta kalım üzerine etkisi.....	35
6.3.2.1. <i>Plazmanın arka kök gangliyon nöronları üzerinde in vitro hayatta kalım etkisi</i> .....	40
6.4. Hücre Canlılığı Analiz Sonuçları .....	41
6.5. LC-MS/MS İle Plazma Proteom Profiline Tanımlanması.....	42
6.5.1. Alzheimer olguları ve sağlıklı yaşlı arasındaki kan plazma protein farklılıkları.....	42
6.5.2. Tanımlanan proteinlerin fonksiyonel zenginleştirme analizi.....	47
6.5.3. Tanımlanan protein listelerinin protein etkileşim analizi.....	52
6.5.3.1. <i>Alzheimer hastalığı açısından tanımlanan proteinlerin incelenmesi</i> 57	
<b>7. TARTIŞMA .....</b>	<b>59</b>
7.1. Uykuya Bağlı Çalışan Beyin Lenfatik Drenaj Sisteminin Nöronal Toksikite Üzerindeki Rolü Nedir? .....	60
7.2 Alzheimer Nöropatolojisinin Ortaya Çıkışında Lenfatik Drenaj Sisteminin Olası Potansiyel Etkileri Nelerdir? .....	62
7.3. Periferal Kan Plazma Örneğinin Beyin Lenfatik Drenaj Sisteminin Fonksiyonunu Yansıtmadaki Başarısı Nedir?.....	65
7.4. Klinik ve Translasyonel Alzheimer Çalışmaları İçin Bir Araç Olarak Beyin Lenfatik Drenaj Sistemi .....	68
<b>8. SONUÇ .....</b>	<b>70</b>
<b>9. KAYNAKLAR.....</b>	<b>72</b>
<b>10. EKLER.....</b>	<b>91</b>
<b>11. ETİK KURUL ONAYI.....</b>	<b>97</b>
<b>12. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>104</b>

## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

**A $\beta$**  : Amiloid- $\beta$

**ADRDA**: Alzheimer's Disease and Related Disorders Association

**ALS** : Amyotrofik lateral skleroz

**AH** : Alzheimer Hastalığı

**ApoE** : Apolipoprotein E

**AQP4** : Aquaporin 4

**$\beta$**  : Beta

**BOS** : Beyin omurilik sıvısı

**Ca<sup>2</sup>** : Kalsiyum iyonu

**DSMIV** : Diagnostic and statistical manual of mental disorder IV

**FL** : Floresan

**fMRI** : Fonksiyonel manyetik rezonans

**f-Tau** : Fosforilize tau

**FTD** : Frontotemporal demans

**$\gamma$**  : Gama

**GFAP** : Glial fibriler asidik protein

**HKB** : Hafif kognitif bozukluk

**ISF** : Interstisyel sıvı

**Ig A** : Immunglobulin A

**Ig D** : Immunglobulin D

**Ig E** : Immunglobulin E

**Ig G** : Immunglobulin G



- Ig M** : Immunglobulin M
- KBB** : Kan beyin bariyeri
- LC** : Sıvı kromatografisi
- mLVs** : Meningeal lenfatik damar
- MRI** : Manyetik rezonans görüntüleme
- MS** : Kütle spektrometresi
- MSS** : Merkezi sinir sistemi
- NF- $\kappa$ B** : Nükleer Faktör Kappa B
- NfL** : Nörofilament hafif zincir
- NINCDS** : National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke
- PACC** : Preklinik Alzheimer bilişsel bileşik skoru
- PET** : Pozitron emisyon tomografisi
- PI** : Propidium iyodür
- SMMDT** : Standardize mini mental durum tespiti
- SPECT** : Tek foton emisyon tomografisi
- TNF- $\alpha$**  : Tümör nekroz faktörü  $\alpha$
- TUNEL** : Terminal Transferase Biotinylated-dUTP nick end labeling
- t-Tau** : Total tau
- VEGFA** : Vasküler endotelial büyüme faktörü A
- VEGFR2** : Vasküler endotelial büyüme faktör reseptörü-2

## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 5.3.1</b> Nöron kültürü için gerekli cihaz, reaktif ve sarf malzeme listesi .....	23
<b>Tablo 5.4.1</b> Hücre canlılığı değerlendirilmesi için kullanılan cihaz, boya ve reaktif listesi .....	26
<b>Tablo 5.6.1</b> Proteomiks çalışması için gerekli cihaz, reaktif ve sarf malzeme listesi .....	27
<b>Tablo 6.1.1</b> Çalışmaya katılan olguların sosyodemografik bilgileri .....	31
<b>Tablo 6.5.1</b> Alzheimer olguları ve sağlıklı yaşlı yetişkin grup arasında uyku önce ve sonrası koşuluna bağlı olarak p değeri <0.05 ve kat değişimi $\geq 1.4$ kriterini sağlayan protein listesi .....	45
<b>Tablo 6.5.2</b> Sağlıklı yaşlı yetişkin ve Alzheimer olgularından uyku öncesinde alınmış kan plazma örneklerinde artış göstermiş protein listesinden istatistiksel olarak zenginleştirilmiş ontolojik terimler. ....	48
<b>Tablo 6.5.3</b> Sağlıklı yaşlı yetişkin ve Alzheimer olgularından uyku sonrasında alınmış kan plazma örneklerinde artış göstermiş protein listesinden istatistiksel olarak zenginleştirilmiş ontolojik terimler. ....	49
<b>Tablo 6.5.4</b> Alzheimer olgularından uyku öncesi ve sonrasında alınmış kan plazma örneklerinde artış göstermiş protein listesinden istatistiksel olarak zenginleştirilmiş ontolojik terimler.....	50
<b>Tablo 6.5.5</b> Sağlıklı yaşlı yetişkinlerde uyku öncesi ve sonrasında alınmış kan plazma örneklerinde artış göstermiş protein listesinden istatistiksel olarak zenginleştirilmiş ontolojik terimler. ....	51

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 6.2.1	Kültür ortamında yetiştirilen hipokampal nöronların gelişimi. ....	32
Şekil 6.3.1	Antikoagülan seçimine bağlı olarak elde edilen plazma örneklerinin primer hipokampal nöron kültürü üzerindeki etkisi.....	34
Şekil 6.3.2	Plazma oranı ve inkübasyon süresine bağlı olarak hipokampal nöronların viabilitesi .....	36
Şekil 6.3.3	Plazma oranı ve inkübasyon süresine bağlı olarak değişen nöronal ölüm yüzdesi (n=3).....	37
Şekil 6.3.4	Hipokampal nöronların CellTiter-Blue testi ile hücre canlılığı analizi ...	39
Şekil 6.3. 5	Plazmanın arka kök ganglion kültürü üzerindeki etkisi .....	40
Şekil 6.4.1	Alzheimer olguları ve sağlıklı yaşlı yetişkin grubun uyku öncesi ve sonrası elde edilmiş olunan plazmasının hipokampal nöron kültürü üzerindeki toksik etkisinin CellTiter-Blue testi ile analizi (n=3). ....	41
Şekil 6.5.1	Alzheimer olgularında ve sağlıklı yaşlı yetişkinlerde toplamda 790 proteinin gruplar arası ve 2 farklı koşula (uyku öncesi; uyku sonrası) göre sınıflandırılması. ....	42
Şekil 6.5.2	Analize dâhil edilen tüm proteinler için grup karşılaştırmalarını temsil eden volkan grafikleri. ....	44
Şekil 6.5.3	Artmış proteinlerin String analizi, uyku sonrası Alzheimer olgular da artmış proteinler a sağlıklı yaşlı grupta artmış proteinler b. ....	53
Şekil 6.5.4	Artmış proteinlerin String analizi, uykun öncesi Alzheimer olgular da artmış proteinler a ve sağlıklı yaşlı grupta artmış proteinler b.....	54
Şekil 6.5.5	Artmış proteinlerin String analizi, sağlıklı yaşlı; uyku sonrası artmış proteinler a ve uyku öncesi artmış proteinler b.....	55
Şekil 6.5.6	Artmış proteinlerin String analizi, Alzheimer; uyku öncesi artmış proteinler a ve uyku sonrası artmış proteinler b.....	56
Şekil 6.5.7	String Alzheimer ağı ile tanımlanan protein listelerinin gruplar arası karşılaştırılması .....	57
Şekil 6.5.8	String Alzheimer ağı ile tanımlanan protein listelerinin grup içi karşılaştırılması. ....	58

## 1. ÖZET

### ALZHEIMER HASTALIĞINDA UYKUNUN BEYİN LENFATİK DRENAJ SİSTEMİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN PLAZMA PROTEOM PROFİLİ VE NÖROTOKSİSİTE AÇISINDAN ARAŞTIRILMASI

Alzheimer hastalığı (AH), yaşlı nüfus arasında oldukça sık görülen yaygın bilişsel ve işlevsel yeteneklerde azalma ile seyreden nörodejeneratif bir hastalıktır. AH patogeneğinde rol oynayan pek çok faktör olmakla birlikte en belirgin nöropatolojik özellik protein toksisitesi olarak tanımlanmaktadır. AH'de çeşitli nedenler protein toksisitesini tetiklese de uyku sırasında aktive olduğu bilinen beyin drenaj sistemindeki fonksiyon kaybı son yıllarda dikkatleri üzerine çekmiştir. Bu tez kapsamında AH ve sağlıklı yaşlı yetişkinlerden uykuya bağlı olarak iki farklı zamanda (uyku öncesi/sonrası) alınmış olunan periferik kan plazmasının primer hipokampal hücre ortamına eklenmesinden sonra ortaya çıkan nörotoksik etkisi ve LC-MS/MS analizi sonucunda elde edilen proteom profili biyoinformatik araçlarla gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Çalışmada özetle sağlıklı yaşlılardan uyku sonrası alınmış plazmanın, uyku öncesi alınmış olan plazmaya göre *in vitro* hipokampal nöron kültüründe artan hücre ölümü ile kanıtlanan daha toksik etkiye sahip olduğu izlenmiştir. Bu sonuçla uyumlu olarak proteom profili açısından sağlıklı yaşlılarda uyku sonrası plazmasında uyku öncesine göre immün yanıt ile ilişkilendirilen trombosit degranülasyonu ve mikrogliya patojen fagositoz yollarının zenginleştiği görülmüştür. Öte yandan AH'de ise hastalığa özgül iz olarak kabul edilebilecek kompleman koagülasyon kaskad aktivasyonu ile ilgili sürecin uyku sonrasında zenginleştiği görülmüştür. Sonuçlarımız, uykuya bağlı protein yolak zenginleşmesinin dolaylı olarak her iki grup için beyin drenaj sisteminin işlevini yansıttığını ve buna bağlı olarak beyin klirens işlevi hakkında fikir verdiğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Alzheimer, hipokampal nöron, LC-MS/MS, nörotoksosite, proteomiks

## 2. ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SLEEP ON BRAIN LYMPHATIC DRAINAGE SYSTEM IN ALZHEIMER'S DISEASE CONCERNING PLASMA PROTEIN PROFILE AND NEUROTOXICITY

Alzheimer's disease (AD) is a common neurodegenerative disease among the elderly population which shows a decrease in cognitive and functional abilities in the patients. Although many factors play a role in the pathogenesis of AD, the most prominent neuropathological feature can be defined as protein toxicity. Although various reasons induce protein toxicity in AD, the loss of function in the brain drainage system, which is known to be active during sleep, has attracted attention over the last decades. In this thesis, the neurotoxic effect of peripheral blood plasma in AD and healthy elderly adults were measured at two different time points (before and after sleep) by adding them to the primary hippocampal cell environment and the proteome profile was analyzed with LC-MS/MS. In summary, my results showed that plasma taken from healthy elderly adults after sleep had a more toxic effect on *in vitro* hippocampal neuron culture compared to plasma taken before sleep evidenced by increased cell death. Consistent with this result, proteome profile of platelet degranulation and microglia pathogen phagocytosis pathways, which are associated with immune response, were found to be enriched in after sleep plasma in healthy elderly subjects compared to before sleep plasma. On the other hand, it has been observed that the process of complement coagulation cascade activation, which can be considered a disease-specific trace, is enriched after sleep plasma in AD. My result implicates the enrichment of the protein pathways that change due to sleep and indirectly reflects the function of the brain drainage system for both groups, suggesting an important role in the brain clearance.

**Key words:** Alzheimer, hippocampal neuron, LC-MS/MS, neurotoxicity, proteomics

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Nörodejeneratif hastalıklar, yaşlı yetişkinlerde morbidite ve kognitif bozukluğun yaygın bir nedenidir (1). Alzheimer hastalığı (AH) geri dönüşü olmayan nöron ve bilişsel yetenek kaybına yol açan beynin en yaygın progresif nörodejeneratif hastalığıdır ve diğer demanslar ile birlikte ölüm sebepleri arasında 7. sırada yer almaktadır (2). AH en yaygın demans şekli olarak günümüzde tüm demans vakalarının %60-80'nin oluşturmakta ve dünya çapında 55 milyondan fazla demans hastası bulunmaktadır ve bu sayının 2030 yılına kadar 78 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (3).

AH'de ortaya çıkan kortikal nöronların seçici hasarlanmasının altında yatan temel mekanizma tam olarak netleştirilememiş olsa da hastalığın klinik karakteristiği ile ayırt edici bazı spesifik nöropatolojik süreçler ilişkilendirilmiştir. Bunlar ekstrasellüler alanda nöritik plak oluşumu ve intrasellüler düzeyde nörofibriler yumaklar olarak karşımıza çıkmaktadır (4). Nörofibriler yumaklar ve nöritik plakların nöroanatomik dağılımı Braak ve Braak tarafından hastalığın kendi karakteristik prognozu içerisinde tanımlanmıştır (5).

AH'de yukarıda belirtilen nöropatolojik bozulmanın altında yatan temel mekanizmanın ne olduğu konusunda çok fazla aday olmakla birlikte merkezi sinir sisteminde glialara (astrozit) bağımlı perivasküler ağ olan glimfatik sistem'in keşfedilmesi dikkatleri üzerine çekmiştir (6). Nörodejeneratif hastalıkların altında yatan temel patofizyolojinin bu sistemdeki bozuklukla ilişkilendirilebileceği yapılan hayvan çalışmaları ile desteklenmiştir (7).

Glimfatik sistem, organ sistemlerinde var olduğu bilinen interstisyel metabolik atık ürünlerinin uzaklaştırılmasına yardımcı olan lenf damarları ile benzer işlevi görmekte olup (8) döngü içerisindeki serobrospinal sıvı ile interstisyel sıvının (ISF) sürekli olarak değiştiği ve bu değişimin periarterial alan boyunca serobrospinal sıvının konvektif akışı ile kolaylaştırıldığı bilinmektedir (9).

Bu döngü'nün bozulması sağlıklı kişilerde de var olan metabolik atık ürünlerinin ekstrasellüler ve intrasellüler ortamda agregatlarının oluşması ile sonuçlandığı düşünülmektedir. AH'ye bu açıdan bakacak olursak glimfatik döngüde meydana gelen işlev kaybına paralel olarak hastalığın hedef proteini olan beta

amiloid, diğ er metabolik atıklar ve bu sistemde anahtar kilit işlevi gö ren AQP4 reseptörlerinde meydana gelen de ğ işimin hastalığın altında yatan neden olabilece ğ i hipotetik olarak kabul görmektedir (9).

Glimfatik dö ngü kendi içerisinde ritmisiteye sahip olup özellikle uyku boyunca daha aktif bir şekilde çalış tığı (10) ve AH'de uykuda meydana gelen bozulmaların glimfatik sisteme ba ğ lı çalışan amiloid temizleme mekanizmasında bozulmaya sebep oldu ğ u görüşü ö ne çıkan yaklaşımlardandır (11). Bu görüşü kognitif bozuklu ğ u olmayan sa ğ lıklı kişiler üzerinde yapılan uyku deprivasyonu çalışmaları sonucunda glimfatik sisteme ba ğ lı serebrospinal sıvıda azalan amiloid beta oranı destekler niteliktedir (12). Ayrıca AH'nin kendi doğası gere ğ i ilerleyen yaş ile birlikte daha çok görülüyor olması glimfatik dö ngü çalışmasında yaşa paralel olarak dramatik işlev kaybının görülmesi ile ilişkilendirilmiştir (13). Bu da yaşlanma ile birlikte arteriyel pulsatilitede azalmaya neden olan arter duvarında sertleşmenin meydana gelmesi ile – arteriyel pulsatile glimfatik akış sürücülerinden biridir – yaşa ba ğ lı gözlemlenen glimfatik sistem fonksiyonundaki azalmada rol oynadı ğ u düşünölmektedir (14, 15).

Çalışmanın ana amacı; uyku ve AH olmak üzere iki temel de ğ işken etrafında şekillenmiştir ve bu bağlamda hipokampal nöronların AH plazma maruziyetine cevabının nörotoksik açıdan ele alınması ve bu yanıtın hastalığa karakteristik özgül paterninin *in vitro* ve proteom profili açısından de ğ erlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmanın amacı doğ rultusunda çalışma süresince belirlenmiş birden fazla yan amaç vardır ve hepsi AH'de periferal kan plazma örneklerinin nörotoksite ve geniş protein çeşitlili ğ i açısından incelenip beyin lenfatik drenaj sisteminin çalışma prensibi ile birlikte hastalığın altında yatan nöropatolojiyi bütüncül açıdan de ğ erlendirmektir. Daha spesifik olarak amaçlar ş unları içermektedir:

1. Uykuya ba ğ lı olarak (uyku öncesi/uyku sonrası) alınmış olan periferal kan plazma örneklerinin primer hipokampal nöronlar üzerindeki nörotoksik etkisini incelemek;
2. beyin lenfatik drenaj sistemini, AH ve sa ğ lıklı yaşlı yetişkin kan plazması ile nörotoksite açısından de ğ erlendirmek;

3. beyin lenfatik drenaj sistemi temel alınarak AH'yi ayırt etmede kullanılmak üzere hedef protein ve/veya fonksiyonel yollar aramak ve kütle spektrometresi tekniği kullanılarak hastalığın protein izinin tanımlanması;
4. uyku öncesi ve sonrası koşuluna bağlı olarak, gruplar arası ve grup içinde kan plazma örneklerinde tespit edilen protein miktarının nasıl değiştiğinin gösterilmesi.





## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH), yaşlı nüfus arasında yaygın bilişsel ve işlevsel yeteneklerde azalma ile seyreden nörodejeneratif bir hastalıktır (16). Etkilenen bireylerde tipik olarak hafıza bozukluğunu takip eden yürütücü işlevler, dil ve diğer bilişsel alanlar da izlenen ilerleyici gerileme ile tanımlanan nihai demans semptomları izlenir (4). Hastalık ilk olarak 1907 yılında Alois Alzheimer'ın senil demans ile ilişkili semptomlar gösteren 55 yaşındaki Auguste Deter'in otopsisinde saptanmış olduğu yoğun nöron kaybı, hücre içi nörofibriler yumaklar ve hücre dışı senil plaklarının varlığı ile tanımlanmıştır (17). Daha sonra Alman psikiyatrist Emil Kraepelin psikiyatrik tanı sınıflandırılmaların yer aldığı ders kitabında bu ve diğer birkaç vakayı "Alzheimer hastalığı" adı altında yeni bir başlık altında tanımlamıştır (18). Alois Alzheimer tarafından tanımlanmış olan belirteçler hala AH'nin temel nöropatolojik özellikleri olarak değerlendirilmesiyle birlikte genel bağlamda patolojik olarak hastalık amiloid plakların oluşumu, nörofibriler yumaklar, nöronal kayıp, sinaptik kayıp, beyin atrofisi ve enflamasyon ile karakterize edilmektedir (19).

Hastalığın altında yatan patofizyolojinin erken amiloid- $\beta$  birikimi ile başlayıp ardından tau birikimi ve nörodejenerasyon ile devam eden oldukça kompleks ve dinamik bir süreç olduğu konusunda artan bir anlayış vardır (20). Bu patolojik değişiklikler beyin omurilik sıvısı (BOS) analizi, pozitron emisyon tomografisi (PET) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) kullanılarak in vivo olarak tespit edilebilmektedir (21). Bütün bu teknikler klinik olarak faydalı olmasına karşın girişimsel, pahalı ve zaman alıcı olması sebebi ile klinikte kullanım alanları oldukça kısıtlıdır (22). Bu nedenle son yıllarda AH patolojilerini saptamak için kolay erişebilir ve uygun maliyetli klinik araştırmalarda yaygın olarak kullanılacak kan bazlı biyobelirteç çalışmalarında artış görülmektedir.

#### 4.1.1. Alzheimer hastalığında kan bazlı belirteçler

Kan bazlı biyobelirteçler söz konusu olduğunda AH ve diğer nörodejeneratif hastalıklar için klinik teşhisin iyileştirilmesi ve etkili hastalık modifiye edici ilaç tedavilerinin geliştirilmesi ve izlenmesi amacıyla son zamanlarda olağanüstü ilerleme kaydedilmiştir (23). Biyobelirteçlerin yakın zamanda geliştirilmesiyle olası

bir dönüm noktası geçilmiş olup AH'yi ayırt etmekte plazmada ölçülebilen A $\beta$ 42/A $\beta$ 40, f-tau (treonin 181 veya treonin 217'de fosforilize edilmiş), NfL, glial aktivasyon ve kan-beyin bariyeri işlevi yüksek tanısal performans göstermiştir (23, 24).

#### **4.1.1.1 Amiloid $\beta$**

Glennner ve Wong 1984 yılında AH'de görülen senil plakları izole edip saflaştırdıklarında ana bileşenin Amiloid beta peptidi (A $\beta$ ) olduğunu tespit etmişlerdir (25). A $\beta$ , bir transmembran proteini olan amiloid prekürsör proteinin (APP) proteolitik  $\beta$ - ve  $\gamma$ -sekretaz enzimleri tarafından parçalanması yoluyla üretilmektedir (26). Geleneksel olarak merkezi sinir sisteminde bulunan bir protein olarak kabul edilmesi ile birlikte periferel dokularda veya hücrelerde de üretilerek kan dolaşımına salındığı bilinmektedir (27).

A $\beta$  peptidi,  $\gamma$ -sekretaz tarafından bölünmeye bağlı olarak tipik olarak 37-43 amino asit içerir ve A $\beta$ 40 en yaygın izoformdur. Daha uzun izoformlar (A $\beta$ 42 ve A $\beta$ 43), daha küçük agregatlar (oligomerler olarak adlandırılır) ve daha büyük çözünmeyen fibriller oluşturarak toplanmaya eğilimlidir (23). A $\beta$  fibrilleri, AH olan beyinde hücre dışı plakların ana bileşeni olmakla birlikte oligomerlerin oluşumunu katalize eder ve bu şekilde toksik olduğu düşünülen A $\beta$  varyantını oluşturur (28). Bu da genel kabul görmüş olan amiloid kaskad hipotezinin temelini oluşturur ve A $\beta$  patolojisi AH'de neokortikal tau patolojisi ve nörodejenerasyon süreçlerini tetikleyerek hastalığa özgül sürecin ortaya çıkışının sebebi olarak gösterilmektedir (29).

Farklı A $\beta$  isoformları, kan bazlı analizler ile güvenli bir şekilde ölçülebilir. A $\beta$ 42'nin A $\beta$ 40'a (A $\beta$ 42/40 oranı) konsantrasyon oranının AH'yi ayırt etme de daha başarılı olduğu bilinmektedir (30, 31). Bununla birlikte serebral A $\beta$  patolojisi olan bireylerde plazma A $\beta$ 42/40 konsantrasyon oranının BOS'da izlenen %40-60'luk orana kıyasla sadece %10-20 azaldığı bilinmektedir (32-35). Bu durum plazma A $\beta$  konsantrasyonunun periferel A $\beta$  üretiminden de etkilendiğinin göstergesi olarak açıklanmaktadır (36). Bu sebeple tek başına kullanılan bir belirteç olmaktan ziyade bu bölümde açıklamış olduğumuz diğer belirteçler ile birlikte kullanılarak hastalığı tespit etmekteki duyarlılığının artacağı düşünülmektedir.

#### **4.1.1.2. Tau**

Tau, taupati olarak adlandırılan bir grup nörodejeneratif hastalık sınıfının patolojisinde merkezi rol oynayan mikrotübül ile ilişkili nöronal proteindir (37). Tauopatiler, hiperfosforile edilmiş tau proteininden oluşan hücre içi nörofibriler yumaklar ve mikrotübül organizasyonunun ve aksonal taşıma gibi mikrotübül ile ilişkili fonksiyonların bozulması ile karakterize edilmektedir (38). Bu hastalık grubu içerisinde en yaygın olarak AH görülmektedir. Kan bazlı AH patolojisini ayırt etmede özellikle fosforilize olmuş tau (f-tau) öne çıkan belirteçler arasındadır.

Plazma f-tau181 ve f-tau217'nin AH'de karşılaşılmış olunan nöropatolojik değişikliği diğer taupatiler de dâhil olmak üzere nörodejeneratif bozukluklardan kesin olarak ayırt edebildiği ve hastalığın klinik süreci boyunca da tanımlanabilir olduğu otopsiye dayalı çalışmalarda dâhil olmak üzere açıkça gösterilmiştir (39-41).

Fosforilize olmuş tau özellikle plazma f-tau217, AH'de yapılan BOS ve tau-PET görüntüleme çalışmalarında olduğu kadar yüksek doğrulukta ayırtırmakla beraber hafif kognitif bozukluk (HKB) durumunda yüksek f-tau seviyesinin ilerleyen süreçte artan kognitif azalma ve AH demansına dönüşümü ile ilişkilendirilmiştir (39, 41).

#### **4.1.1.3. Nörofilament hafif zincir**

Nörofilament hafif zincir (NfL) sadece nöronlarda eksprese edilip, nörolojik durumu ve tedavi takibini kandaki nöronal hasarı ölçmesi ile sağlayan hücre iskeleti proteindir (42). Kandan ölçülen NfL hastalığa özgül bir biyobelirteç olmamakla birlikte uzunlamasına çalışmalarda Multiple skleroz, travmatik beyin hasarı, atipik parkinsonizm, ALS, FTD ve inme gibi nörolojik durumlarda uzun süre kanda yüksek konsantrasyonda bulunabilir (42-44). AH'de de sağlıklı kontrollere kıyasla artmış NfL konsantrasyonu ve nörodejeneratif süreç ile ilişkisi yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (45, 46). Fakat her ne kadar nöronal hasar ve nörodejeneratif süreci ifade eden bir biyobelirteç olsa da hastalığa spesifik olarak değişiklik göstermemesi ve yaş, hamilelik, diyabet, vücut kitle indeksi, kardiyovasküler risk ve tanınmayan kafa tramvası gibi ek karıştırıcı faktörler tarafından etkileniyor olması sebebi ile bireysel hastalarda değerlendirilirken dikkatli olunması gereklidir (42).

#### **4.1.1.4. Glial aktivasyon ve kan beyin bariyeri fonksiyonu**

Glial fibriler asidik protein (GFAP), astroglial aktivasyon ve astrositozu gösteren bir belirteçtir (47). AH'de plazma GFAP oranının A $\beta$  patolojisi ve hastalık şiddeti ile ilişkisi ortaya koyulmuştur (48). Benzer şekilde AH riski taşıyan bilişsel olarak normal yaşlı yetişkinlerde artmış plazma GFAP oranı ve HKB'li hastalarda AH patolojisinin saptanması ve AH demansına dönüşümü ile ilişkilendirilmiştir (47).

Kan beyin bariyeri yarı geçirgen yapısal ve kimyasal bir bariyer görevi göerek beynin iç ortamını koruduğu bilinmektedir. Bu yapıda meydana gelen bozukluk A $\beta$ 'nın periferal dolaşıma aktarılmasını engelleyerek beyinde A $\beta$  birikimini indüklediği bunun da bilişsel bozulma ve AH demansına yol açan bir patogeneze olarak değerlendirildiği ve beraberinde bu fonksiyon kaybının tau patolojisi ile de korelasyon gösterildiği raporlanmıştır (49). Bununla birlikte amiloid patolojisi ve AH için risk faktörü olarak değerlendirilen Apo E genotipi olmaksızın kan beyin bariyeri geçirgenliğini gösteren albümin BOS/plazma oranı pek çok demans bozukluğunda da arttığı gösterilmiştir (50). Bu da demansiyel sürecin AH patolojisinden bağımsız olarak beyin mikrovasküler hasarı ile de ilişkili olduğunu göstermektedir.

## **4.2. Beyin Drenaj Sistemleri**

Aktif çalışma hızına rağmen beynin metabolik atık ürünler ve toksik ajanları uzaklaştırmaya yardımcı olan özel bir lenfatik sistemi bulunmadığı ve bağışıklık açısından ayrıcalıklı bir organ olduğu yaygın bir şekilde kabul görmekteydi (51). Günümüzdeyse merkezi sinir sistemi (MSS) hastalık patogenezelelerinin beyin klirens sistemi ile ilişkilendirilmesi son yıllarda hızla genişleyen bir araştırma alanı haline gelmiştir, AH'de bunlardan biridir (52, 53). Şu anda literatürde önerilen iki beyin drenaj yolu vardır: glimfatik sistem ve meningeal lenfatik sistem (54, 55).

### **4.2.1. Glimfatik sistem**

2012 yılında beynin ekstrasellüler çözünenlerinin BOS'a nasıl hareket ettiği sorusundan hareketle araştırmacılar, farelere enjekte edilen flüoresan izleyiciler ile beyin çapında yaygın gözlemlenen bir yolak tanımladı ve bunu glimfatik (glia-lenfatik) sistem olarak adlandırdılar (9). İnsanda da benzer şekilde glimfatik sistem aktivitesi, difüzyon tensör manyetik rezonans görüntü analizi ile beyin atık

ürünlerinin BOS'un perivasküler boşluk boyunca hareketi ile nasıl uzaklaştırdığı gösterilmiştir (56, 57).

Beyin çapında yaygın olarak bulunan bu sistem birkaç kritik bileşenden oluşmaktadır, bunlar; BOS, interstisyel sıvı (ISF), perivasküler boşluk, serebrovasküler yapı, glial hücreler ve astrosit aquaporin 4 (AQP4) kontrollü su kanalları (58). Sistemin çalışma prensibi temelde şu şekildedir: Subaraknoid boşluktan BOS arteriyel pulsatilite, solunum ve BOS basınç gradyanı gibi bir takım sebepler dâhilinde Virchow-Robin boşluklarına yönlendirilir. Buradaki gevşek fibröz matrisden meydana gelen perivasküler boşluk, BOS akışı için uygun alanı sağlayarak perivasküler boşlukların sınırını oluşturan AQP4 eksprese eden astrositik vasküler ayaklar, BOS'un beyin parenkiminden metabolitleri taşımalarını kolaylaştırıp ISF'nin doku içindeki perivenöz boşluklara doğru BOS akışı ile karışmasını ve hızlı konvektif sıvı akışını sağlar (6). Sonunda BOS-ISF sıvısının taşımış olduğu küçük boyutlu ve hidrofilik atıklar meningeal lenfatik damarlara (MLVs) ve periferel kan dolaşımına aktarılır (58).

Glimfatik akışı kontrol eden birden fazla faktör vardır. Bunlardan ilki periarteryal boşluklarda çift yönlü akışı ve perivenöz boşluklarda tek yönlü BOS-ISF toplu akışını kolaylaştıran arteriyel pulsasyondur (14). Pulsatil olan bu BOS akışının esas olarak kardiyak döngü tarafından yönlendirildiği bilinmektedir (59). Kardiyak pulsasyona ek olarak yakın zamanda sağlıklı kişilerde BOS akışını etkileyen solunum ve düşük frekanslı pulsasyonun da glimfatik akışa katkıda bulunduğu gösterilmiştir (60). BOS ve ISF arasındaki konvektif akışı etkileyen bir diğer faktör ise uyku uyanıklık döngüsüdür (10). Uyku veya uyku benzeri anestezi durumunda interstisyel boşluk hacmindeki genişleme ile uyanıklığa göre çözünür metabolitler direncin azalması ile birlikte daha kolay beyin parenkiminden perivenöz dolaşıma aktarıldığı ve uykunun da bu bağlamda glimfatik akış üzerinde sürücü etkisi olduğu gösterilmiştir (10).

Tanımlanmış olan glimfatik sistem içerisinde yer alan yapıların olası yapısal ve fonksiyonel değişikliği sebebi ile atık ürünlerin ortamdaki uzaklaştırılmaması sonucunda homeostatik beyin metabolizması ve BOS dinamiğinin bozulması ve beraberinde beyin sağlığı açısından yıkıcı bir etkiye sahip olabileceği düşüncesi pek

çok açıdan kabul görmektedir. Bu bağlamda baktığımızda ise sistem içerisinde kritik işleyişe sahip olan AQP4'ün öne çıktığı görülmektedir. AQP4 su kanallarının, perivenöz yol boyunca ISF'nin temizlenmesini sağlarken, periarteryal boşluktan BOS akışını kolaylaştırarak BOS-ISF'nin toplu akışını büyük ölçüde desteklediği bilinmektedir (9, 61). AQP4 eksikliği olan farelerde, intrasisternal enjekte edilmiş floresan izleyicili A $\beta$  temizliğinin azalması ile glimfatik klirensin bozulduğu ve bu şekilde AQP4'ün glimfatik drenajın korunmasındaki rolü ve A $\beta$  klirensindeki önemi gösterilmiştir (9). Yine benzer şekilde yaşlanan beyinde AQP4'ün depolarizasyonu, yanlış yerleşimi ve silinmesi ile birlikte perivasküler BOS devir daimindeki bozulma sonucunda beyinde A $\beta$  proteini ve Tau proteinlerinin birikimine katkıda bulunabileceği (62), perivenöz boşluğa ilerlemesi gereken A $\beta$  akışının interstisyel boşlukta zayıfladığı ve bununda proteinlerin hücre dışı konsantrasyonlarının artması ile sonuçlandığı ve AH ile ilişkili patogenizin ortaya çıkışını açıklamaktadır (63).

#### **4.2.2. Meningeal lenfatik sistem**

Lenfatik damar sistemi, sürekli bir endotelial hücre tabakası ile sarılmış bir damar ağı ile klasik olarak antijen sunucu hücrelerin lenf düğümlerine taşınması, gastrointestinal organlarda diyet yağının emilmesi, arter basıncının düzenlenmesi ve ters kolesterol taşınmasında rol oynarken görece daha yakın tarihte tanımlanmış olan yeni fonksiyonu ile dokular arasındaki hücre dışı boşluktan protein açısından zengin sıvıyı uzaklaştırıp venöz sisteme geri döndürmek suretiyle sıvı homeostazını sağlamaktadır (64, 65). Uzun yıllar bu fonksiyonlara sahip lenfatik damar sisteminden merkezi sinir sisteminin yoksun olduğu düşünülmüştür ta ki 2015 yılında iki ayrı grup tarafından fare meninkslerinde lenfatik damarların varlığı tanımlanana kadar (66, 67). Beyni ve omuriliği kaplayan meninkslerde tespit edilmiş olunan bu lenfatik damarlar meningeal lenfatik damar sistemi (mLV) olarak adlandırılmış ve yıllarca kabul gören nöroimmünoloji dogmasını tamamen değiştirerek bu zamana kadar MSS'de eksik olan lenfatik işleyişi ile ilgili açığı kapatmıştır. Meningeal lenfatik damar sistemi dura mater yerleşimli olup superior sagittal sinüs ve transvers sinüse paralel olarak yayılım göstererek kafatasının tabanından kafatasının dorsal kısmına uzanan kan damarları boyunca genişlemektedir (67). Dural sinüslere ve meningeal arterlere yakın bu özel konumu nedeniyle meningeal lenfatik sistem, beyin parenkiminde bulunan metabolitler

ve/veya atık ürünlerin glimfatik akış ile BOS-ISF değişimi sonucunda perivasküler yollar boyunca ortak bir beyin drenaj yolu olarak işlev gördüğü bilinmektedir. Buna ek olarak normal fizyolojik koşullar altında meninkslerden, parankimden ve BOS'tan farklı tipte bağışıklık hücrelerini ve küçük molekülleri derin servikal lenf düğümlerine boşaltarak beyin parankimini periferik bağışıklık sistemine bağlar ve MSS için benzersiz bir bağışıklık görevi üstlenir (67).

Beyin parenkimindeki A $\beta$  gibi hücre kalıntı ve toksik molekülleri uzaklaştırmakta görevli olan glimfatik akışın, mLV'de meydana gelen patolojik değişiklikler sonucunda BOS-ISF değişimi ile taşınan atık ürünlerin derin servikal lenf düğümüne drenajını bozabilir bu da fonksiyonel olarak iki sistemin birbiri ile ilişkili olduğunu gösterir (68). AH nöropatolojisinde yer alan A $\beta$  için de temel klirens yollarından biri olan mLV'nin hasarının da AH ile ilişkili olduğu sonucuna varılabilir. Son çalışmalar da yaşlanmaya paralel olarak azalan mLV fonksiyonu beyin ve meningeal amiloidin patolojik durumunu kötüleştirebileceğini düşündürmektedir (58).

AH'de BOS drenaj yollarının bozulmuş olmasının A $\beta$  klirensini etkileyeceği ve böylece beynin amiloid yükünü artıracak varsayılmaktaydı. Yapılan hayvan çalışmaları da mLV'nin bu işleyişteki yerini daha net ortaya koymaktadır. Şöyle ki artmış A $\beta$  birikim oranlarına sahip iki transgenik fare modelinde, dorsal dura materdeki lenfatik damarların kapsamı ve morfolojisi etkilenmemiş ve servikal lenf düğümlerine drenajın normal olduğu görülmüştür buna karşın AH fare modellerinde dorsal dural lenfatiklerin ablasyonu veya derin servikal lenf düğümlerinin ligasyonu, hem beyinde hem de meninkslerde artan A $\beta$  ve tau yüküne yol açtığı izlenmiştir (69). Bu nedenle meningeal lenfatikler ve servikal lenfatiklere doğru BOS çıkışı A $\beta$  klirensi için önemlidir ve birbirine bağlı bu çıkış yollarının bozulması, beyinde A $\beta$  birikimi için bir risk faktörü olarak değerlendirilebilir ve belki de hastalığın daha erken başlamasına veya daha hızlı seyrine yol açabilir (70).

### **4.3. Uyku**

#### **4.3.1. Uykuda yaşa bağılı değişiklikler**

Özellikle geriatrik araştırmalar sonucunda bozulmuş uyku ile pek çok olumsuz sağılık sonucunun ilişkilendiriliyor olması örneğın bilişsel bozulma, uykuya artan ilginin temel sebebi olarak karşımıza çıkmaktadır. Yaşlanma ile birlikte değişim gösteren diğer pek çok fizyolojik özellikler de olduğu gibi yaşlanmaya paralel olarak uyku düzeninde de değişim izlenir. Bu değişiklik daha çok gelişmiş uyku zamanlaması, azalan gece uyku süresi ve uyku verimliliği, gündüz şekerleme sıklığının artması, gece uyanmalarının artması ve yavaş dalga uykusunun azalması ile ilişkilidir (71). Bütün bu değişiklikler yaşlanma ile birlikte sirkadiyen ritim ve uyku homeostazının daha kırılğan hale geldiğini göstermektedir. Ek olarak nöroendokrin fonksiyonundaki yaşa bağılı değişiklik ve uykuya ilişkili hormon salgısının miktar ve düzeninin değişimi uyku kalitesi ve uyku mimarisindeki değişikliklerle ilişkili olduğu ve/veya katkıda bulunduğu bilinmektedir (72). Diğer yandan kötü uyku kalitesi ve beraberinde getirmiş olduğu sağılık sorunlarını tek başına yaşlılıkla ilişkilendirilmesi doğru değildir. Diğer faktörlerinde yaşlı yetişkinlerde uykuya ilişkili sorunlara katkıda bulunacağı düşünölmelidir, örneğın beyin lenfatik drenajındaki bozulmalar.

#### **4.3.2. Beyin drenaj sistemleri ve uyku ilişkisi**

Beyinde glimfatik sistem, hücre dışı metabolitlerin ve atık maddelerin temizlenmesinde önemli rol oynar. Uyku her ne kadar ilk olarak bedensel dinlenme ile ilişkilendirilse de uyku sırasında glimfatik sistem aktivitesinin uyanıklığa göre belirgin şekilde arttığı ve beyin parenkiminden iki kat daha fazla protein klirensi gerçekteştiği bilinmektedir (6).

BOS ve ISF'nin konvektif akışı üzerinde uyarılma düzeyinin de önemli rolü vardır ve baş modölatörü norepinefrindir. Uyuduğumuz esnada merkezi norepinefrin seviyeleri düşerek hücre dışı boşluğın genişlemesine, direncin azalmasına ve sonuç olarak BOS-ISF akışının artışına sebep olmaktadır (8). Bu bulgular anestezi uygulanmış farelerde de benzer şekilde görölmüş olup uyanıklık sırasında interstisyel boşluk hacim fraksiyonunun hem uyku hem de anestezi esnasına göre daha düşük olması, uykunun konvektif sıvı akışını kolaylaştırdığını düşöndürmüştür (6). Ek olarak, norepinefrin reseptör antagonistlerinin glimfatik klirensi indüklediği ve



bunun da uyanıklıkta norepinefrin salınımının interstisyel boşluk miktarını azaltarak klirensi baskılayabildiğini düşündürmektedir (73). Sonuç olarak tüm çalışmaları topluca ele aldığımızda glimfatik fonksiyonun uykuya bağlı olarak artması, interstisyel boşluğunun genişlemesi ile ilişkilendirildiği ve bu genişlemenin de norepinefrin modülasyonundan kaynaklandığı düşünülebilir (10).

BOS-ISF konvektif akışı özellikle yavaş dalga uykusunda artış gösterdiği bilinmektedir. Nöron demetlerinin 20-30 saniye boyunca düzenli ve senkronize depolarizasyonu ile ilişkilendirilen delta osilasyonunun, beynin önemli fizyolojik restorasyonu ve kan oksijenasyonunu yansıttığı bilinmektedir. Benzer şekilde yavaş dalga uykusunda izlenen delta osilasyonunun, glimfatik aktiviteyi arttırmak için interstisyel boşluklara BOS akışını artırarak solüt klirensini artırdığı düşüncesi ile eşleşmektedir (6).

İn vivo hayvan çalışmaları ile tanımlanmış olan uyku ve beyin drenaj sistemlerinin ilişkisi, kan oksijen düzeyine bağlı fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme (Bold fMRI), elektroensefalografi ve BOS akış ölçümünün birlikte ele alındığı in vivo insan çalışma sonucuyla da kanıtlanmıştır. Çalışma sonucunda derin uyku esnasındaki (NREM3) yavaş nöral aktivite ile BOS akışının bağlantılı olduğu ve derin uyku sırasında her 20 saniyede bir büyük BOS salınımının meydana geldiğinin, bunun da BOS dinamikleri ile nöral ve hemodinamik ritimlerin bağlantılı olabileceği düşüncesini desteklediği öne sürülmüştür (74).

Bununla birlikte glimfatik sistemin yaşla birlikte bozulması, nörodejeneratif demanslarda izlenen uyku bozukluğu ile semptom gelişimi arasında bir bağlantı olduğu fikrini öne çıkarmaktadır. Hücre dışı metabolitlerin ve atık maddelerin uzaklaştırılma kapasitesi farelerde yaşlanmaya bağlı olarak zamanla azalır (6). Bu durum yaşlı farelerde glimfatik klirenste %80-90'lık bir azalma ile kanıtlanmıştır ve yaşlı beyinlerde artan A $\beta$  birikiminin en azından bir kısmını açıklayabileceği düşünülmektedir (75).

Uykuyla ilişkili olarak glimfatik klirens üzerinde etki gösteren bir diğer faktör de AQP4 kanallarıdır. AQP4'ün perivasküler polarizasyonu dinlenme fazında en fazladır ve AQP4 kanalı silinen fare modellerinde gece ve gündüz arasındaki glimfatik klirens farkını ortadan kalktığı görülmüştür (8). Uyku yoksunluğu durumunda da benzer şekilde AQP4 kanallarının mevcut polarizasyonunu kaybettiği ve AQP4 ekspresyonunda değişikliklere neden olduğu bilinmektedir (73). Ek olarak AQP4 genetik varyasyonunun insanlarda uyku kalitesi ve A $\beta$  yükü açısından önemli olduğu ve tanımlanan genetik varyasyonun beyin klirens işlevini bozabileceği öne sürülmektedir (76).

### **4.3.3. Alzheimer hastalığında uyku ve beyin klirensi arasındaki ilişki**

Yaşlanma beynin boyutunu küçültme, vasküler yapısını bozma ve hatta bilişsel olarak çeşitli şekilde etkiler (77). Demans ve diğer bilişsel bozukluklar ileri yaşlarda yaygın olmakla birlikte, demans tanısı konmamış kişilerde de yaşlanma ile ilişkili olarak bilişte azalma olabilir (78). Bu kayıp bellek, işlem hızı, mantıksal akıl yürütme gibi yaşa bağlı olarak düşüş gösteren farklı bilişsel alanlarda izlenmektedir (79).

Uyku, öğrenmeyi ve hafızayı desteklediği, sinaptik plastisiteyi düzenlediği ve beyindeki atıkların temizlenmesini arttırdığından dolayı beyin için çok önemlidir (10). Yaşlanmayla birlikte uyku da bozulmalar oldukça sık görülür ve uyku yoksunluğu çalışmaları ile de bilişsel performansı akut olarak etkilediği bilinmektedir. Ortaya çıkan kanıtlar, kronik uyku problemlerinin bilişsel gerileme ve muhtemelen bunama riskini artırabileceğini düşündürmektedir (80, 81). Uyku, A $\beta$ 'nin patolojik bir özelliği olan A $\beta$  temizlenmesinde rol oynadığından dolayı uyku ve demansiyel süreç ilişkisi biyolojik olarak da desteklenir (10). Uykunun beyin drenaj sistemi ile ilişkisi yanı sıra demans riskini etkileyebileceği diğer önemli mekanizmalar; sinaptik homeostazın düzenlenmesi, ateroskleroz, hipokampal alanlardaki nöroinflamasyon seviyelerinin etkilenmesi veya uykuda solunum bozukluğunda meydana gelen inflamatuvar veya oksidatif yollarda hipoksi ile ilişkili artan aktivitedir (81-84). Bütün bu nedenler dâhilinde uyku bozuklukları demans ile ilişkilendirilmiştir ve bu nedenle potansiyel bir risk faktörü, bir prodromal hastalık özelliği veya klinik öncesi beyin patolojisinin varlığının sinyali olarak kabul edile bilinmektedir (80).

AH patogenezinde rol oynayan pek çok faktör olmakla birlikte tanımlanmış olan en belirgin nöropatolojik özellik protein toksisitesi ile karakterize edilir. A $\beta$  plaklarının birikimi ve hiperfosforile tau'nun nörofibriler yumakları, AH de tanımlanmış olan bilişsel gerilemede önemli rol oynar (20). Daha önce de belirtildiği gibi mevcut anlayış, uykudaki bozulmanın A $\beta$  ve tau gibi toksik etkiye sahip protein birikimini arttırarak AH patogenezinin hızlandığı düşünülmektedir.

Perivasküler drenaj yolları, interstisyel A $\beta$  başta olmak üzere beyin parankiminden atık temizleme için bir lavabo işlevi görür ve anormal bir perivasküler boşluk, bozulmuş glimfatik klirens ve dahası Alzheimer patolojisi ile ilişkilendirilmiştir (6). Perivasküler boşluğun anormal genişlemesi AH ve sağlıklı kontroller arasında sıklıkla gözlenen bir farktır ve hastalığa özgün patolojik özellikler ile ilişkilidir, ancak bu genişlemenin mekanizmaları ve etkileri belirsizdir (85). Şaşırtıcı bir şekilde perivasküler boşluk genişlemesi ile uyku bozuklukları arasında da korelasyon izlenmektedir (86). Başka bir çalışmada bu görüşü destekler nitelikte artan perivasküler boşluk sayısı ile uyku yoksunluğu arasında bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (87).

Özellikle bellek fonksiyonları için önemli olan NREM3 uyku dönemi yaşa bağlı olarak hem niceliksel hem de kalite açısından azalır ve yaşlı insanların daha düşük oranda yavaş dalga aktivitesine sahiptir olduğu bilinmektedir (71). Diğer yandan AH'ler sağlıklı yaşlılarla karşılaştırıldığında glimfatik sistem sürücülerinden biri olan NREM3 sırasında meydana gelen yavaş dalga aktivitesinde belirgin azalma görülür ve bu da AH patolojisi ile ilişkilendirilmektedir (88). Sonuç olarak hayvan çalışmalarında olduğu gibi klinik çalışmalarda da uyku sırasında meydana gelen yavaş dalga aktivitesi ile artan glimfatik akış ve amiloid klirensi arasındaki ilişki gösterilmiştir ve derin uykunun özellikle beyin temizliği için gerekli olduğunu düşüncesi kanıtlanmıştır.

Beyin içine ve dışına protein giriş ve çıkışını kolaylaştırmada hayati bir rol oynayan perivasküler astroglial yerleşimli AQP4 kanalları yaşlanma ve beyin hasarına bağlı polarizasyonunun değiştiği bilinmektedir (6). Postmortem AH vaka serilerinde de, sağlıklı yaşlılara kıyasla AH'lilerin frontal kortikal gri maddesinde AQP4'ün perivasküler lokalizasyonunun azaldığı görülmüştür (89). AH kaydedilen

bu azalma, artan A $\beta$  ve nörofibriler patolojik yük ve demans başlangıcından önce bilişsel düşüş ile ilişkilendirilmiştir.

Serebral kan akımı, glimfatik fonksiyonun bir diğer itici gücüdür ve düzensizliği ile ilişkili olarak demans gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir (14). AH'de en erken gelişen fizyolojik değişikliğin serebral kan akışında izlenen azalma olduğu öne sürülmektedir ve bunun da muhtemelen oligomerik A $\beta$ 'nın perisitler aracılığı ile kılcal damarları daraltmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (90). Serebral akış hızı periyodikliğinin uyku ile ilişkili amplifikasyonu, uyku sırasında serebral atık temizleme sisteminin aktivasyonunu yansıttığı düşünülmektedir (91). Sağlıklı kişilere kıyasla bozulmuş olan serebral akış hızı aynı zamanda AH patolojisi olup uyku bozukluğu yaşayan ve yaşamayan AH'ler arasında da farklılaşmaktadır. SPECT görüntüleme analizi sonucunda uyku bozukluğu bulunan AH'ler de uyku bozukluğu olmayan AH'lere göre frontal ve temporal lobda belirgin perfüzyonda azalma izlenmiştir (92). Bu da AH patolojisinin varlığına karşın uykunun glimfatik akış sürücüsü olan serebral akış hızı üzerinde etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak AH ve glimfatik aktivasyon ile ilişkili olası fonksiyon kayıplarını topluca ele aldığımızda, Tau ve A $\beta$  agregatları başta olmak üzere atık ürünlerin beyin dışına hareketinden glimfatik klirensin sorumlu olduğu, AH'de glimfatik klirensin bozulduğu ve uykunun da bu süreçte son derece önemli katkısı olduğu düşünülmektedir.

#### **4.4. Klinik ve Translasyonel Alzheimer Çalışmalarında Kan Bazlı Belirteçlerin Yeri**

Proteomiks, birçok proteinin eş zamanlı olarak analizine izin veren ve çeşitli hastalıklar için yeni biyobelirteçleri tanımlamada öne çıkan metodolojik bir yaklaşımdır (93). Kan plazması veya serumdan insan biyolojisi hakkında önemli miktarda klinik ve biyolojik bilgi elde edilebildiği için proteomik çalışmalarda merkezi bir rol oynadığı görülmektedir. Ek olarak kolay erişilebilir ve minimal invaziv bir girişim olması sebebi ile gerek kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarında gerekse tedaviye verilen terapötik yanıtın izlenmesi ve hastalığa özgü yeni biyobelirteçlerin keşfini hızlandırıyor olması açısından son zamanlarda pek çok araştırmada kullanıma yönelik ilgi artmıştır (94).

Plazma proteomikleri, çok sayıda protein analizi için küçük bir hacimde örnek kullanması ve özellikle hastalıklarla ortaya çıkabilecek protein ifadesindeki değişiklikleri tanımlayabildiğinden dolayı avantajlı ve popüler hale gelmiştir (94). Öte yandan kan bazlı plazma proteomik belirteçlerin, AH'de olduğu gibi diğer yöntemlere göre hastalığın teşhisi, prognozu ve sınıflandırılması açısından daha az invaziv ve uygun maliyetli bir yaklaşım olduğu için de tercih edilmektedir (95). Bu gelişmelere rağmen bireysel çalışmalarda kan biyobelirteç geçerliliğinde büyük değişiklik gözlemlenmektedir. Bu sebeple yakın zamanda bu alandaki uzman grup tarafından, AH'de kan biyobelirteçleri için uygun kullanım önerileri varılan konsensüs sonucunda yayınlanmıştır (96).

Alzheimer hastalığı süreklilik açısından üç aşamadan meydana geldiği kabul edilir: normal bilişsel yetenek ile karakterize edilen klinik öncesi aşama, hafif bilişsel bozulma ile karakterize edilen prodromal aşama ve nihayetinde klinik olarak belirgin demans (97). Hastalığın klinik belirtilerinin heterojenliği sebebi ile belirtilmiş olunan bu 3 aşamalı süreklilik 2018 yılına kadar ya postmortem değerlendirme ya da beyin biyopsisi ile yapılabildi. 2018 yılında Ulusal Yaşlanma ve Alzheimer Derneğinin yapmış olduğu araştırma sonucunda, AH'de postmortem inceleme veya in vivo biyobelirteçler tarafından belgelenebilen altta yatan patolojik süreçler yeniden tanımlanmıştır (98). Bu da AH ile ilişkili bilişsel bozulmaya yol açan olaylar dizisi ve demansın heterojen etiyolojisinin daha doğru ele alınmasını sağlamıştır.

Günümüzde AH'ye bağlı demans teşhisi başta klinik olmak üzere nöropsikolojik ve biyobelirteç ölçümlerinin kombinasyonları ile gerçekleşmektedir. AH teşhisi için onay almış biyobelirteçler BOS'da A $\beta$ 42, t-tau ve f-tau birikimi, A $\beta$  ve tau PET taraması ve plazma f-tau, kısa bilişsel testler ve APOE genotipleme gibi erişilebilir biyobelirteçlerin kombinasyonudur (41, 99). Her ne kadar BOS ve PET'teki mevcut gelişmeler AH tanı sürecini daha kesin kılsa da invaziv ve maliyetleri göz önünde bulundurulduğunda tarama ve birinci basamak tanı aracı olarak kullanmak için kan bazlı biyobelirteçler kadar tercih edilebilir değildir. Bu sebeple AH'de kan bazlı biyobelirteç adaylarının var olan BOS ve PET belirteçleri ile doğrularak daha fazla araştırılıp geliştirmesi gerekmektedir.

Alzheimer hastalığı sürekliliğini göz önünde bulundurduğumuzda plazma biyobelirteçlerinin bilişsel bozukluğu olmayan, hafif kognitif bozukluk ve AH demansını ayırt etmede klinik performansı artırmak için birbirleriyle veya diğer kolay erişilebilir testlerle birleştirilmektedir (96).

Bilişsel bozukluğu olmayan ve hafif kognitif bozukluk aşamasında olan kişileri ayırt etmede daha çok kullanılan belirtecin serebral amiloid yükü temsil ettiği düşünülen plazma A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 oranıdır (23). Fakat genelde bu çalışmalarda AH için doğuştan gelen bir risk faktörü olan APOE genotipi ile A $\beta$ 42/A $\beta$ 40'ın göstermiş olduğu tutarlılık, serebral A $\beta$  patolojisinin APOE genotipinden ayrı mekanizmaya sahip olması sebebi ile tartışmalıdır (96).

AH'yi teşhis etmede tek aday belirteçten ziyade belirteç paneli kullanmanın hastalığı karakterize etmede daha iyi performans göstereceği de düşünülmüştür (100). Bu nedenle AH ve prodromal aşama olan Hafif kognitif bozukluğu ayırt etmek için bir dizi kan bazlı biyobelirteç paneli kullanılmıştır. Her ne kadar AH'yi bilişsel bozukluğu olmayan gruptan %90 doğrulukla ayırt edip 5 yıllık süreç içerisinde hafif kognitif bozukluktan AH'ye ilerlemeyi tanımladığını söyleyen 18 plazma proteini tespit edilmiş olsa bu bulgular diğer araştırmacıların tekrarlamış olduğu araştırmalarda başarılı sonuçlanmamıştır (101, 102). Diğer yandan AH demansını tek başına ayırt etmede başarılı olan f-tau217 ile prelinik Alzheimer bilişsel bileşik (PACC) skorunun birleştirilmesi ile HKB'den AH demansına ilerleme riskinin güçlü bir şekilde ayrıştırıla bilindiği gösterilmiştir (103). Buna ek olarak yüksek performanslı testler kullanıldığında plazma f-tau181, f-tau231 ve GFAP'ın HKB'si olan semptomatik hastalarda gelecekte AH demansı gelişimini tahmin etmek için tutarlı belirteçler olduğu gösterilmiştir (23, 33, 47).

AH demansını diğer demans türlerinden ayırt etmede de belirgin şekilde önce çıkan plazma biyobelirteci olarak f-tau testleri karşımıza çıkmaktadır (41). Diğer demanslardan BOS ve PET belirteçleri kadar yüksek performansla tek başına AH demansını ayırt etmede başarılıdır, f-tau217 testi diğer tau varyantlarına göre öne çıkmaktadır (96). Plazma f-tau varyantlarının aynı zamanda A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ve nörofilament hafif zincir ile kombine edildiğinde bilişsel bozukluğu olmayan bireylerin global bilişsel düşüşlerini tahmin etmede de, f-tau ve nörofilament hafif

zincir birleřtirildiđi durumda ise HKB den global biliřsel dűřűe gidiři tahmin etmede bařarılı olduđu gűrűlműřtűr (23, 104).

Sonuç olarak tűm gűncel bilgileri ele aldıđımızda kan bazlı biyobelirteçlerin AH patolojisi ve hastalıđın farklı evrelerini ayırt etmede bařarılı olduđu gűrűlműřtűr. Fakat uygulanabilirlik konusunda hala BOS ve PET taramaları ile dođrulama ve farklı kohort çalıřmaları ile tutarlı sonuçlar elde etmesi açısından var olan arařtırma bořluklarının kapatılması gerekmektedir.



## 5. MATERİYAL VE METOT

Tez çalışması kapsamında iki farklı etik kurula başvurulmuş olup sırasıyla İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 27.06.2018 tarihli 351 karar no ve İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 20.06.2018 tarihli 39 karar no ile onay alınmıştır (Bölüm 11).

Çalışmaya dâhil edilen tüm katılımcılardan “Katılımcı bilgi ve onam formu” alınmıştır. Vesayet altında bulunan katılımcıların onam formları vasileri tarafından onanmıştır (Ek-1).

Çalışma kapsamında kullanılan tüm hayvanlar İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilim ve Teknolojileri Araştırma Enstitüsü (SABİTA) bünyesinde hizmet veren Tıbbi Araştırma Merkezi'nden (MEDİTAM) temin edilmiş olup tüm deneyler Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkez (REMER) laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

### 5.1. Katılımcılar

Bu araştırmaya; İstanbul İl'inde özel yaşlı bakım merkezinde kalan 5 Alzheimer hastası ve Bir Eğitim ve Araştırma Hastanesi fiziksel tıp ve rehabilitasyon kliniğinde yatarak tedavi gören, hastalarla yaş ve cinsiyet bakımından eşleşmiş 5 sağlıklı yaşlı kontrol dâhil edilmiştir.

Katılımcıların gerekli nörolojik muayenesi uzman hekim tarafından gerçekleştirilmiştir. Hasta grup için detaylı özgeçmiş ve aile öyküsü sorgulanmıştır. Kognitif düzeyin belirlenmesi için hasta ve sağlıklı yaşlı gruba eğitim durumlarına göre uygun Standardize Mini Mental Testi uygulanmıştır.

#### 5.1.1. Alzheimer hastalarının dâhil edilme ve dışlama ölçütleri

Belirtilmiş olunan dâhil edilme ve dışlama ölçütlerine uygun olarak bireyler değerlendirilmiş ve Alzheimer grubuna dâhil edilmiştir. Dâhil olma ve dışlama ölçütleri;

- DSM-IV ve NINCDS-ADRDA ölçütlerine göre tanı almış olması
- Kolinerjik monoterapi veya memantin ile kombine edilmiş kolinerjik tedavi altında olması
- Standardize Mini Mental Testinden 20 ve altında puan almış olmak



- Kafa travması öyküsü ve diğer nörolojik bozukluk öyküsü olmaması
- Alkol ve madde bağımlılığının bulunmaması

### **5.1.2. Sağlıklı yaşlı kontrollerin dâhil edilme ve dışlama ölçütleri**

Belirtilmiş olunan dâhil edilme ve dışlama ölçütlerine uygun olarak bireyler değerlendirilmiş ve kontrol grubuna dâhil edilmiştir. Dâhil olma ve dışlama ölçütleri;

- Standardize Mini Mental Testinden 25 ve üzerinde puan almış olmak
- İnme, epilepsi ya da bilişsel işlevleri etkileyen nörolojik ve/veya psikiyatrik bozukluğun bulunmaması
- Merkezi sinir sistemini aktif olarak etkileyen ilaç kullanılmaması (benzodiazepin vb.)

### **5.2. Plazma Örneklerinin Toplanması ve Saklanması**

Kriterleri sağlayan hasta ve sağlıklı kontrol grubunda yer alan bireylerden, HEPARİN'li tüplere uyumadan hemen önce akşam kanı ve uykudan hemen sonra sabah kanı olmak üzere iki farklı zaman diliminde açlık sonrası 10 ml periferik kan örneği alınmıştır. Örnekler alındıktan sonra takip eden 1 saat içerisinde soğutmalı santrifüjde 1500 g'de 15 dakika santrifüj edilerek plazma elde edilmiştir. Elde edilen plazma numuneleri alikotlanarak -80 °C'de analiz edilene dek saklanmıştır.

### **5.3. Primer Hipokampal Nöron Kültürü**

#### **5.3.1. Materyal**

##### **5.3.1.1. Deney hayvanı**

Tez çalışması kapsamında yapılan deneylerde postnatal 0-3 günlük Balb/c fareler kullanılmıştır.

##### **5.3.1.2. Nöron kültürü için kullanılan reaktif ve sarf malzemeleri**

Nöron kültürü için kullanılan cihaz, reaktif ve sarf malzemeleri tablo 5.3.1'de detaylı şekilde açıklanmıştır.

**Tablo 5.3 1** Nöron kültürü için gerekli cihaz, reaktif ve sarf malzeme listesi

<b>Reaktif ve Sarf Malzemeler</b>	<b>Firma</b>	<b>Katalog/Model No</b>
Poly-D-lisin	Sigma	P7280
Hibernate-A	Gibco	A1247501
Leibovitz L-15	Multicell	323-050-CL
Neurobasal-A	Gibco	10888-022
Antibiyotik	Multicell	450-115-EL
GlutaMAX	Gibco	35050-061
B27	Gibco	17504-044
Papain	Sigma	P4762
DNaz	Sigma	D4513
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma	F4135
DPBS	Gibco	14190-094
96 kuyulu plaka (siyah)	Corning	3904
Petri kabı 35 mm	TPP	93060
Santrifüj tüpü 15 mL	CAPP	5100015C
Mikrosantrifüj tüpü 1.5 mL	CAAP	5101500C
İnkübatör	Thermo Scientific	Forma Steri-Cycle
Santrifüj	Thermo Scientific	SL 16R
Laminar Akımlı Kabin	Thermo Scientific	Safe 2020
Stereo mikroskop	ZEISS	SteREO Discovery
Saf Su Cihazı	Milipore	Direct-Q™8

### 5.3.1.3. Vasatların hazırlanması

Vasatlar, kültürün hemen öncesinde hazırlanmış olup vasat içerikleri aşağıda belirtildiği gibidir.

- **Diseksiyon vasatı;** Hibernate-A içerisine %1 Antibiyotik ve %1 GlutaMAX eklenerek hazırlanmıştır. Diseksiyon aşamasına kadar 4°C'de bekletilmiştir.
- **Kültür vasatı A;** 990 µL L-15 içerisine %1 Antibiyotik, %1 GlutaMAX, %2 B27, %1 Papain ve %1 DNaz eklenerek hazırlanmıştır. Kullanım süresine kadar 4°C 'de bekletilmiştir.
- **Kültür vasatı B;** L-15 içerisine %1 Antibiyotik, %1 GlutaMAX, %2 B27 ve %10 FBS eklenerek hazırlanmıştır. Kullanım süresine kadar 4°C 'de bekletilmiştir.
- **Yaşam vasatı;** Neurobasal-A içerisine %1 Antibiyotik, %1 GlutaMAX ve %2 B27 eklenerek hazırlanmıştır. Hücrelerin ekim aşamasına kadar 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda bekletilmiştir.

#### **5.3.1.4. Kültür petri kaplarının kaplanması**

Diseksiyon gününden 1 gün önce petri kapları, steril ddH<sub>2</sub>O içerisinde 1:10 oranında seyreltilmiş poly-D-lisin solüsyonu ile kaplanmıştır. Kaplanan petri kapları gece boyunca 37°C'de bekletilmiştir. Ekim aşamasından 1 saat önce poly-D-lisin solüsyonu aspire edilerek steril ddH<sub>2</sub>O ile (3 kez) iyice yıkanmış ve kabin içerisinde kurumaya bırakılmıştır.

#### **5.3.2. Hipokampus diseksiyonu**

Hipokampal nöron kültürü için yenidoğan (P0-P3) fare yavrularının hipokampusu kullanılmıştır. Farelerin steril şartlarda hipokampal diseksiyonu gerçekleştirilmesi için tüm diseksiyon aletleri ve fare %70 EtOH ile yıkanmıştır. Laminer kabin içerisinde gerçekleştirilen dekapitasyon işlemi peşi sıra beyin dikkatlice çıkarılıp soğuk tabla üzerindeki diseksiyon vasatı içerisine aktarılmıştır. Her iki hipokampus Carl Zeiss stereo mikroskobu altında tanımlandıktan sonra uygun yöntem ile korteksten ayrılmıştır. Sonrasında ise hipokampusün bütünlüğü bozulmadan üzerindeki meninkslerden ayrıştırılmıştır.

#### **5.3.3. Hipokampus hücrelerinin elde edilmesi**

Çıkarılmış olan hipokampusler enzimatik ayrışımın gerçekleşecek olduğu kültür vasatı A içerisine aktarılarak 4°C'de 45 dakika agitatorde bekletilmiştir. Süre sonunda tüp içerisine %1 DNaz eklenerek önce 1000 µl pipet ucu sonra ise 200 µl pipet ucu ile doku homojenize olana dek tritürasyon işlemine tabi tutulmuştur. Son olarak solüsyon insülin iğnesinden geçirilerek mekanik olarak ayrıştırılma işlemi tamamlanmış olup enzim inhibitörü içeren kültür vasatı B içerisine 4°C'de 15 dakika süspanse edilmiştir. Süre sonunda 1000 rpm de 5 dk santrifüj edilerek hücreler dibe toplanmıştır. Süpernatant atılarak hücre peleti üzerine yaşam vasatı eklenmiştir. Hücre sayımı sonrasında 96 kuyulu plakaya 100 µl/kuyu içerisinde  $4 \times 10^4$  nöron olacak şekilde ekim gerçekleştirilirken, 35 mm petri kabına  $5 \times 10^5$ /ml nöron olacak şekilde ekim gerçekleştirilmiştir. Hücreler yapıştıktan sonra (~ 2 saat) 1,5 ml olacak şekilde yaşam vasatı ile tamamlanmıştır.

#### 5.4. Plazma Hazırlama ve Optimizasyon Çalışmaları

EDTA, sitrat ve heparin antikoagülanı içeren kan tüpleri ile elde edilen plazma örneklerinin, kullanılan antikoagülan maddeye göre hipokampal nöronlar üzerindeki etkisinin tanımlanması için nöron kültürünün 5. gününde taze hazırlanan yaşam vasatı içerisine %10 oranında plazma eklenmiştir. Takip eden her üç günde bir mevcut yaşam vasatının yarısı taze hazırlanan yaşam vasatı ile değiştirilmiştir. Süreç Carl Zeiss Invert Mikroskop ile 1, 3, 6 ve 9. gün de takip edilmiştir.

Plazma oranı ve inkübasyon süresinin optimizasyonu için primer hipokampal nöronların viabilitesi, farklı oranlardaki plazma (%1, %5 ve %10) maruziyetinden sonra farklı zaman aralığı (1 saat, 12 saat ve 24 saat) için CellTiter-Blue testinin nicel verileriyle birlikte kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Hücre ekimini takip eden 3. gün de (DIV3) yaşam vasatları deney grupları ile değiştirilmiştir. Deney grupları sırasıyla belirtildiği gibidir; kontrol (plazmaya maruz kalmamış hücre-100 µl NBA), %1 uykudan önce plazma (99 µl NBA+ 1 µl plazma), %5 uykuda önce plazma (95 µl NBA+ 5 µl plazma), %10 uykuda önce plazma (90 µl NBA+ 10 µl plazma), %1 uykuda sonra plazma (99 µl NBA+ 1 µl plazma), %5 uykuda sonra plazma (95 µl NBA+ 5 µl plazma), %10 uykuda sonra plazma (90 µl NBA+ 10 µl plazma). Her zaman aralığından (1 saat, 12 saat ve 24 saat) sonra yaşam vasatına 1:1000 seyreltilmiş Hoechst33342 ve 1:1000 seyreltilmiş Propidium İyodür (PI) eklenerek inkübatörde inkübe (Hoechst33342 10 dakika; PI 5 dakika) edilmiştir (Tablo 5.4.1). Süre sonunda Spinning Disk Konfokal Mikroskobu (ZEISS) ile 5x5 kare olacak şekilde alandan görüntü alınmıştır. Canlı ve ölü canlı hücre sayımı Image J yazılımı aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. Nöronal ölüm yüzdesi, ölü hücrelerin (PI+) toplam Hoechst boyası ile işaretlenmiş hücrelere oranı ile hesaplanmıştır.

**Tablo 5.4.1** Hücre canlılığı değerlendirilmesi için kullanılan cihaz, boya ve reaktif listesi

<b>Materyal</b>	<b>Firma</b>	<b>Katalog/Model No</b>
Propidyum iyodür (PI)	Sigma	P4170
Hoechst	Thermo Fisher Scientific	H3570
CellTiter-Blue	Promega	G8081
Spinning Disk Konfokal Mikroskobu	ZEISS	Cell Observer SD Spinning Disk Time Lapse Mikroskop
Invert Mikroskop	ZEISS	Primovert
Mikroplate okuyucu	Molecular Devices	Spectramax i3 Multi-Mode Mikroplate okuyucu

### 5.5. Hücre Canlılığı Analizi

Uykudan önce ve uykudan hemen sonra alınmış olunan plazma örneklerinin hipokampal nöron kültürü üzerindeki sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi adına CellTiter-Blue reaktifi kullanılmıştır (Tablo 5.4.1). Tüm deney grupları (Bölüm 5.4.) için 96 kuyulu hücre kültürü plakasına ( $10 \times 10^4$  hücre/kuyu) hipokampal nöron ekilip  $37^\circ\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$  ortamda 72 saat inkübe edilmiştir. Nöron kültürünün 3. gününde deney grupları için var olan yaşam vasatı, içerisinde %5 oranında plazma içeren yaşam vasatı ile değiştirilmiştir. 1 saatlik  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübasyon sonrasında tüm kuyulardaki vasat aspire edilip bir kez PBS ile yıkanmıştır. Her kuyucuğa 100  $\mu\text{l}$  taze yaşam vasatıyla birlikte 20  $\mu\text{l}$  CellTiter-Blue reaktifi eklenmiş ve hücre kültürü plakaları  $37^\circ\text{C}$ 'de 2 saat inkübe edilmiştir. Ardından hücrelerin 560/590 nm'deki floresan (FL) ışımaya değerleri Spectramax i3 Multi-Mode Mikroplate okuyucu ile ölçülmüştür.

Canlı hücrelerin yüzdesinin hesaplanabilmesi için deney FL değeri, kontrol FL değeri ile takip eden denkleme kullanılarak normalize edilmiştir;

$$\text{Hücre viabilitesi (\%)} = \frac{\text{Deney FL değeri}}{\text{Kontrol FL değeri}} \times 100$$

## 5.6. Proteomiks Çalışması

### 5.6.1. Materyal

Alzheimer hastaları ve sağlıklı yaşlı yetişkinlerden alınan uyku öncesi ve uyku sonrası kan örneklerinden bölüm 5.2. de belirtildiği şekilde plazma elde edilmiş ve alikotlanarak steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Örnekler çalışılana kadar -80 °C de saklanmıştır.

Proteomiks çalışması için kullanılan cihaz, reaktif ve sarf malzemeleri tablo 5.6.1’de detaylı şekilde açıklanmıştır.

**Tablo 5.6. 1** Proteomiks çalışması için gerekli cihaz, reaktif ve sarf malzeme listesi

Materyal	Firma/Model
LC-MS/MS Kütle Spektrometresi	Waters Corporation, Synapt G2Si HDMS
ACQUITY UPLC Symmetry C18 Trap Column	Waters Corporation, ACQUITY UPLC M-Class
ACQUITY UPLC HSS T3 C18 Column	Waters Corporation, ACQUITY UPLC M-Class
Vorteks	Benchmark Scientific, H5000-HC
Spin down santrifüj	Sprout
Santrifüj	Orto Alsera, Biocen22R
Liyafilizatör	Labconco FreeZone, ABD
-80°C ultra derin dondurucu	Thermo Scientific
Qubit™ Protein and Protein Broad Range (BR) Assay Kits	Invitrogen, Q33211
High-Select™ Top14 Abundant Protein Depletion Mini Spin Columns Kit	Thermo Scientific, A36370
FASP Protein Digestion Kit	EXPEDEON, 44250
LoBind Mikrosantrifüj Tüpleri	Eppendorf
Acetonitrile Hypergrade For Liquid Chromatography Lichrosolv	Merck

### 5.6.2. Kütle spektrometresi analizi için örnek hazırlama

Çalışmaya başlamadan önce -80 °C saklanmış olan plazma örnekleri çözülüp High Select™ TOP 14 Abundant Protein Depletion Mini Spin Columns Kit kullanılarak ön işleme tabi tutulmuştur. Bu şekilde plazma da yüksek derişimde bulunan proteinler sırasıyla; albümin, IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, kappa ve lambda hafif zincirleri, a1-antitripsin, a1-asit glikoprotein, a2-makroglobulin, apolipoprotein A1, fibrinojen, haptoglobin ve transferrin elimine edilmiştir. Basitçe, 10 µl plazma örneği kit protokolüne göre High Select™ TOP 14 Abundant Protein Depletion Mini

Spin Kit kolonuna (Thermo Fisher Scientific, ABD) yüklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakika boyunca plazma ve reçine bulamacı nazıkçe karıştırılarak kolon içerisinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kolon 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirilerek 1000 g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Toplanan düşük derişimli bileşenler steril bir tüpe aktararak aseton çöktürme yöntemi ile konsantre edilmiştir. Çöken protein pelleti 8M üre içinde çözülerek örneklerin protein konsantrasyonu Qubit protein analiz kiti kullanılarak ölçülmüştür.

Her örnekten alınan 50 µg protein, filtre destekli numune hazırlama (FASP) kit protokolüne bağlı kalınarak işlenmiştir. Bunun için her bir örnek kit içinde bulunan filtrelili tüplere aktarılıp üzerine 200 µl Tris-HCl içerisinde çözülmüş üre eklenerek 14,000 g'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Bu işlem bir kez daha tekrarlanmıştır. Toplama tüpündeki sıvı kısım atıldıktan sonra geriye kalan konsantre ürün üre tamponu içerisinde 10X iyodoasetamid (IAA) solüsyonu ile 1 dakika vortekslenip 20 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. Süre sonunda 14,000 g'de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek IAA ortamdan uzaklaştırılmıştır. Örnekler 100 µl üre tamponu ile seyreltilerek 14,000 g'de 15 dakika iki kez daha santrifüj edilmiştir. Daha sonra tüpte biriken sıvı kısım atılıp 100 µl 50 mM amonyum bikarbonat ilave edilip örnekler 14,000 g'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Örnekler gece boyunca 37 °C'de inkübe edilerek tripsin (1 µg/75 µl, 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisi içinde) ile sindirilmiştir. Takip eden günde filtre yeni tüplere aktararak üzerine 40 µl 50 mM amonyum bikarbonat ilave edilip örnekler 14,000 g'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Bu işlem bir kez daha tekrarlanmıştır ve filtreye 50 µl 0,5 mM sodyum klorür çözeltisi eklenerek 14,000 g'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süreç sonunda filtre çıkarıldıktan sonra geriye kalan sindirilmiş proteinler liyofilize edilip sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) analizine dek - 80 °C'de saklanmıştır. Liyofilize haldeki örnekler 20 µl %0,1 formik asit içeren çözeltide çözülüp peptid konsantrasyonları Qubit cihazı ile ölçülmüştür. 100 ng/µl peptid konsantrasyonuna sahip örneklerin cihaz enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir.

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

LC-MS/MS verileri SYNAPT2-Si yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresinin ACQUITY UPLC M ile birleştirilmesi ile elde edilmiştir. Örnekler standart veri bağımsız edinim modu ile analiz edilmiştir. %97'lik mobil faz A solventi, %0,1 formik asit içeren yüksek saflıkta su iken; mobil faz B solventi, %0,1 formik asit içeren yüksek saflıkta asetonitrildir. Peptidler (1µg) trap kolona (Symmetry C18, 5µm, 180 µm i.d. × 20 mm, Waters) yüklenmesinin ardından 55 °C'de %3'ten %40'a kadar değişen gradient ile 0.300 ul/dk akış hızında tuzak kolondan analitik kolona (HSS T3 C18, 1.8 µm, 75 µm i.d. × 250 mm, Waters) 90 dakikalık bir elüsyonla ayrılmıştır. MS ve MS/MS fonksiyonları pozitif iyon modu ile birlikte 0,7 saniyelik aralıklar ile 10 volt düşük enerji ve 30 volt yüksek enerji kullanarak peptid kütle/elektriksel yük değeri ve beraberinde iyon bilgisi kaydedilmiştir.

### 5.6.4. Protein tanımlanması ve kantifikasyonu

Ham veriler Progenesis-QI for Proteomics (Waters) yazılımı kullanılarak işlenip Homo sapiens Evrensel Protein Kaynağı dizi veri tabanında taranmıştır (UniProt, Ocak, 2022). Tüm proteinler en az 1 benzersiz peptid dizisi ile tanımlanmıştır. Göreceli protein bolluk oranları (kat değişiklikleri) karşılaştırılan her iki grup (Uykudan önce plazması: AH – Sağlıklı yaşlı; Uykudan sonra plazması: AH – Sağlıklı yaşlı; AH: Uykudan önce plazması – Uykudan sonra plazması; Sağlıklı yaşlı: Uykudan önce plazması – Uykudan sonra plazması) arasında hesaplanmıştır. Her protein oranı için ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmış olup bu ölçümleri karşılaştırmak için çift yönlü t-testi kullanılmıştır. Bu testlerden elde edilen p değerleri kaydedilerek iki bağımsız deneyden elde edilen  $p < 0.05$  olan protein oranlarının anlamlı değiştiği kabul edilmiştir. Grup karşılaştırmaları sonucunda diferansiyel protein ekspresyonu  $p < 0,05$  ve  $|\log_2FC| > 0.5$  kabul edilerek volkan grafiğiyle görselleştirilmiştir ve grup içi ve gruplar arasındaki protein dağılımı Venn şeması ile gösterilmiştir.

### 5.6.5. Data analizi

Anlamlı şekilde ekspresyonu değişmiş olan proteinler, fonksiyonel zenginleştirme analizi için g:Prolifer aracı ile analiz edilmiştir (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>) (105). Zenginleştirme analizinde hedef genler ve



ilişkili işlevlerin belirlenmesi için kullanılan veri tabanları aşağıda belirtildiği gibidir ve spesifik bir organizma olarak, Homo sapiens (insan) seçilmiştir. Gen ontoloji analizleri GO moleküler fonksiyon (GO: MF), GO hücresel bileşen (GO: CC) ve GO biyolojik süreç (GO: BP) olarak sırayla gerçekleştirilmiştir. Kullanılan biyolojik yollarla KEGG, Reactome ve WikiPathways veri tabanlarıdır. Kullanılan protein veri tabanları ise İnsan Protein Atlası ve CORUM'dur.

Ekspresyonu değişmiş olan protein listelerinin halihazırda bilimsel literatürde var olan proteinler arasındaki ilişkilere dayanan protein etkileşim ağ yapısını tanımlayabilmek için STRING (Sürüm 11.5, <https://string-db.org/>) aracı kullanılmıştır (106).

Cytoscape uygulaması ise (<https://apps.cytoscape.org/>) StringApp aracılığı ile metin madenciliğine dayalı olarak hali hazırda bilimsel literatürde AH ile ilişkili proteinlere sahip String disease alt ağı (DOID:10652) ile çalışma sonucunda anlamlı şekilde ekspresyonu değişmiş olan protein listelerinin karşılaştırılması için kullanılmıştır (107).

### **5.7. İstatiksel Analiz**

Fonksiyonel zenginleşme analizi için kullanılmış olan g:prolifer analizindeki anlamlılık eşiği g:SCS eşiği ve kullanıcı eşiği 0.05 olarak belirlenmiştir. Anlamlı olarak değişmiş tüm yollar ve etkileşimler (PPI) için p değeri <0.05 olarak kabul edilmiştir.

Gruplardaki denek sayımız (n=5) kısıtlı olduğu ve veri normal dağılım göstermediği için non-parametrik testler tercih edilmiştir. Bu sebeple gruplar arasındaki klinik ve demografik özelliklerin karşılaştırılması için sırasıyla Fisher Exact testi ve Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Üç ve daha fazla değişkenin karşılaştırıldığı durumda ise Kruskal Wallis H sıralamalı tek yönlü varyans analizi uygulanmıştır. Ardından ikili karşılaştırmalar için ise post-hoc Dunn çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Tüm istatistiksel değerlendirmeler için anlamlılık değeri p <0.05 olarak kabul edilmiştir.

## 6. BULGULAR

### 6.1. Katılımcıların Klinik ve Demografik Özellikleri

Çalışma kapsamında belirlenmiş olan kriterler doğrultusunda 5 Alzheimer tanısı almış olgu ve 5 sağlıklı yaşlı yetişkin olmak üzere toplamda 10 kişi çalışmaya dâhil edilmiştir. Tüm örneklemin 6'sı (%60) kadın ve 4'ü (%40) erkektir, gruplar arası kadın ve erkek sayısı birbirine eşit olup her iki grup için cinsiyet faktörü anlamlı farklılık göstermemektedir ( $p < .999$ ). Katılımcıların ortalama yaşı 78.60 yıldır (SD=6.36) ve yaşları 70 ila 88 yıl arasında değişmektedir. İstatiksel olarak gruplar arasında yaş faktörü açısından anlamlı farklılık izlenmemiştir ( $U=2.50$ ,  $p=.056$ ). Eğitim düzeyi 0 ile 15 yıl arasında değişmektedir ve ortalama 7 (SD = 5.92) yıldır. Gruplar arasında eğitim düzeyi açısından anlamlı farklılık yoktur ( $U=12$ ,  $p=.952$ ). Olguların ve sağlıklı yaşlı yetişkinlerin kognitif yeterlilikleri SMMDT ile değerlendirilmiş ve ortalama puanları 20.7 (SD = 7.13) olduğu kaydedilmiştir. SMMDT puan ortalamasının olgularda istatistiksel açıdan anlamlı şekilde daha düşük olduğu görülmüştür ( $U=.00$ ,  $p=.008$ ). Tüm katılımcıların gruplar arası betimleyici özellikleri tablo 6.1.1'de özetlenmiştir.

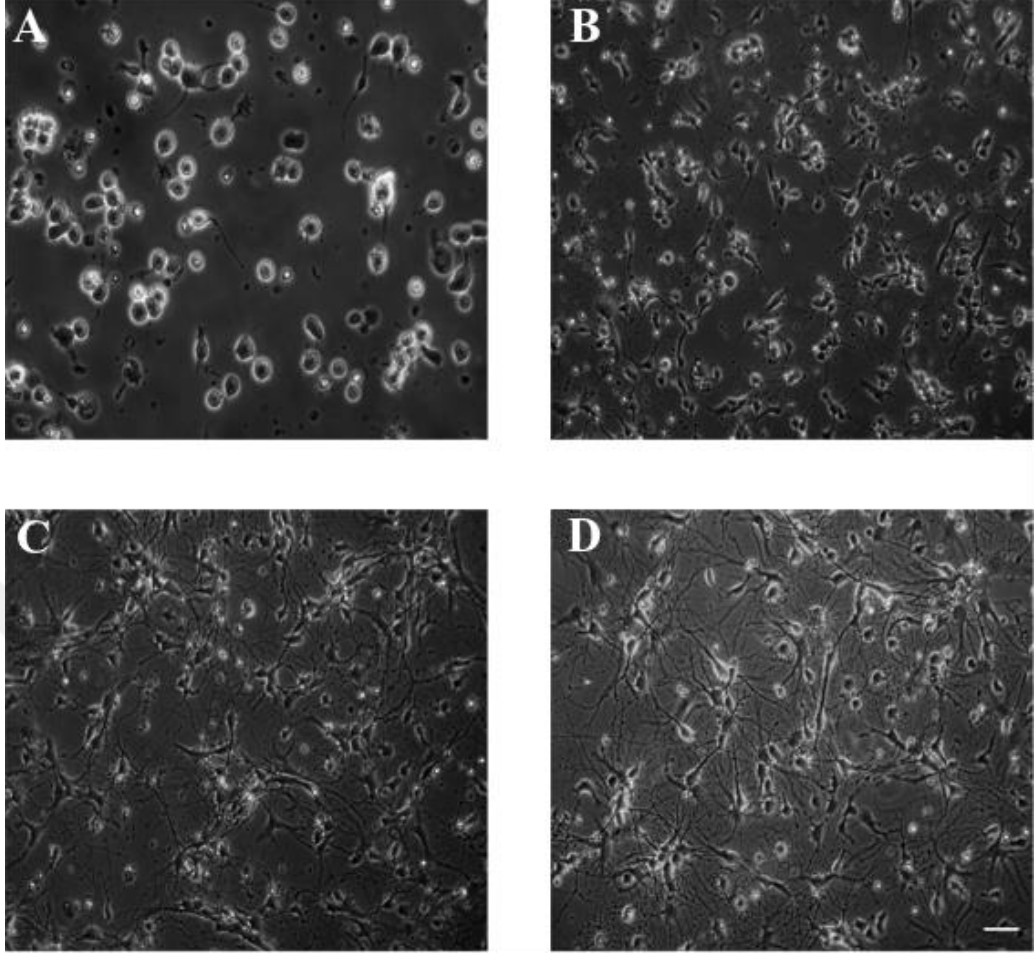
**Tablo 6.1.1** Çalışmaya katılan olguların sosyodemografik bilgileri

	Alzheimer				Sağlıklı Yaşlı Yetişkin				<i>p</i>
	<i>N</i>	%	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	%	<i>M</i>	<i>SD</i>	
Cinsiyet	Kadın	3	30		3	30			.999 <sup>a</sup>
	Erkek	2	20		2	20			
Yaş		5	83	4.32	5	72	5.32	.056 <sup>b</sup>	
Eğitim yılı		5	5	5.84	5	8	6.68	.952 <sup>b</sup>	
SMMDT		5	14	4.27	5	27	1.78	.008 <sup>b</sup>	

<sup>a</sup> Fisher Exact Test <sup>b</sup> Mann Whitney U testi

### 6.2. Hipokampal Nöron Kültürü ve In Vitro Gün (DIV) Karakterizasyonu

Bir önceki bölümde açıklanmış olunan protokole bağlı kalarak Yenidoğan hipokampal nöron izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Hipokampal nöronların ekimini takiben hücrelerin sağlıklı bir şekilde petri kabına tutunduğu görülmüştür (Şekil 6.2.1). Hücre ekimini takip eden 2. günde (DIV 2) nöronlar da nörit gelişimi, diğer hücrelerle bağlantıları başlatan lamelliapodia gelişimi ve glial proliferasyon artışı kaydedilmiştir. Bu sebeple plazmanın hipokampal nöronlar üzerindeki toksisitesini değerlendirmek için ekim gününü takip eden 3. günde (DIV3) nöronlar plazma ile muamele edilmiştir.



**Şekil 6.2.1** Kültür ortamında yetiştirilen hipokampal nöronların gelişimi.

A-DIV 0, B-DIV 1, C-DIV 2 ve D-DIV 3'teki kültürlenmiş hipokampal nöronların mikrografları ile kültürde hipokampal nöron ve glial hücrelerin büyümesi ve olgunluğu ile artan karmaşık kültür ortamı gösterilmiştir. Ölçek çubuğu = 100µm.

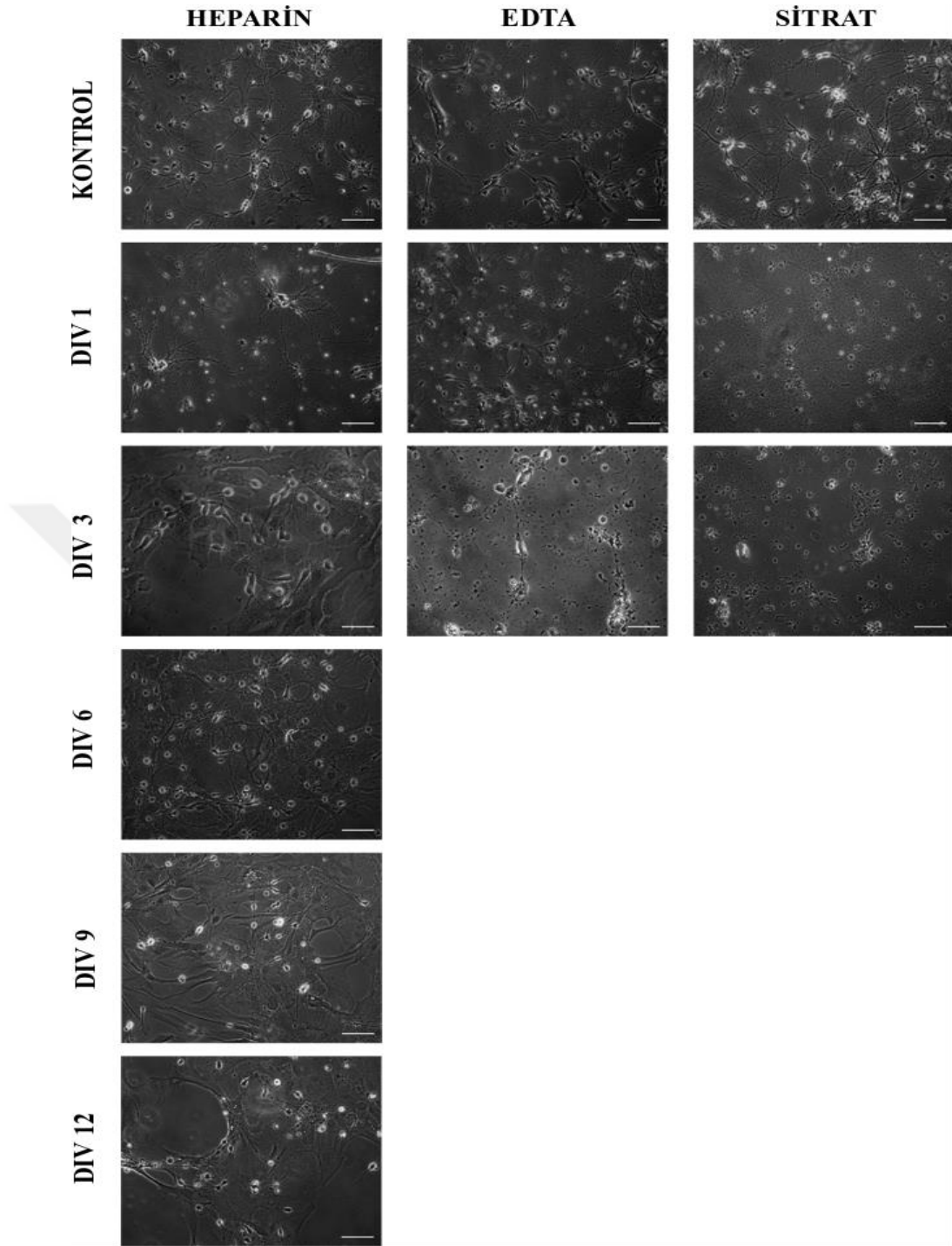
### **6.3. Plazma Optimizasyon Sonuçları**

Hipokampal nöron kültürüne eklenecek efektif plazma oranı ve inkübasyon süresinin belirlenebilmesi için bir dizi deneme çalışması yapılmıştır. Deneyler sonucunda elde edilen etkin plazma oranı ve inkübasyon süresi belirlenerek, tez çalışması kapsamında toplanan örneklere ait viabilite çalışmalarında optimum koşul olarak kullanılmıştır.

#### **6.3.1. Antikoagülan seçiminin hipokampal nöronların in vitro hayatta kalımı üzerindeki etkisi**

İlk olarak kullanılan antikoagülan türünün (EDTA/Sitrat/Heparin) hipokampal nöron kültür ortamındaki olası toksik etkisini inceledik. Sonuçlar, EDTA ve Sitrat antikoagülan içeren kan tüplerinden elde edilmiş olan plazmanın kültüre eklenmesi ile birlikte kültür ortamını bozarak kültürdeki hipokampal nöronların canlılığı üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Şekil 6.3.1’de görüldüğü üzere DIV 1’i takip eden süreçte nöronların aksonal harabiyeti belirgin şekilde kaydedilmiştir.

Heparin antikoagülanı kullanılarak elde edilen plazma örneğinin eklendiği kültürlerde ise aynı olumsuz etki gözlemlenmemiştir (Şekil 6.3.1). Ek olarak Heparin antikoagülanı ile elde edilmiş plazmanın eklendiği kültürlerde DIV 3’ü takiben glial aktivasyonda artış ve proliferasyon izlenilmiştir.



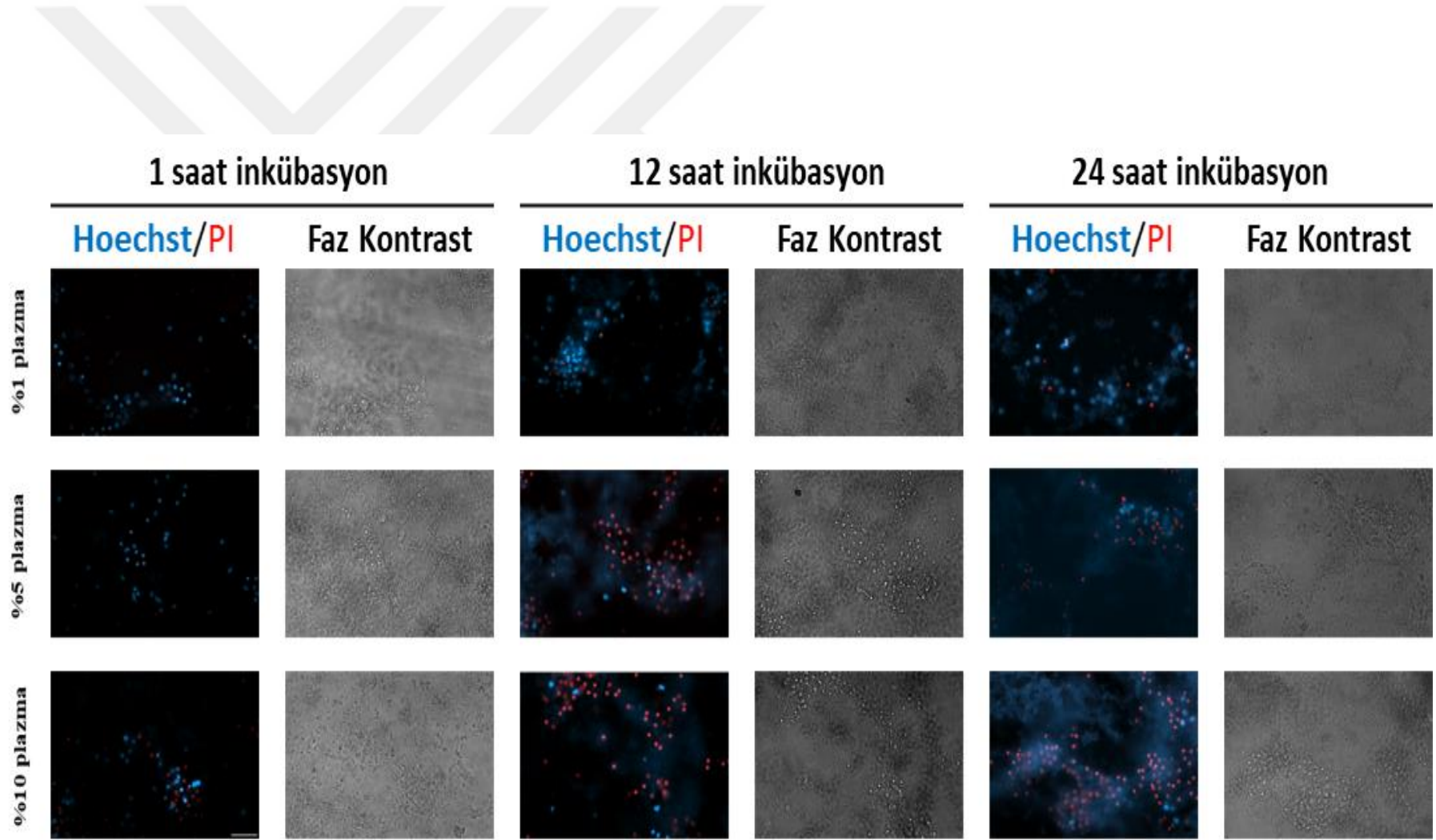
**Şekil 6.3.1** Antikoagülan seçimine bağlı olarak elde edilen plazma örneklerinin primer hipokampal nöron kültürü üzerindeki etkisi

Ekimi takip eden 5. gün itibari ile hipokampal kültür ortamına farklı antikoagülanlar ile elde edilen plazma %10 oranında kültür vasatına eklenmiştir. Plazmanın eklenmesini takip eden 1., 3., 6., 9. ve 12. günlerde kayıt altına alınan mikrograflar ile kültürdeki hipokampal nöron ve glial hücre değişimi gösterilmiştir. Ölçek çubuğu = 50µm.

### **6.3.2. Plazma oranı ve inkübasyon süresinin nöronal hayatta kalım üzerine etkisi**

Sağlıklı bireyden alınan plazma oranları ve inkübasyon sürelerinin nöron canlılığı üzerindeki etkisi ve optimizasyonu için şekil 6.3.2’de görüldüğü üzere ölü hücre çekirdeklerini işaretleyen PI ve hem ölü hem canlı hücreleri işaretleyen Hoechst boyama yöntemi ile ölü ve canlı hücre sayıları niceleyici olarak mikroskopi analizi ile değerlendirilmiştir. PI ve Hoechst boyaması sonucunda ölü ve canlı hücre sayımı ImageJ yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

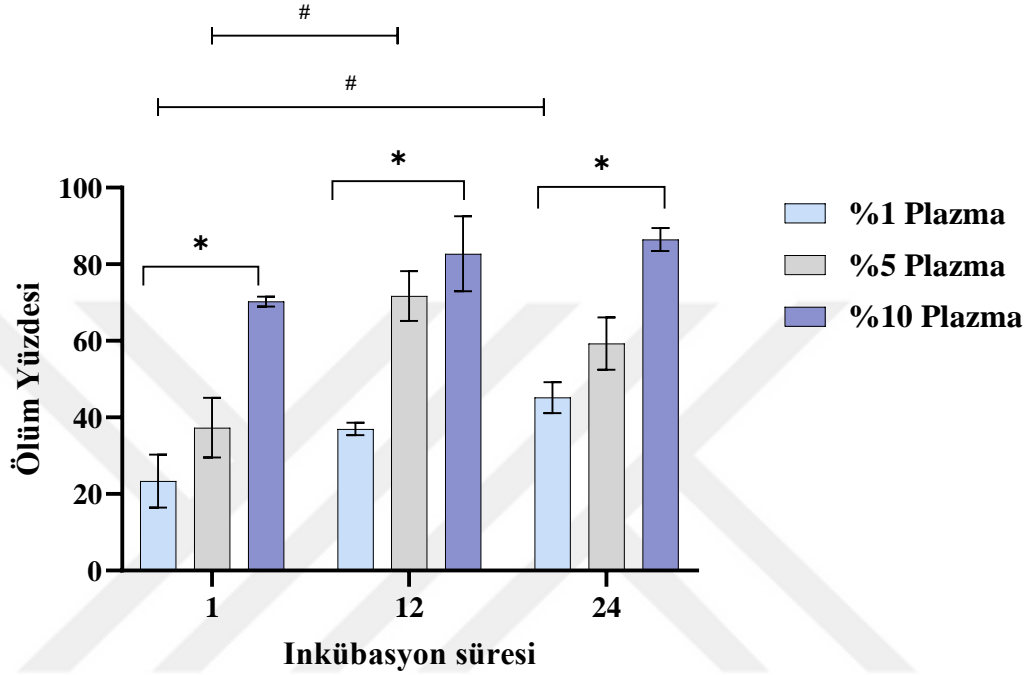




**Şekil 6.3.2** Plazma oranı ve inkübasyon süresine bağlı olarak hipokampal nöronların viabilitesi Propidium iyodür (kırmızı) ve Hoechst 33342 (mavi) boyama ile gösterilmiştir.

Ölü hücreler kırmızı ile temsil edilirken canlı hücreler mavi ile temsil edilmektedir. Ölçek çubuğu = 100 µm.

Şekil 6.3.3’de resmedilen grafikte görüldüğü üzere plazma örneğinin hipokampal nöronlara 3 farklı oranda (%1 – %5 – %10) ve 3 farklı inkübasyon süresince (1 saat – 12 saat – 24 saat) muamelesi sonucunda nöronal ölüm yüzdesi, plazma oranı ve inkübasyon süresine paralel olarak artış göstermiştir.



**Şekil 6.3.3** Plazma oranı ve inkübasyon süresine bağlı olarak değişen nöronal ölüm yüzdesi (n=3).

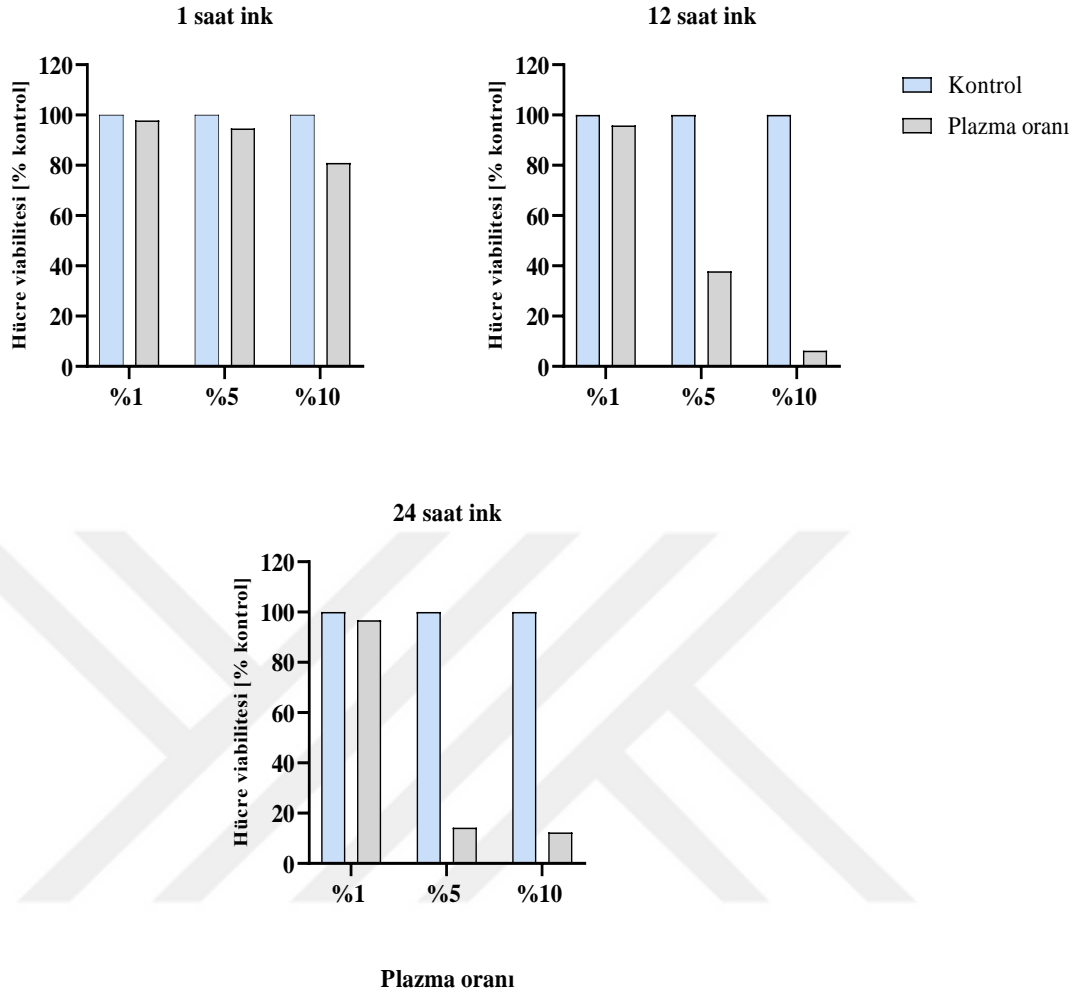
Her üç inkübasyon süresince ortalama ölüm yüzdesinin kültür ortamına eklenen plazma oranına göre değişimi, boyama sonuçlarının Kruskal Wallis H sıralamalı tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir (n=3). Her 3 plazma oranı arasında nöronal ölüm oranı açısından inkübasyon süreleri içerisinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmiştir (1 saat inkübasyon;  $p= 0.036$ , 12 saat inkübasyon;  $p$  değeri=  $0.0117$ , 24 saat inkübasyon;  $p= 0.0216$ ). Uygulanan Dunn çoklu karşılaştırma testi ile inkübasyon sürelerine göre ortaya çıkan anlamlı farklılık %1 plazma oranı ile %10 plazma oranı arasındaki anlamlı ilişkiden kaynaklanmaktadır. Sırasıyla, 1 saat inkübasyon; %1 vs. %10  $p= 0.0219$ , 12 saat inkübasyon; %1 vs. %10  $p= 0.0338$ , 24 saat inkübasyon; %1 vs. %10  $p= 0.0219$ .



Her 3 plazma oranının inkübasyon sürelerine göre kendi arasındaki nöronal ölüm yüzdesi ise %1 oranında plazma ve %5 oranında plazma eklenmiş gruplarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık kaydedilmiştir (%1 plazma;  $p= 0.036$ , %5 plazma;  $p$  değeri=  $0.0107$ ). Uygulanan Dunn çoklu karşılaştırma testi ile plazma oranlarına göre ortaya çıkan anlamlı farklılık %1 plazma oranı için 1 saat inkübasyon vs. 24 saat inkübasyon ( $p= 0.0219$ ), %5 plazma oranı için 1 saat inkübasyon vs. 12 saat inkübasyon ( $p= 0.0338$ ) arasındaki anlamlı ilişkiden kaynaklanmaktadır.

Aynı kişiden alınan plazma örneğinin hipokampal nöronlar üzerindeki etkisi CellTiter-Blue viabilite testi ile de 3 farklı oranda (%1 – %5 – %10) ve 3 farklı inkübasyon süresince (1 saat – 12 saat – 24 saat) değerlendirilmiş olup metabolik aktivitenin plazma oranları ve inkübasyon süresine göre değişimi şekil 6.3.4'de gösterilmiştir.

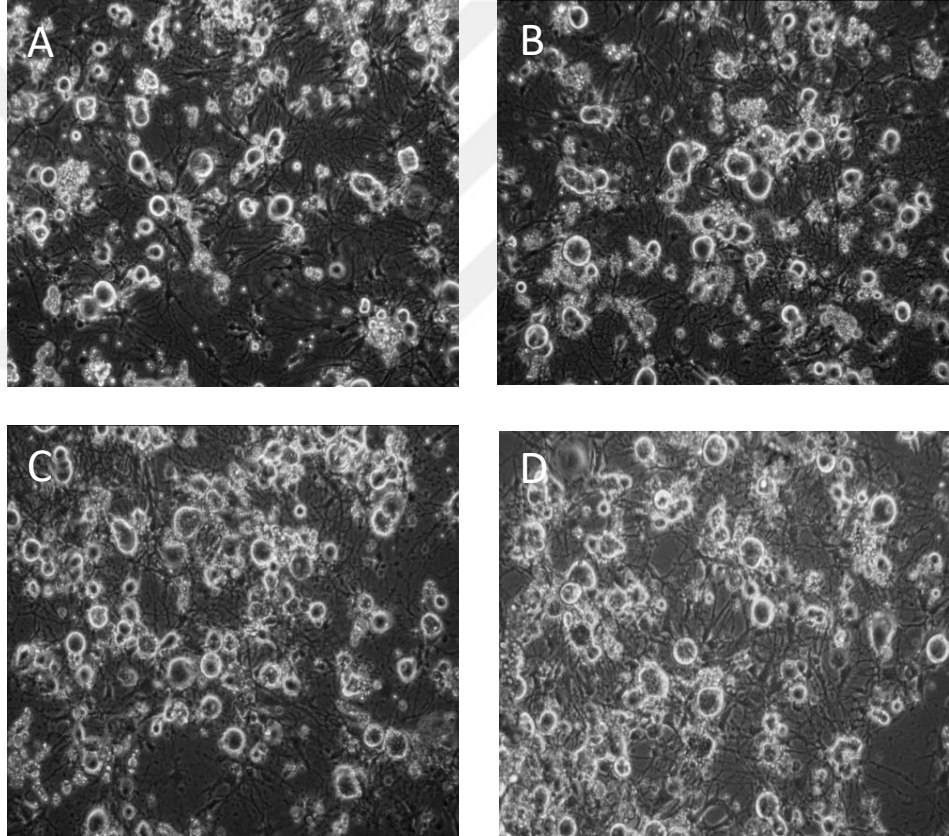
Sonuç olarak PI ve Hoechst ikili boyama yöntemi sonucunda hesaplanmış olan ölüm yüzdesi ile tutarlı olarak CellTiter-Blue viabilite testinde de 1 saat inkübasyon süresince %5 plazma oranının diğer inkübasyon süreleri ve plazma oranları ile karşılaştırıldığında primer hipokampal kültürü için optimum değer olduğu görülmüştür. Bu bağlam da viabilite testlerine efektif plazma oranı ve inkübasyon süresi olarak belirlenmiş olan %5 plazma ve 1 saat inkübasyon koşuluna bağlı kalınarak devam edilmiştir.



**Şekil 6.3.4** Hipokampal nöronların CellTiter-Blue testi ile hücre canlılığı analizi. Metabolik aktivite belirtilen maruziyet koşullarında 24 saat, 12 saat ve 1 saat sonra ölçülmüştür.

### 6.3.2.1. Plazmanın arka kök gangliyon nöronları üzerinde *in vitro* hayatta kalım etkisi

Plazmanın hipokampal nöron kültür ortamında meydana getirmiş olduğu olumsuz etkinin tanımlanması sonucunda periferik arka kök ganglion kültür ortamındaki olası toksik etkisi kalitatif olarak incelenmiştir (EK-2). Sonuçlar, plazmanın kültür ortamına eklenmesi ile birlikte dorsal kök ganglion nöronları üzerinde kültür ortamını bozan ve nöronların canlılığını etkileyen herhangi bir olumsuz etki gözlemlenmemiştir (Şekil 6.3.5).



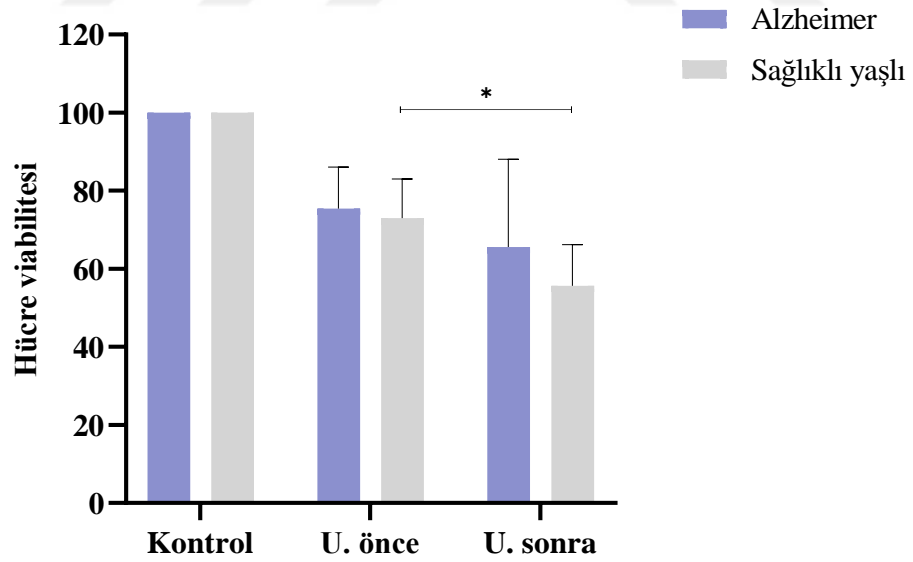
**Şekil 6.3.5** Plazmanın arka kök gangliyon kültürü üzerindeki etkisi

A. Kontrol, B. %1 plazma, C. %5 plazma ve D. %10 plazma eklenmiş kültür ortamı. Ekimi takip eden 5. gün itibari ile periferik arka kök ganglion nöron kültürü ortamına %1, %5 ve %10 oranında plazma eklenmiştir. Plazmanın eklenmesini takip eden 7. günde kayıt altına alınan mikrograflar ile kültür ortamı gösterilmiştir.

#### 6.4. Hücre Canlılığı Analiz Sonuçları

Alzheimer olguları ve sağlıklı yaşlı yetişkinlerden uykuya bağımlı olarak alınan uyku öncesi ve uyku sonrası plazmanın hipokampal nöron kültürü üzerinde toksik etkisinin olup olmadığının değerlendirilebilmesi için CellTiter-Blue canlılık testi yapılmıştır. Daha önceki bölümde anlatılan optimizasyon çalışmaları sonucunda kültür ortamına % 5 oranda plazma eklenmiş ve hücreler 1 saat boyunca bu ortama maruz bırakılmıştır.

Her iki grup arasında hücre viabilitesi açısından hem uyku öncesi elde edilmiş plazma hem de uyku sonrası elde edilmiş plazmanın eklendiği koşulda istatistiki olarak anlamlı farklılık kaydedilmemiştir. Buna ek olarak Alzheimer ve sağlıklı yaşlı yetişkin grubu kendi içerisinde (uyku öncesi/sonrası) değerlendirdiğimizde sağlıklı yaşlı yetişkin grubun uyku öncesi ve uyku sonrası plazmasının eklendiği koşullar arasında istatistiki açıdan anlamlı farklılık izlenmiştir ( $p = .032$ ). Alzheimer olgularında ise aynı koşullar için istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.



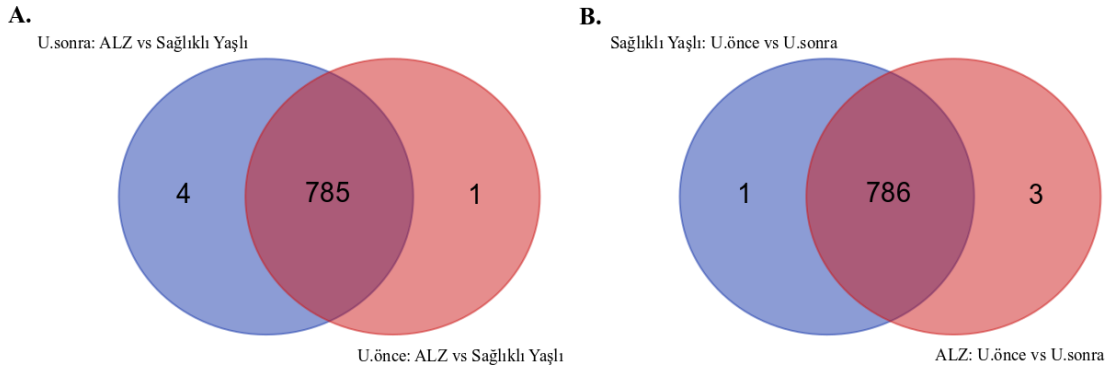
**Şekil 6.4.1** Alzheimer olguları ve sağlıklı yaşlı yetişkin grubun uyku öncesi ve sonrası elde edilmiş olunan plazmasının hipokampal nöron kültürü üzerindeki toksik etkisinin CellTiter-Blue testi ile analizi (n=3).

## 6.5. LC-MS/MS İle Plazma Proteom Profiline Tanımlanması

Beyin drenaj sisteminin uykuya bağımlı işleyişinin, Alzheimer olguları ve sağlıklı yaşlı yetişkinlerdeki çalışma mekanizmasını anlamak için kan plazma örneğinin iki farklı zamanda (uyku öncesi/sonrası) alındığı bir model oluşturarak kantitatif proteomik yaklaşım kullanıldı. Bölüm 5.3'te ayrıntılı olarak açıklandığı üzere LC-MS/MS analizi ile kantitatif proteomik çalışması yapıldı. Analiz için ham veriden iki biyolojik tekrar sonucunda %1 yanlış keşif oranı ve  $\geq 1$  spektral (MS/MS) sayımına sahip 790 protein net bir şekilde tespit edilmiştir.

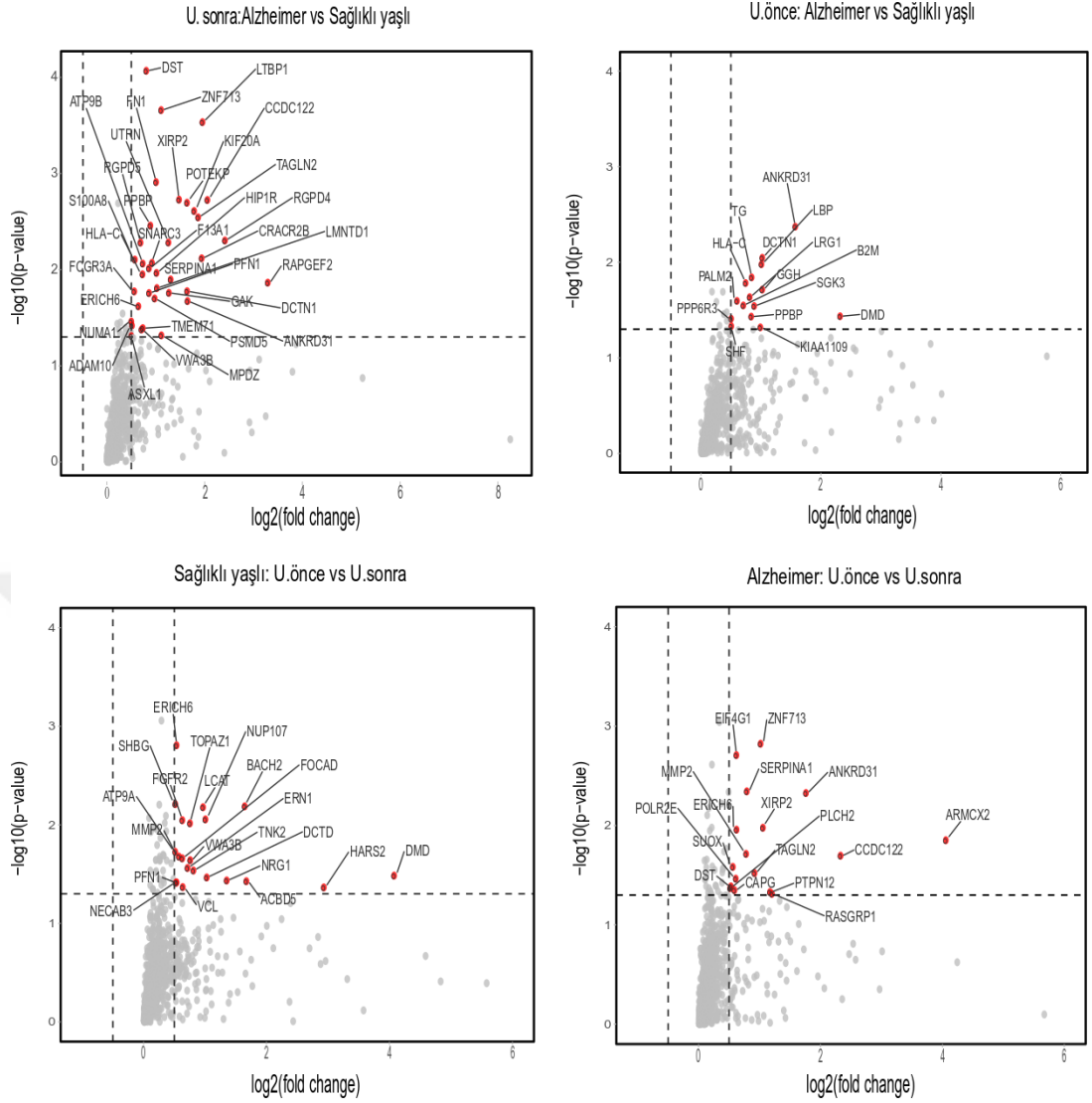
### 6.5.1. Alzheimer olguları ve sağlıklı yaşlı arasındaki kan plazma protein farklılıkları

LC-MS/MS analizi sonucunda tespit edilmiş 790 proteinin tümü göz önünde bulundurulduğunda, her iki grupta her iki koşul için benzersiz proteinlerin sayısını sınıflandırmak adına belirlenmiş olunan kriter (%1 yanlış keşif oranı ve  $MS/MS \geq 1$ ) doğrultusunda uykudan önce ve uykudan sonra alınmış olunan plazma örneklerinde sağlıklı yaşlı yetişkin ve AH olgularında 785 proteinin (%99.4) ortak olarak ifade edilirken uyku öncesi 1 protein (%0.1) ve uyku sonrası 4 protein (%0.5) benzersiz olarak ifade edildiği görülmüştür (Şekil 6.5.1-A). Aynı değerlendirme her grubun kendi içerisinde iki farklı koşul açısından değerlendirildiği durumdaysa 786 proteinin (%99.5) ortak olarak ifade edildiği, sağlıklı yaşlının; uykudan önce/uykudan sonra karşılaştırılmasında 1 protein (%0.1) benzersiz ifade edilirken AH olgularında 3 proteinin (%0.4) benzersiz ifade edildiği görülmüştür (Şekil 6.5.1-B).



**Şekil 6.5.1** Alzheimer (ALZ) olgularında ve sağlıklı yaşlı yetişkinlerde toplamda 790 proteinin gruplar arası ve 2 farklı koşula (uyku öncesi; uyku sonrası) göre sınıflandırılması.

Farklı şekilde ifade edilen proteinler, çeşitli ikili karşılaştırmalarda (Uyku öncesi: Alzheimer vs. Sağlıklı yaşlı; Uyku sonrası: Alzheimer vs. Sağlıklı yaşlı; Sağlıklı yaşlı: Uyku öncesi vs. Uyku sonrası; Alzheimer: Uyku öncesi vs. Uyku sonrası) ortak ve benzersiz şekilde ifade edilen proteinler açısından her iki grup arasında iki koşul için karşılaştırılarak tanımlanmıştır. Tespit edilen 790 protein içerisinde gruplar arasında p değeri  $<0.05$  ve kat değişimi  $\geq 1.4$  olanların istatistiksel açıdan ifadesi anlamlı değişen protein olarak tanımlanmıştır (Tablo 6.5.1). Anlamlı olarak ifadesi değişen bu proteinler için logaritma 2 tabanına göre alınmış kat değişim değerleri 0,5'ten ( $|\Delta\log_2|>0.5$ ) büyük olduğunda proteinlerin farklı şekilde ifade edildiği (artış/azalış) kabul edilmiştir. Sırasıyla; Uyku öncesi: Alzheimer vs. Sağlıklı yaşlı karşılaştırması için 15 protein, Uyku sonrası: Alzheimer vs. Sağlıklı yaşlı karşılaştırması için 36 protein, Sağlıklı yaşlı: Uyku öncesi vs. Uyku sonrası karşılaştırması için 21 protein ve Alzheimer: Uyku öncesi vs. Uyku sonrası karşılaştırması için 17 protein artış göstermiştir. Şekil 6.5.2 da çeşitli ikili karşılaştırmalarda proteinler için kat değişimine karşı istatistiksel anlamlılık volkan grafiği ile gösterilmiştir.



**Şekil 6.5.2** Analize dâhil edilen tüm proteinler için grup karşılaştırmalarını temsil eden volkan grafikleri.

X eksenini  $\log_2$  kat değişikliklerini temsil ederken y eksenini çift yönlü t-testi istatistiğiyle ilişkili  $-\log_{10}(p\text{-değerini})$  temsil eder. Dikey noktalı çizgiler 0,5 veya  $-0,5$ 'lik bir  $\log_2$  kat değişiminde konumlandırılmıştır ve yatay noktalı çizgiler  $p=0,05$  eşdeğerine konumlandırılmıştır. Kırmızı,  $p < 0,05$  ve  $\log_2$  kat-değişimi  $> 0,5$  veya  $< -0,5$ 'te farklı olarak ifade edilen proteinlerdir. Gri, her iki grup arasında anlamlı olarak farklılaşmamış proteinleri temsil etmektedir.

**Tablo 6.5.1** Alzheimer olguları ve sağlıklı yaşlı yetişkin grup arasında uyku önce ve sonrası koşuluna bağlı olarak p değeri <0.05 ve kat değişimi  $\geq 1.4$  kriterini sağlayan protein listesi

Erişim numarası	Protein ismi	Gen Sembölü	Maksimum olduğu grup	Kat değişimi
<b><u>Uyku öncesi: Alzheimer vs. Sağlıklı yaşlı</u></b>				
Q8N7Z5	Ankyrin repeat domain-containing protein 31	ANKRD31	Alzheimer	2.9
A0A804CDA6	Dynactin subunit 1	DCTN1	Alzheimer	2.0
P18428	Lipopolysaccharide-binding protein	LBP	Alzheimer	2.0
P01266	Thyroglobulin	TG	Alzheimer	1.7
A0A140T9W2	HLA class I histocompatibility antigen, C alpha chain	HLA-C	Sağlıklı yaşlı	1.6
Q92820	Gamma-glutamyl hydrolase	GGH	Alzheimer	2.0
P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	LRG1	Alzheimer	1.7
Q8IXS6	Paralemmin-2	PALM2	Sağlıklı yaşlı	1.5
P61769	Beta-2-microglobulin	B2M	Alzheimer	1.6
E5RK28	Serine/threonine-protein kinase Sgk3 (Fragment)	SGK3	Sağlıklı yaşlı	1.8
A0A087WV90	Dystrophin	DMD	Sağlıklı yaşlı	4.9
P02775	Platelet basic protein	PPBP	Alzheimer	1.7
H7BXH2	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit 3	PPP6R3	Alzheimer	1.4
Q7M4L6	SH2 domain-containing adapter protein F	SHF	Sağlıklı yaşlı	1.4
H0Y781	Transmembrane protein KIAA1109 (Fragment)	KIAA1109	Sağlıklı yaşlı	1.9
<b><u>Uyku sonrası: Alzheimer vs. Sağlıklı yaşlı</u></b>				
A0A0U1RQJ2	Dystonin	DST	Sağlıklı yaşlı	1.7
Q8N859	Zinc finger protein 713	ZNF713	Sağlıklı yaşlı	2.1
Q14766	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	LTBP1	Sağlıklı yaşlı	3.8
P02751	Fibronectin	FN1	Sağlıklı yaşlı	2.0
A4UGR9	Xin actin-binding repeat-containing protein 2	XIRP2	Alzheimer	2.7
A0A087WWN1	Coiled-coil domain-containing protein 122 (Fragment)	CCDC122	Sağlıklı yaşlı	4.1
Q9BYX7	Putative beta-actin-like protein 3	POTEKP	Sağlıklı yaşlı	3.1
O95235	Kinesin-like protein KIF20A	KIF20A	Sağlıklı yaşlı	3.4
P37802	Transgelin-2	TAGLN2	Alzheimer	3.6
P02775	Platelet basic protein	PPBP	Alzheimer	1.8
Q7Z3J3	RanBP2-like and GRIP domain-containing protein 4	RGPD4	Sağlıklı yaşlı	5.3
Q5T097	Utrophin	UTRN	Alzheimer	2.3
Q99666	RANBP2-like and GRIP domain-containing protein 5/6	RGPD5	Alzheimer	1.6
Q8N4Y2	EF-hand calcium-binding domain-containing protein 4A	CRACR2B	Alzheimer	3.8
P05109	Protein S100-A8	S100A8	Sağlıklı yaşlı	1.4
Q92966	snRNA-activating protein complex subunit 3	SNAPC3	Alzheimer	1.8
O43861	Probable phospholipid-transporting ATPase IIB	ATP9B	Sağlıklı yaşlı	1.6
P00488	Coagulation factor XIII A chain	F13A1	Sağlıklı yaşlı	1.8
O75146	Huntingtin-interacting protein 1-related protein	HIP1R	Alzheimer	2.0
A0A140T9W2	HLA class I histocompatibility antigen, C alpha chain	HLA-C	Sağlıklı yaşlı	1.6
A0A0B4J278	Alpha-1-antitrypsin (Fragment)	SERPINA1	Alzheimer	2.4
D6REY8	Rap guanine nucleotide exchange factor 2 (Fragment)	RAPGEF2	Alzheimer	9.8



Erişim numarası	Protein ismi	Gen Sembolü	Maksimum olduğu grup	Kat değişimi
Q8N9Z9	Lamin tail domain-containing protein 1	LMNTD1	Sağlıklı yaşlı	2.0
A0A804CDA6	Dynactin subunit 1	DCTN1	Alzheimer	3.1
H0Y755	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-A	FCGR3A	Alzheimer	1.4
O14976	Cyclin-G-associated kinase	GAK	Alzheimer	2.4
P07737	Profilin-1	PFN1	Alzheimer	1.8
Q16401	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5	PSMD5	Sağlıklı yaşlı	1.9
Q8N7Z5	Ankyrin repeat domain-containing protein 31	ANKRD31	Sağlıklı yaşlı	3.1
C9J7L7	Glutamate-rich protein 6 (Fragment)	ERICH6	Alzheimer	1.5
Q14980	Nuclear mitotic apparatus protein 1	NUMA1	Sağlıklı yaşlı	1.4
O14672	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	ADAM10	Alzheimer	1.4
Q6P5X7	Transmembrane protein 71	TMEM71	Sağlıklı yaşlı	1.6
Q502W6	von Willebrand factor A domain-containing protein 3B	VWA3B	Alzheimer	1.6
Q9UEF7	Klotho	KL	Sağlıklı yaşlı	1.4
O75970	Multiple PDZ domain protein	MPDZ	Alzheimer	2.1
Q76L82	Additional sex combs like 1 (Drosophila), isoform CRA_d	ASXL1	Sağlıklı yaşlı	1.4

#### **Sağlıklı yaşlı: Uyku öncesi vs. Uyku sonrası**

C9J7L7	Glutamate-rich protein 6 (Fragment)	ERICH6	Uyku öncesi	1.4
I3L2X4	Sex hormone-binding globulin	SHBG	Uyku sonrası	1.4
Q9BYV9	Transcription regulator protein BACH2	BACH2	Uyku sonrası	3.1
P04180	Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase	LCAT	Uyku sonrası	1.9
P57740	Nuclear pore complex protein Nup107	NUP107	Uyku öncesi	2.0
A0A5S6RJB7	Receptor protein-tyrosine kinase (Fragment)	FGFR2	Uyku öncesi	1.5
Q8N9V7	Protein TOPAZ1	TOPAZ1	Uyku öncesi	1.6
A0A0A0MR22	Phospholipid-transporting ATPase	ATP9A	Uyku sonrası	1.4
P08253	72 kDa type IV collagenase	MMP2	Uyku öncesi	1.4
Q5VW36	Focadhesin	FOCAD	Uyku sonrası	1.5
Q502W6	von Willebrand factor A domain-containing protein 3B	VWA3B	Uyku öncesi	1.6
O75460	Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease IRE1	ERN1	Uyku sonrası	1.6
A0A5F9ZHJ2	Non-specific protein-tyrosine kinase	TNK2	Uyku öncesi	1.7
A0A087WTU7	Dystrophin	DMD	Uyku öncesi	16.8
D6RIG3	Deoxycytidylate deaminase	DCTD	Uyku öncesi	2.0
A0A494C1F8	Pro-neuregulin-1, membrane-bound isoform	NRG1	Uyku sonrası	2.5
A0A7I2YQE9	Acyl-CoA-binding domain-containing protein 5	ACBD5	Uyku sonrası	3.1
P07737	Profilin-1	PFN1	Uyku öncesi	1.4
X6RCW6	N-terminal EF-hand calcium-binding protein 3 (Fragment)	NECAB3	Uyku öncesi	1.4
P18206	Vinculin	VCL	Uyku sonrası	1.5
A0A2R8Y5P7	Histidine--tRNA ligase	HARS2	Uyku sonrası	7.6

#### **Alzheimer: Uyku öncesi vs. Uyku sonrası**

Q8N859	Zinc finger protein 713	ZNF713	Uyku öncesi	2.0
A0A7I2Y1C3	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	EIF4G1	Uyku öncesi	1.5
A0A0B4J278	Alpha-1-antitrypsin (Fragment)	SERPINA1	Uyku sonrası	1.7
P53618	Coatomer subunit beta	COPB1	Uyku öncesi	1.4
Q8N7Z5	Ankyrin repeat domain-containing protein 31	ANKRD31	Uyku öncesi	3.3
A4UGR9	Xin actin-binding repeat-containing protein 2	XIRP2	Uyku sonrası	2.0
C9J7L7	Glutamate-rich protein 6 (Fragment)	ERICH6	Uyku sonrası	1.5
Q7L311	Armadillo repeat-containing X-linked protein 2	ARMCX2	Uyku öncesi	16.6
P08253	72 kDa type IV collagenase	MMP2	Uyku sonrası	1.7

Erişim numarası	Protein ismi	Gen Sembolü	Maksimum olduğu grup	Kat değişimi
A0A087WWN1	Coiled-coil domain-containing protein 122 (Fragment)	CCDC122	Uyku öncesi	5.0
F8VRK9	Sulfite oxidase, mitochondrial (Fragment)	SUOX	Uyku öncesi	1.4
P37802	Transgelin-2	TAGLN2	Uyku sonrası	1.8
K7EJ87	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1	POLR2E	Uyku öncesi	1.5
A0A0U1RQJ2	Dystonin	DST	Uyku öncesi	1.4
O75038	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase eta-2	PLCH2	Uyku sonrası	1.4
P40121	Macrophage-capping protein	CAPG	Uyku sonrası	1.5
C9JYA4	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12 (Fragment)	PTPN12	Uyku sonrası	2.2
O95267	RAS guanyl-releasing protein 1	RASGRP1	Uyku sonrası	2.3

### 6.5.2. Tanımlanan proteinlerin fonksiyonel zenginleştirme analizi

Kan plazma örneklerinde anlamlı olarak artan (p değeri <0.05) ve beyinde eksprese edildiği bilinen proteinler (<https://www.proteinatlas.org/>), uykuya bağımlı olarak çalışan beyin drenaj sistemi fonksiyonunun sağlıklı yaşlı ve Alzheimer olgularında etkilediği moleküler paternleri daha iyi anlaşılabilmesi için g:Prolifer yazılımı ile fonksiyonel zenginleştirme analizi yapılmıştır. Anlamlı olarak değişen hedef proteinler için bilgi çıkarımını kolaylaştırmak adına sağlıklı yaşlı yetişkinler ve Alzheimer olgularının uyku öncesi ve sonrası elde edilmiş hedef proteinleri ayrı olarak incelenmiştir.

Uyku öncesi Alzheimer olguları ve sağlıklı yaşlılardan alınmış olan kan plazma örneğinde artış gösteren 18 protein için fonksiyonel zenginleştirme analizi, birçok hücrel sinyal yolağının zenginleştiğini özellikle Alzheimer olguları için göstermiştir (Tablo 6.5.2) Reactome veritabanına göre doğuştan gelen bağışıklık sistemimizin parçası olan nötrofil degranülasyonunda yer alan proteinler açısından zenginleşme kaydedilmiş olup yolak ile ilişkili hücrel bileşen kategorisindeki (Tersiyer granül lümen; Spesifik granül lümen; Salgı granül lümen) proteinlerde artış görülmüştür. Ek olarak Alzheimer olgularında Beta-2 Mikroglobulin (B2M) ve lizozim (LYZ) proteinindeki değişim İnsan fenotip ontolojisine (HP) göre yaygın amiloid birikimi ile ilişkilendirilmiştir.

**Tablo 6.5.2** Sağlıklı yaşlı yetişkin ve Alzheimer olgularından uyku öncesinde alınmış kan plazma örneklerinde artış göstermiş protein listesinden istatistiksel olarak zenginleştirilmiş ontolojik terimler.

Alzheimer		Sağlıklı yaşlı	
<b>GO: Biyolojik süreç</b>	<i>p-değeri</i>	<b>GO: Hücresel bileşen</b>	<i>p-değeri</i>
• Bakteriye yanıt (GO:0009617)	2.78E-02	• Zarın lümen tarafı (GO:098576)	5.70E-03
<b>GO: Hücresel bileşen</b>	<i>p-değeri</i>		
• Tersiyer granül lümen (GO:1904724)	4.04E+07		
• Tersiyer granül (GO:0070820)	1.02E-06		
• Spesifik granül lümen (GO:0035580)	1.87E-06		
• Salgı granül lümen (GO:0034774)	2.96E-05		
• Sitoplazmik vezikül lümeni (GO:0060205)	3.10E-05		
• Vezikül lümen (GO:0031983)	3.19E-05		
• Spesifik granül (GO:0042581)	8.73E-05		
• Hücre dışı bölge (GO:0005576)	1.79E-03		
• Hücre dışı boşluk (GO:0005615)	3.50E-03		
• Salgı granülü (GO:0030141)	3.72E-03		
• Salgı vezikülü (GO:0099503)	8.63E-03		
• Hücre dışı eksozom (GO:0070062)	2.57E-02		
• Hücre dışı vezikül (GO:1903561)	2.72E-02		
• Hücre dışı organel (GO:0043230)	2.73E-02		
• Hücre dışı zarla çevrili organel (GO:0065010)	2.73E-02		
<b>Reactome</b>	<i>p-değeri</i>		
• Doğuştan Bağışıklık Sistemi (REAC:R-HSA-168249)	2.56E-03		
• Nötrofil degranülasyonu (REAC:R-HSA-6798695)	8.91E-03		
• Bağışıklık Sistemi (REAC:R-HSA-168256)	1.32E-02		
<b>İnsan Fenotip Ontolojisi</b>	<i>p-değeri</i>		
• Yaygın amiloid birikimi (HP:0003216)	2.02E-02		

Uyku sonrası Alzheimer olguları ve sağlıklı yaşlılardan alınmış olan kan plazma örneğinde artış gösteren 41 protein için fonksiyonel zenginleştirme analizi, birçok hücresel sinyal yolağının zenginleştiğini göstermiştir (Tablo 6.5.3). Alzheimer olgularının uyku sonrası plazma örneklerinde en fazla temsil edilen yolağın hemostaz kaskadı altında yer alan sırasıyla; Trombosit aktivasyonu, sinyalizasyon ve agregasyonu, Artmış trombosit sitozolik  $Ca^{2+}$  yanıt ve Trombosit degranülasyonu olduğu görülmektedir. Hücresel bileşenlerdeki en yüksek artış ise Trombosit alfa granül lümen, Trombosit alfa granül ve Hücre dışı eksozom içerir bu da düzenlenmiş salgı proteinlerinin çoğunun bu yolak sinyalizasyonu içerisinde yer aldığını gösterir.

**Tablo 6.5.3** Sağlıklı yaşlı yetişkin ve Alzheimer olgularından uyku sonrasında alınmış kan plazma örneklerinde artış göstermiş protein listesinden istatistiksel olarak zenginleştirilmiş ontolojik terimler.

Alzheimer		Sağlıklı yaşlı	
<b>GO: Moleküler Fonksiyon</b>	<i>p-değeri</i>	<b>GO: Moleküler Fonksiyon</b>	<i>p-değeri</i>
• Hücre adezyon molekül bağlama (GO:0050839)	4.65E-02	• Mikrotübül artı uç bağlama (GO:0051010)	3.22E-02
<b>GO: Hücresel bileşen</b>	<i>p-değeri</i>	<b>GO: Biyolojik süreç</b>	<i>p-değeri</i>
• Vezikül (GO:0031982)	3.90E-03	• Kan pıhtılaşması, fibrin pıhtısı oluşumu (GO:0072378)	3.48E-02
• Trombosit alfa granül lümen (GO:0031093)	6.94E-03	<b>GO: Hücresel bileşen</b>	<i>p-değeri</i>
• Trombosit alfa granülü (GO:0031091)	1.75E-02	• Kolajen içeren hücre dışı matris (GO:0062023)	2.03E-03
• Hücre dışı eksozom (GO:0070062)	2.06E-02	• Hücre dışı matris (GO:0031012)	7.96E-03
• Hücre dışı vezikül (GO:1903561)	2.23E-02	• Endomembran sistemi (GO:0012505)	2.28E-02
• Hücre dışı organel (GO:0043230)	2.24E-02	• Mikrotübül artı uç (GO:0035371)	2.53E-02
• Hücre dışı zarla çevrili organel (GO:0065010)	2.24E-02	• Mikrotübül ucu (GO:1990752)	4.99E-02
• Sinaps (GO:0045202)	3.76E-02	<b>Reactome</b>	<i>p-değeri</i>
• Hücre korteksi (GO:0005938)	4.76E-02	• ER-Fagozom yolu (REAC:R-HSA-1236974)	4.73E-02
<b>Reactome</b>	<i>p-değeri</i>		
• Trombosit degranülasyonu (REAC:R-HSA-114608)	1.63E-04		
• Artmış trombosit sitozolik Ca <sup>2+</sup> yanıt (REAC:R-HSA-76005)	1.98E-04		
• Trombosit aktivasyonu, sinyalizasyon ve agregasyon (REAC:R-HSA-76002)	5.73E-03		

Uyku sonrası sağlıklı yaşlıların plazma örneklerinde ise ER Fagozom yolağında artmış sinyalizasyon ile birlikte moleküler fonksiyon ve hücresel bileşen açısından da artışın ilişkili olarak Mikrotübül artı uç bağlama, Mikrotübül artı uç ve Endomembran sisteminde olduğu görülmektedir.

Özellikle uykuya bağımlı olarak her iki grubun kendi içerisinde anlamlı olarak değişiklik gösteren protein (n=18) listesinin fonksiyonel zenginleştirme analiz sonuçlarına göre Alzheimer olgularında uyku sonrası plazma örneklerinde uyku öncesine göre KEGG ve Wikipathway'de vücudun savunma mekanizmasının bir parçası olan kompleman ve koagülasyon yolaklarında artmış sinyalizasyon görülmüştür (Tablo 6.5.4).

**Tablo 6.5.4** Alzheimer olgularından uyku öncesi ve sonrasında alınmış kan plazma örneklerinde artış göstermiş protein listesinden istatistiksel olarak zenginleştirilmiş ontolojik terimler.

Uyku öncesi		Uyku sonrası	
<b>GO: Hücresel bileşen</b>	<i>p-değeri</i>	<b>GO: Hücresel bileşen</b>	<i>p-değeri</i>
• Organel zarfı (GO:0031967)	9.90E-03	• Podozom (GO:0002102)	4.38E-02
• Zarf (GO:0031975)	9.90E-03	<b>KEGG</b>	<i>p-değeri</i>
		• Kompleman ve koagülasyon kaskadı (KEGG:04610)	2.08E-04
		<b>Wikipathway</b>	<i>p-değeri</i>
		• Kompleman ve koagülasyon kaskadı (WP:WP558)	1.42E-04
		• Kompleman aktivasyonu (WP:WP545)	5.00E-02

Sağlıklı yaşlılar için fonksiyonel zenginleşme analizine dahil edilen 48 proteinin uyku öncesi artış gösterenlerin Sistemik lupus eritematozus yolağında yer alan immün sistemle ilişkili Fc fragment of IgG receptor IIIa (FCGR3B), Fc fragment of IgG receptor IIIb (FCGR3B) ve Actinin alpha I (ACTNI) proteinleri açısından artış ve yine bu proteinlerin moleküler fonksiyonu ile ilişkili Immünoglobulin bağlama reseptöründe zenginleşme kaydedilmiştir. Ek olarak uyku sonrası plazma örneğinin de ise sırasıyla Mikroglia patojen fagositoz yolağı, VEGFA-VEGFR2 sinyal yolağı, ERBB4 sinyalleşmesinde PI3K olayları ve Trombosit degranülasyonu yolaklarında artmış sinyalizasyon kaydedilmiştir. Biyolojik süreçler açısından baktığımızda ise Trombosit aktivasyonu takip eden süreçlerde, Kan koagülasyonu, Hemostaz, Yara iyileşmesi ve Vücut sıvısı seviyelerinin düzenlenme kategorisi ile ilişkili artış izlenmiştir (Tablo 6.5.5).

**Tablo 6.5.5** Sağlıklı yaşlı yetişkinlerde uyku öncesi ve sonrasında alınmış kan plazma örneklerinde artış göstermiş protein listesinden istatistiksel olarak zenginleştirilmiş ontolojik terimler.

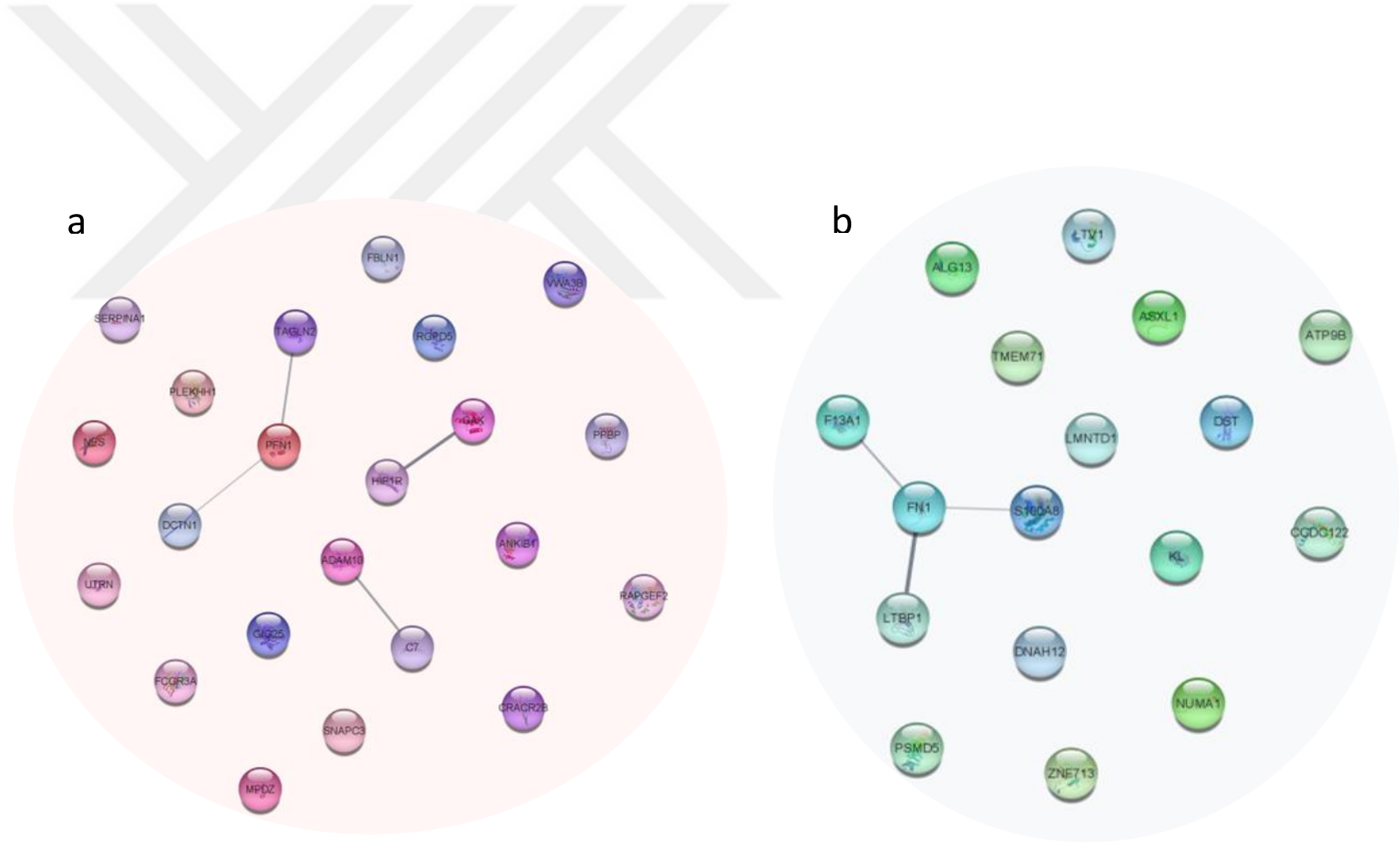
Uyku öncesi		Uyku sonrası	
<b>GO: Moleküler Fonksiyon</b>	<i>p-değeri</i>	<b>GO: Moleküler Fonksiyon</b>	<i>p-değeri</i>
• IgG bağlama (GO:0019864)	4.87E-03	• Alfa-katenin bağlama (GO:0045294)	3.61E-02
• Vinculin bağlama (GO:0017166)	7.14E-03	<b>GO: Biyolojik süreç</b>	<i>p-değeri</i>
• Immüoglobulin bağlama (GO:0019865)	2.73E-02	• Hücre bağlantı organizasyonu (GO:0034330)	4.17E-03
<b>GO: Hücresel bileşen</b>	<i>p-değeri</i>	• Vücut sıvısı seviyelerinin düzenlenmesi (GO:0050878)	1.92E-02
• Hücre korteksi (GO:0005938)	7.30E-03	• Kan koagülasyonu (GO:0007596)	2.03E-02
• Salgı granülü (GO:0030141)	2.76E-02	• Koagülasyon (GO:0050817)	2.26E-02
• Vezikül (GO:0031982)	4.93E-02	• Hemostaz (GO:0007599)	2.31E-02
<b>KEGG</b>	<i>p-değeri</i>	• Yara iyileşmesi (GO:0042060)	2.86E-02
• Sistemik lupus eritematozus (KEGG:05322)	2.79E-02	• Trombosit aktivasyonu (GO:0030168)	4.46E-02
		<b>GO: Hücresel bileşen</b>	<i>p-değeri</i>
		• Hücre dışı bölge (GO:0005576)	1.69E-02
		<b>KEGG</b>	<i>p-değeri</i>
		• Epitel hücrelerinin bakteri istilası (KEGG:05100)	4.64E-02
		<b>Reactome</b>	<i>p-değeri</i>
		• Trombosit degranülasyonu (REAC:R-HSA-114608)	3.21E-02
		• Artmış trombosit sitozolik Ca <sup>2+</sup> yanıtı (REAC:R-HSA-76005)	3.74E-02
		• Trombosit aktivasyonu, sinyalizasyon ve agregasyon (REAC:R-HSA-76002)	4.28E-02
		• ERBB4 sinyalleşmesinde PI3K olayları (REAC:R-HSA-1250342)	4.24E-02
		<b>WikiPathway</b>	<i>p-değeri</i>
		• Mikroglia patojen fagositoz yolu (WP:WP3937)	7.17E-03
		• VEGFA-VEGFR2 signaling pathway (WP:WP3888)	1.58E-02
		<b>Transkripsiyon Faktörü</b>	<i>p-değeri</i>
		• Faktör: HOXC11 motifi: NGYMATWAANN eşleşme sınıfı: 1 (TF:M10816_1)	4.38E-02

### 6.5.3. Tanımlanan protein listelerinin protein etkileşim analizi

Protein listelerini görsel olarak daha anlaşılır şekilde görselleştirmek adına String biyoinformatik yazılımı ile proteomik sonuçların grafiklerini oluşturduk. LC/MS-MS analizi sonucunda tanımlanan gen listeleri, gruplar arası uyku öncesi ve sonrası artmış proteinler (Tablo 6.5.1) ve uyku öncesi ve sonrası koşuluna bağlı olarak her iki grubun kendi içerisinde anlamlı değişen proteinleri (Şekil 6.5.3 ve Şekil 6.5.4) ayrı ayrı String veri tabanına yüklenerek protein etkileşim analizi gerçekleştirilmiştir.

Her iki grup için uyku öncesi ve sonrası artmış proteinlerin değerlendirmeye alındığı String analizi sonucunda uyku öncesi Alzheimer olgularında artan proteinlerin analiz sonucunda istatistiksel olarak anlamlı etkileşim kurduğu (PPI,  $p=0.00421$ ) ve fonksiyonel zenginleştirme analizi ile benzer bir eğilim gösterdiği görülmüştür. Analiz sonucunda ontolojik zenginleştirme ile Tersiyer granül lümen (GO:1904724), Spesifik granül lümen (GO:0035580), Salgı granül lümen (GO:0034774), Hücre dışı bölge (GO:0005576) ve Hücre dışı boşluk (GO:0005615) biyolojik süreçleri ile reactome veri tabanına göre ise Doğuştan Bağışıklık Sistemi (REAC:R-HSA-168249), Nötrofil degranülasyonu (REAC:R-HSA-6798695) ve Bağışıklık Sistemi (REAC:R-HSA-168256) yolları ile ilişkili ana süreçler de benzeştiği görülmüştür.

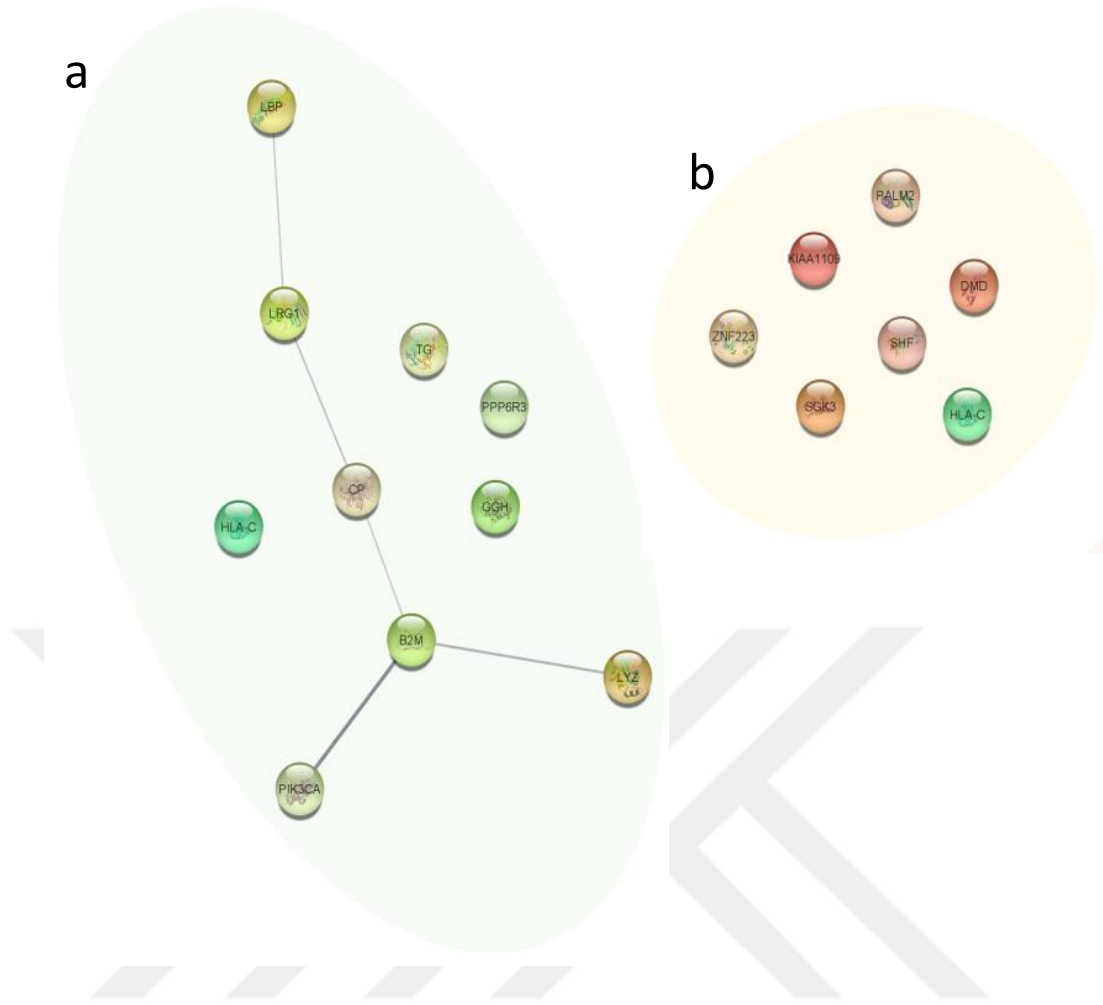
Her iki grubun kendi içerisinde uyku öncesi ve sonrası artmış proteinlerin değerlendirmeye alındığı analizi sonucunda uyku sonrasında hem Alzheimer olgularında (PPI,  $p=0.0434$ ) hem de sağlıklı yaşlılarda (PPI,  $p=0.00379$ ) artan proteinlerin analiz sonucunda istatistiksel olarak anlamlı etkileşim kurduğu kaydedilmiştir. Her iki koşul Fonksiyonel zenginleştirme analizi ile benzer bir eğilim gösterdiği görülmüştür. Uyku sonrası Alzheimer olgularında artmış olan proteinler benzer şekilde KEEG ve Wikipathway de Kompleman ve koagülasyon kaskadı (KEGG:04610)/(WP:WP558) yolağıyla ilişkilendirilirken, sağlıklı yaşlılar Wikipathway'e göre Mikroglia patojen fagositoz yolağı (WP:WP3937) ve VEGFA-VEGFR2 sinyal yolağıyla (WP:WP3888) yolları ile ilişkili ana süreçlerle benzeştiği görülmüştür.



Şekil 6.5.3 Artmış proteinlerin String analizi, uyku sonrası Alzheimer olguların da artmış proteinler **a** sağlıklı yaşlı grupta artmış proteinler **b**.

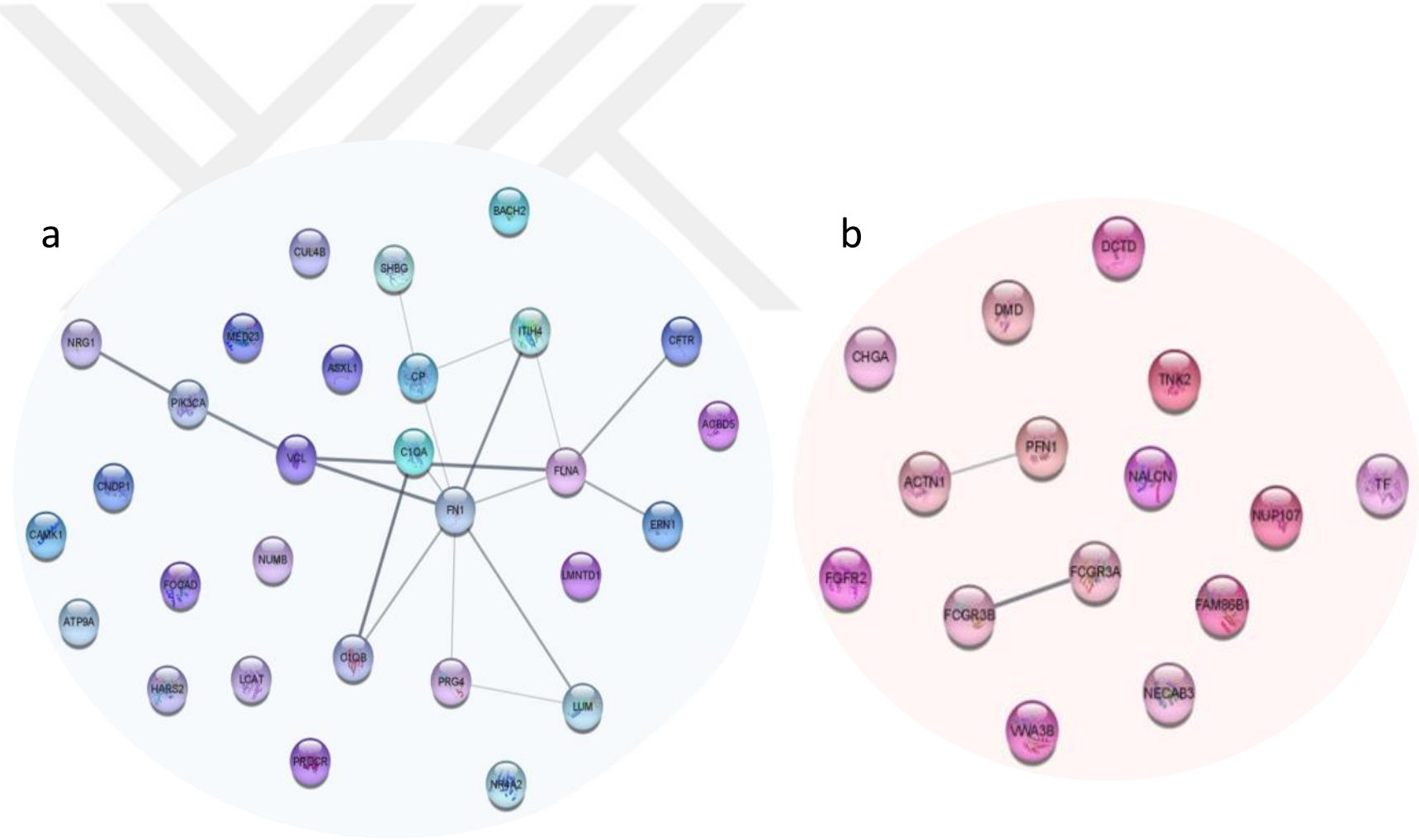
String network analiz aracı ile yapılan analiz de ilişkililik ko-ekspresyon, deneyler ve füzyon geni gibi parametrelere dayanmaktadır. Kalın çizgi doğrudan etkileşimi, ince çizgi ise dolaylı etkileşimi temsil eder. K-means kümeleme.





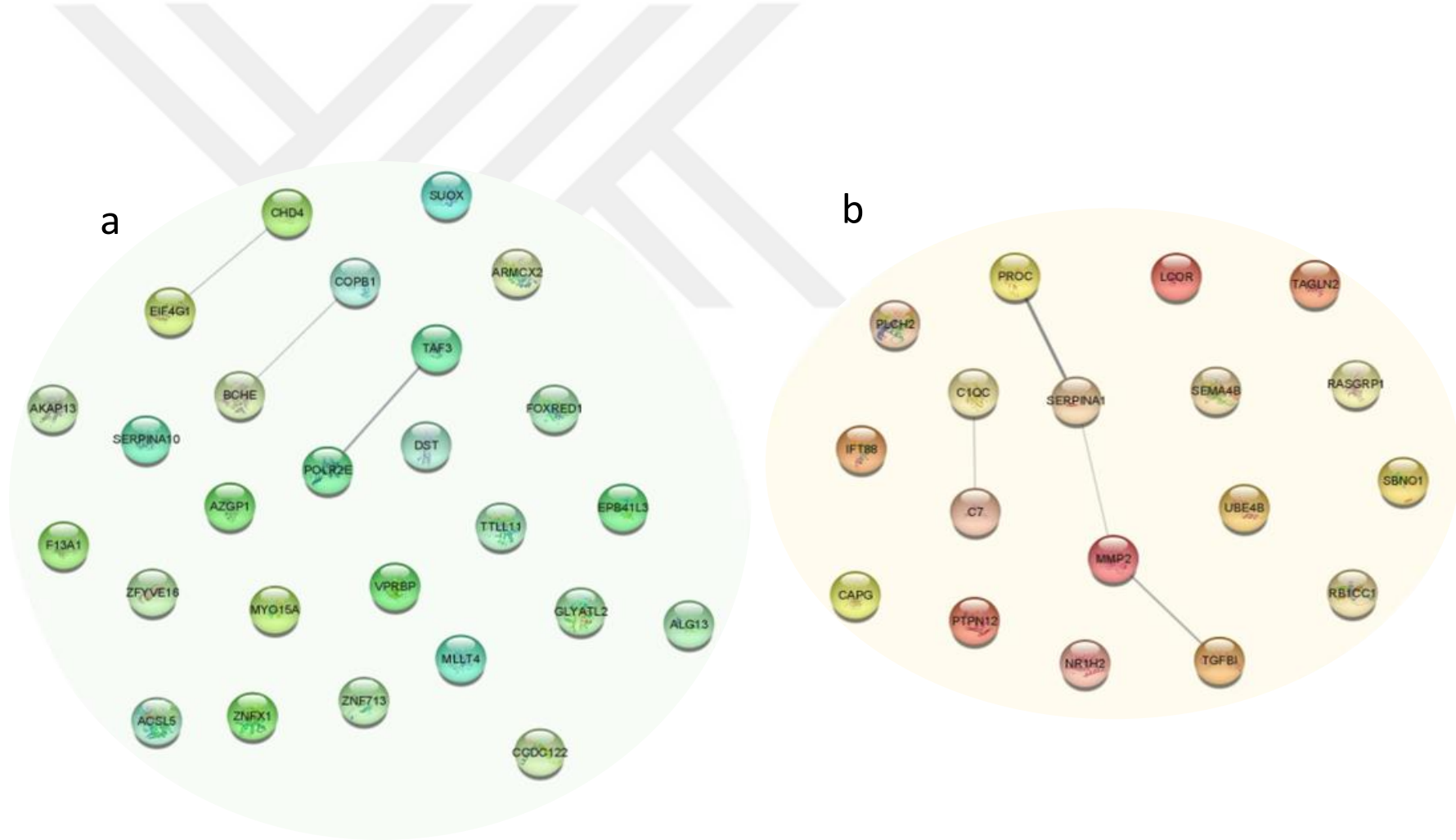
**Şekil 6.5.4** Artmış proteinlerin String analizi, uyku öncesi Alzheimer olgularının da artmış proteinler **a** ve sağlıklı yaşlı grupta artmış proteinler **b**.

String network analiz aracı ile yapılan analiz de ilişkililik ko-ekspresyon, deneyler ve füzyon geni gibi parametrelere dayanmaktadır. Kalın çizgi doğrudan etkileşimi, ince çizgi ise dolaylı etkileşimi temsil eder. K-means kümeleme.



Şekil 6.5.5 Artmış proteinlerin String analizi, sağlıklı yaşlı; uyku sonrası artmış proteinler **a** ve uyku öncesi artmış proteinler **b**

String network analiz aracı ile yapılan analiz de ilişkililik ko-ekspresyon, deneyler ve füzyon geni gibi parametrelere dayanmaktadır. Kalın çizgi doğrudan etkileşimi, ince çizgi ise dolaylı etkileşimi temsil eder. K-means kümeleme.

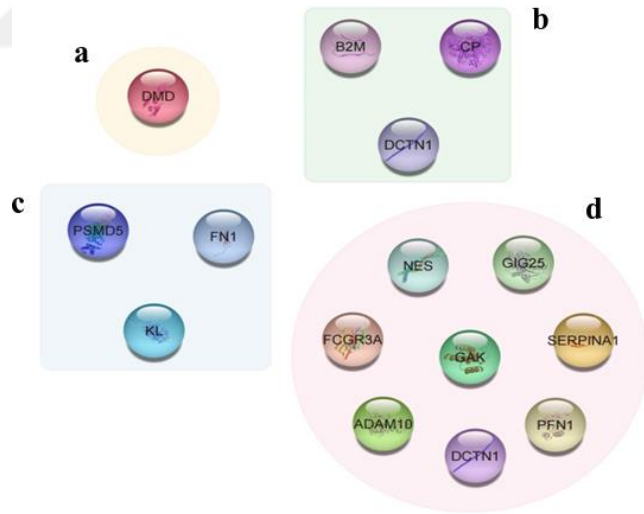


Şekil 6.5.6 Artmış proteinlerin String analizi, Alzheimer; uyku öncesi artmış proteinler **a** ve uyku sonrası artmış proteinler **b**.

String network analiz aracı ile yapılan analiz de ilişkililik ko-ekspresyon, deneyler ve füzyon geni gibi parametrelere dayanmaktadır. Kalın çizgi doğrudan etkileşimi, ince çizgi ise dolaylı etkileşimi temsil eder. K-means kümeleme.

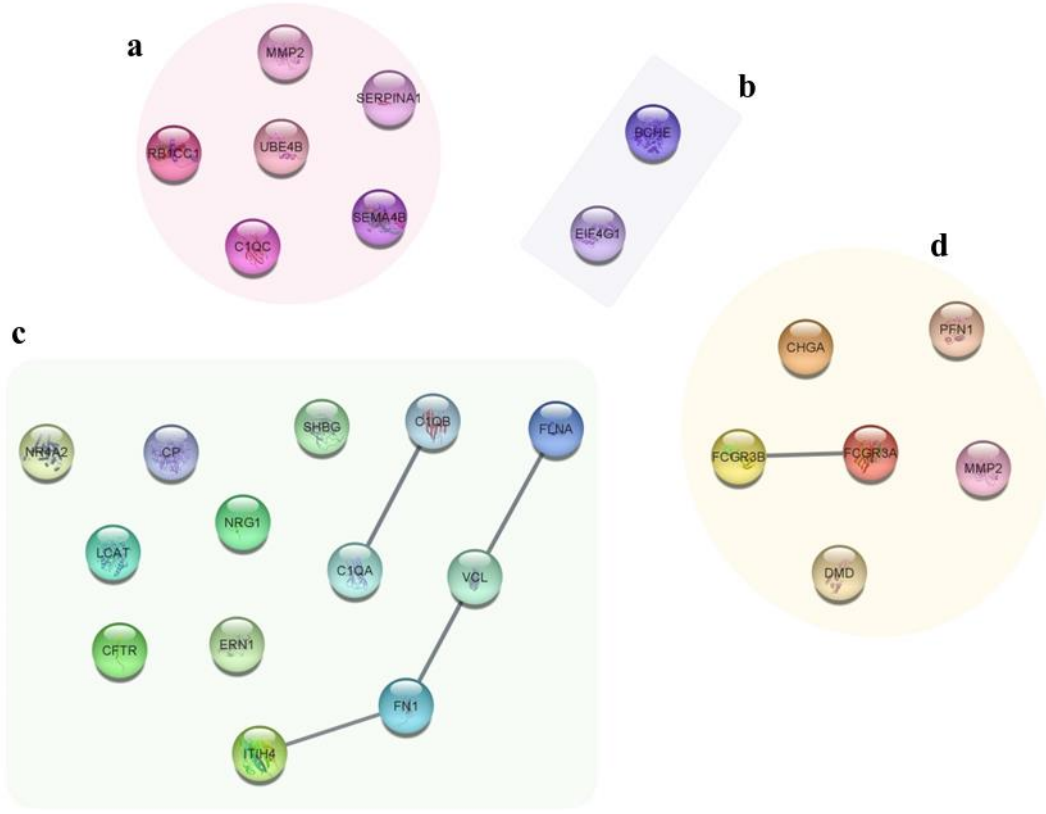
### 6.5.3.1. Alzheimer hastalığı açısından tanımlanan proteinlerin incelenmesi

AH ile ilişkili proteinlere sahip String ağı, Cytoscape StringApp aracılığı ile metin madenciliğine dayalı olarak uygulamaya yüklenmiştir. AH arka plan ağını oluşturabilmek adına AH'yi (DOID:10652) kapsayan bir alt ağ seçilmiştir. Seçilmiş olunan ağ 2000 protein içinde 0.8'lik güven kesme skoru ile filtrelenmiştir. Elde etmiş olunan network ile her iki grup (Alzheimer x Sağlıklı yaşlı) ve her iki koşul (uyku öncesi x uyku sonrası) için gruplar arası ve grup içerisinde artmış olunan protein listeleri karşılaştırılmıştır. Uyku öncesi ve sonrası Alzheimer olguları ve sağlıklı yaşlılar arasında yapılmış olan karşılaştırmada seçilmiş olunan AH ağında yer alan proteinlerde eşleşme gerçekleşmiştir (Şekil 6.5.7). Benzer şekilde her iki grubun kendi içerisinde uyku öncesi ve sonrası protein listelerinde de eşleşme kaydedilmiştir. Ek olarak sağlıklı yaşlıların uyku sonrası anlamlı olarak artmış olan proteinler arasında anlamlı protein etkileşimi kaydedilmiştir (Şekil 6.5.8).



Şekil 6.5.7 String Alzheimer ağı ile tanımlanan protein listelerinin gruplar arası karşılaştırılması

Uyku öncesi sağlıklı yaşlı grupta eşleşmiş proteinler **a** ve Alzheimer olguların da eşleşmiş proteinler **b**; uyku sonrası sağlıklı yaşlı grupta eşleşmiş proteinler **c** ve Alzheimer olguların da eşleşmiş proteinler **d**.



**Şekil 6.5.8** String Alzheimer ağı ile tanımlanan protein listelerinin grup içi karşılaştırılması.

Sağlıklı yaşlı grup; uyku öncesi eşleşmiş proteinler **d** ve uyku sonrası eşleşmiş proteinler **c**; Alzheimer olguları; uyku öncesi eşleşmiş proteinler **b** ve uyku sonrası eşleşmiş proteinler **a**. Kalın çizgi doğrudan etkileşimi, ince çizgi ise dolaylı etkileşimi temsil eder.

## 7. TARTIŞMA

Bu çalışmada AH patolojisi ile ilişkilendirilen beyin lenfatik drenaj sisteminin uykuya bağlı olarak nasıl çalıştığı ve bu sistemin AH de sağlıklı yaşlı yetişkinlere göre nasıl farklılaştığını nöronal toksisite ve proteom profili açısından inceledik. Bulgular bölümünün ilk kısmında görüldüğü üzere uyku sonrası sağlıklı yaşlı yetişkinlerden alınan plazmanın, in vitro hipokampal nöron kültürü üzerinde uyku öncesi alınan plazmaya kıyasla artmış hücre ölümü ile daha toksik bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde sonuç bölümünün ikinci kısmında özetlendiği üzere her iki zaman diliminde (uyku öncesi/sonrası) alınan kan plazma örnekleri hem AH ile sağlıklı yaşlı yetişkin arasında hem de her iki grubun kendi içerisinde proteom profili açısından değerlendirildiğinde uyku sonrası kan proteom profilinin uyku öncesine göre değişiklik gösterdiği görülmüştür.

Takip eden alt başlıklarda beyin lenfatik drenaj sistemine odaklanarak uykuya bağlı olarak ortaya çıkan nöronal toksisite ve değişen proteom profili ile ilgili bir dizi soru ele alınacaktır: (1) Uykuya bağlı çalışan beyin lenfatik drenaj sisteminin nöronal toksisite üzerindeki rolü nedir? (2) Alzheimer nöropatolojisinin ortaya çıkışında lenfatik drenaj sisteminin potansiyel etkileri nelerdir? (3) Periferik kan plazma örneğinin beyin lenfatik drenaj sisteminin fonksiyonunu yansıtmadaki başarısı nedir? (4) Son olarak AH değerlendirmesinde kullanılan klinik ve transkripsiyonel çalışmalar için bir araç olarak uykuya bağlı çalışan lenfatik drenaj sisteminin kullanımını tartışıyorum.

## 7.1. Uykuya Bağlı Çalışan Beyin Lenfatik Drenaj Sisteminin Nöronal Toksisite Üzerindeki Rolü Nedir?

AH yaygın nörodejeneratif hastalıklardan biri olmakla birlikte temelde beta amiloid (A $\beta$ ) proteinin oligomerizasyonu sonucunda meydana gelen toksik protein agregasyonu ile ilişkilendirilir. Toksik formdaki A $\beta$ 'nin aşırı birikimi ise A $\beta$  üretimi ve klirensi arasındaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır ve bu durum protein toksisitesi ile sonuçlanmaktadır. Bu bağlamda klirens sistemindeki işlev kaybına bağlı ortaya çıkan protein toksisitesi başta AH olmak üzere pek çok nörodejeneratif hastalığın temel sürücüsü olarak kabul edilebilir.

Çözünür formdaki A $\beta$ 'nin beyin parenkiminden uzaklaştırmak için çeşitli klirens mekanizması olmakla birlikte paravasküler yol olarak da tanımlanan glimfatik sistem aracılığı ile hücre dışı ortamdan A $\beta$ 'nin büyük oranda uzaklaştırıldığı bilinmektedir (9).

Bu çalışmada, Alzheimer olguları ve sağlıklı yaşlı yetişkinlerin uyku öncesi ve sonrası alınmış periferik kan plazma örneklerinin proteom profili ve primer hipokampal nöron kültürü üzerinde nörotoksik etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Mevcut literatür bilgisi ışığında Alzheimer olgularında ve sağlıklı yaşlı yetişkinlerde klirens sisteminin uykuya bağlı olarak nasıl değiştiği ve sisteminin hangi yollar üzerinden gerçekleştirildiği araştırılmıştır.

Merkezi sinir sistemine özgü makrofaj olan mikroglialar pek çok nörolojik hastalıkta aktive olduğu bilinmektedir ve aktive olmuş mikrogliaların motilite kazandığı, inflamatuvar sitokin salgıladığı ve lezyon bölgesine göç ederek hücre kalıntılarını veya hasarlı nöronları fagosite ettiği bilinmektedir (108). Öyle ki pek çok sayıda çalışma, mikroglia ve nöroinflamasyonun AH patogenezinde rol oynadığını göstermiştir (109).

Mikroglia hücrelerinin, AH beyinlerinde kompakt halde bulunan amiloid plaklarla yakın ilişkili olduğu 3D rekonstrüksiyon aracılığı ile Alzheimer hayvan modelinde aktif mikroglia kümelerinin amiloid plakların yakınında lizozomlar ve vakuoller içerdiğinin gösterilmesiyle kanıtlanmıştır (110). Benzer şekilde in vivo şartlar altında kültüre edilmiş mikroglialar tarafından A $\beta$  mikroagregatların 15 dk içerisinde alındığı ve oluşan vakuollerin 1 saat içerisinde asidik endosom ve

lizozoma ulaştığı ve sürekli inkübasyonu takip eden 4. gün içerisindeki mikroglial hücrelerin sindirilememiş A $\beta$  ile dolduğu gösterilmiştir (111).

Merkezi sinir sisteminde aktive edilmiş mikroglia, inflamatuvar yanıtın başlatılmasında koruyucu bir rol üstlenirken, beyin dokusu üzerinde kontrolsüz inflamatuvar yanıt geri dönüşümsüz nöronal hasara neden olabilir. Bu durum mikroglia'nın kronik aktivasyonu sonucunda ortama proinflamatuvar sitokinler, reaktif oksijen ara ürünleri, proteinazlar ve kompleman proteini gibi sitotoksik moleküllerin salınması sonucunda gerçekleşir (112). In vivo çalışmalarla da bu durum açıkça gösterilmiştir. Nöron mikroglia ko-kültüründe gerçekleşen mikroglia aktivasyonu mGluRII, NMDAR, NF- $\kappa$ B ve TNF- $\alpha$  üzerinden kortikal nöronlar üzerinde nörotoksik etkiler ortaya çıkarmıştır (113, 114). Benzer şekilde serebellar granül nöron kültüründe de mikroglial grup II mGlu reseptörlerinin (mGlu2) uyarılmasıyla nörotoksitesiye sebep olduğu bilinen TNF- $\alpha$  salımını indüklemiş ve nöronal kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik sürecin başladığı görülmüştür (115).

Bizim çalışmamızda da sağlıklı yaşlı yetişkin ve Alzheimer olgularından uyku öncesi ve sonrası alınmış plazma örnekleri, belirlenmiş olan efektif oran ve inkübasyon süresince (%5 – 1 saat inkübasyon) primer hipokampal nöron kültürüne eklenmiştir. Eklenmiş olan plazmanın nöronlar üzerinde ne oranda toksisiteye yol açtığını görmek için CellTiter-Blue canlılık testi yapılmıştır. Her iki grup ve her iki koşulu, gruplar arası ve grup içi karşılaştırdığımızda sadece sağlıklı yaşlı yetişkinlerin uyku öncesi ve uyku sonrası plazmasının eklendiği koşullar arasında istatistiki açıdan anlamlı farklılık izlenmiş ( $p = .032$ ) ve uyku sonrası elde edilmiş plazmanın uyku öncesine göre daha düşük viabiliteye sahip olduğu görülmüştür. Ölüm oranı, sağlıklı yaşlının uyku sonrası plazmasının eklendiği kuyularda daha fazla olması sebebi ile sağlıklı yaşlı uyku öncesi ve sonrası plazmasında ( $p$  değeri  $<0.05$  ve kat değişimi  $\geq 1.4$ ) istatikselsel açıdan ifadesi anlamlı değişen proteinler (Tablo 6.5.1) ve o proteinlerin dahil olduğu fonksiyonel zenginleştirme analiz sonuçları (Tablo 6.5.5) ortaya çıkan nörotoksitesiye açıklaması açısından değerlendirmeye alındığında, anlamlı artış gösteren yolaklardan Mikroglia patojen fagositoz yolu (WP:WP3937) literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür. Sonuç mikroglia aktivasyonu ile A $\beta$  klirensi'nin ilişkilendirilebileceği ve AH'nin erken aşamasında beyin A $\beta$  birikimini inhibe etmede glimfatik klirens ve mikroglial



fagositoz arasında etkileşimin olduğu ve bu ilişkinin mikroglialın aktivasyona uğraması sonucunda A $\beta$  klirensini artırmak suretiyle potansiyel olarak A $\beta$  plak oluşumunu önlediğini öne süren görüşü destekler niteliktedir (116, 117). Ek olarak Mikroglia patojen fagositoz yolunun sadece uyku öncesi ve sonrası karşılaştırma da uyku sonrasında artış gösteriyor olması, glimfatik sisteme bağlı olarak uyku ile ilişkisi olduğunu düşündürürken sadece sağlıklı yaşlılarda bu sinyal yolağında artışın izlenmesi literatürle tutarlı olarak AH patolojisi başlangıcında aktif mikroglialın A $\beta$  klirensini arttırdığı görüşü ile tutarlıdır. Sağlıklı yaşlılarda izlenen bu durum hastalığın ilerlemesi ile birlikte aktive edilmiş mikroglialın interlökin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 ve tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gibi proinflamatuvar sitokin ekspresyonunun artışı ile nörodejeneratif süreçleri indükleyerek doku bütünlüğü ve işlevselliği için zararlı hale geldiği bilinmektedir (115).

## **7.2 Alzheimer Nöropatolojisinin Ortaya Çıkışında Lenfatik Drenaj Sisteminin Olası Potansiyel Etkileri Nelerdir?**

AH, temel de A $\beta$  içeren senil plaklar ve hiperfosforile tau proteininin oluşturduğu nörofibrillar yumaklar olmak üzere iki ana patolojik özellik üzerine tanımlansa da etiyolojik olarak tek bir şey ile ilişkilendirilmeyip çok faktörlü olduğuna inanılmaktadır (118). Bunlardan biri de beyin drenaj sisteminde meydana gelen olası fonksiyon kaybına bağlı olarak beyin klirens sisteminin bozulmasıdır. Beyinde moleküler taşıma ve atıkların ortamdaki uzaklaştırılması glimfatik sistem, meningeal lenfatikler, perinöral boşluklarla birlikte drenaj yolları ve serebral arterlerin bazal membranı ile birlikte paravasküler yoldan oluştuğu varsayılan beyin lenfatik drenaj sistemi tarafından gerçekleştirilir (119).

AH olgularında, periferik kanda inflamatuvar belirteçler aracılığı ile gösterile bilinen yüksek immün aktivasyon tanımlanmıştır (120). AH'nin inflamatuvar arka planını destekler nitelikte pek çok kanıt da hastaların beyinlerinde nötrofil de dahil olmak üzere beyaz kan hücre çeşitleri tespit etmiştir (121). Nötrofillerin, inflamasyon, fagositoz aracılığıyla patojen klirensi, myeloperoksidaz aktivitesi aracılığıyla reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesi ve nötrofil hücre dışı tuzakları (NET'ler) ile ilgili rolü olduğu bilinmektedir (122). Bizim çalışmamızda da literatürle tutarlı olarak sağlıklı yaşlılara göre Alzheimer olgularında uyku öncesi plazmasında doğuştan gelen bağışıklık sistemimizin parçası olan nötrofil degranülasyonunda yer

alan proteinler açısından zenginleşme kaydedilmiştir. Ek olarak nötrofil degranülasyonu ile ilişkili hücresel bileşen kategorisindeki (Tersiyer granül lümen; Spesifik granül lümen; Salgı granül lümen) proteinlerde artış görülmüştür. Bu da periferik nötrofil ile ilişkili inflamatuvar proteinler ile AH hastalığının tanımlanabildiğini göstermiştir (123).

Sağlıklı bir beyinde nötrofillerin fizyolojik aktivitesi, endotel hücreler ile sınırlı etkileşim kurarak damar içerisinde serbestçe akmasıyla, AH'de glikokalikteki azalma sonucunda nötrofillerin endotel hücrelerine kontrolsüz bağlanması sebebiyle netosis gerçekleştiği bilinmektedir. Bunun sonucunda oksidatif stres ve kan beyin bariyerinin bütüncül yapısının bozulmasıyla beyin parenkimine filtresiz nötrofil aktarımı ve beraberinde nöron kaybına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (124). Bu da periferik kan plazma örneğinde karşılaşılmış olduğumuz nötrofil aktivitesinin beyin dokusunda artmış nötrofil aktivitesi ile ilişkilendirilebileceğini düşündürmektedir.

Kompleman ve koagülasyon yolları (KEGG: hsa04610) var olan patojen enfeksiyonu ve yaralanmaya karşı aktifleşen, özellikle kompleman sistemi, doğuştan getirdiğimiz bağışıklık sistemimizin önemli bir bileşenidir (125). AH patolojisi ile ilişkili olarak meydana gelen nöroinflamasyon sonucunda da anormal kompleman ve koagülasyon aktivitesi gerçekleşmektedir. Benzer yaklaşımla, çalışma da Alzheimer olgularında uyku sonrası alınan plazma örneğinde bu sistem ile ilişkili proteinlerde uyku öncesi alınmış plazmaya göre artış görülmektedir.

Kompleman ve koagülasyon sistemi nöroinflamatuvar süreçlere cevap olarak merkezi ve periferik sinir sistemi arasındaki iletişim ile sinaptik iletim ve nöronal iletim üzerinde rol oynamaktadır (126). AH'nin erken evresinde glial aktivasyon ve proinflamatuvar sitokin salımına bağlı olarak kompleman sisteminde aktivasyon izlenir (127, 128). A $\beta$  agregasyonu ile oluşan senil plaklar da kompleman proteinleri tespit edilmiştir ve ayrıca serebral anjiyopati tablosunda da beyin vasküler yapısı içerisinde A $\beta$  ile benzer şekilde ko-lokalize halde bulunurlar (129). Sonuç olarak bu etkileşim kompleman aktivitesinin amiloid agregatları ile bir ilişkisi olduğunu düşündürmektedir. Predemansiyel süreç olarak adlandırdığımız hafif kognitif bozukluktan AH'ye dönüşen tabloda kompleman sistemi faktörlerini içeren yüksek

astrosit kaynaklı eksozom seviyeleri izlenmiştir (130). Benzer şekilde mikroglia kaynaklı kompleman sistemi incelediğinde ise transkriptom analizi ile AH hastalarında belirgin şekilde C1qA ve C1qB ekspresyonunun kontrollere göre arttığı ve hastalığın hafif kognitif bozukluktan AH'ye ilerleyişinde C1q'nun ekspresyonun da artış olduğu bilinmektedir. Fizyolojik şartlar içerisinde C1q, nöronal sağkalım ve nöronal dallanma ile ilişkilirken nöropatoloji gelişimi ile birlikte kompleman ve koagülasyon bileşenleri artış gösterir. Bu da sinaptik ileti ve plastisite üzerinde bozucu etkiye sebep olur. Ayrıca reaktif astrositlerin de nöropatolojinin geliştiği durumlarda C1q'yu eksprese ettiği bilinmektedir.

Trombositler, amiloid öncü proteinin (APP) ana periferik kaynağı olup A $\beta$  ve fragmanlarını üretmek için nöronlarla benzer proteolitik işleyişe sahip olduğu bilinmektedir (131). AH'de trombosit APP işleyişi normalden farklı olduğu için trombosit aktivasyonunun AH patofizyolojisinde rolü olabileceği fikri kabul görmektedir (132).

Bazı çalışmalar, AH'li bireyler de trombositlerin aktive olmaya daha yatkın olduğunu göstermiş ve bu durumda A $\beta$ 'yı kana salma eğiliminin daha yüksek olabileceğini öne sürmüştür. Ayrıca trombositlerdeki bu aktive olma durumunun zaman içerisinde amiloid kaskadını tetiklemek suretiyle beyin parankiminde A $\beta$  birikimine sebep olabileceği düşünülmektedir. Bu yaklaşım kapsamında serbest dolaşımda olan A $\beta$ , trombositler üzerindeki reseptörlere bağlanmak suretiyle belirli sinyal yollarını aktive ederek hem alfa granül hem de yoğun granüllerin salgılanmasını uyarak hücre içi trombosit Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonunda bir artışa neden olmaktadır, özellikle A $\beta$ 40 peptidinin bağlanmasıyla trombosit aktivasyonunda bir kısır döngü yaşanarak daha fazla A $\beta$ 40 üretimine sebep olabileceği gösterilmiştir (133, 134). Bir kez kan beyin bariyerini geçtikten sonra A $\beta$ 'nin senil plak oluşumuna yol açarak glial hücrelerin öncülüğünde inflamatuvar bir reaktif süreci tetiklemektedir. Sonuç olarak sitokin, interlökin ve TNF- $\alpha$  üreten makrofaj ve nötrofiller aracılığıyla sistemik bağışıklık cevabını aktive ederek kalıcı nöronal hasara rol açabilir (132). Bu şekilde trombositlerin periferdeki anormal aktivasyonu beyine taşınarak AH'nin patogeneziinde rol oynadığı düşünülmektedir. Bu yaklaşımla uyumlu olarak çalışmamızda Alzheimer ve sağlıklı yaşlı grup karşılaştırıldığında artmış trombosit aktivasyonu ve granülasyonu AH'li olguların

uyku sonrası plazmasında daha yüksek seviyelerdedir (REAC:R-HSA-114608;REAC:R-HSA-76005; REAC:R-HSA-76002; GO:0031093;GO:0031091). Benzer şekilde sağlıklı yaşlıların grup içi (uyku öncesi/sonrası) karşılaştırmalarında da uyku sonrası plazmalarında trombosit aktivasyonu ile ilişkili yolaklar ve gen ontolojisi ile ilişkili terimler de zenginleşme kaydedilmiştir (REAC:R-HSA-114608;REAC:R-HSA-76005; REAC:R-HSA-76002; GO:0050878; GO:0007596; GO:0050817; GO:0007599; GO:0042060; GO:0030168 ). Bu da hem beyinden hem de periferel kandan elde edilen A $\beta$ 'nin fizyolojik olarak temizleme sistem kapasitesini aşabileceğini ve A $\beta$ -trombosit etkileşiminin bu sürece katkısı olduğu fikrini destekler niteliktedir. Uyku sonrası plazmasında bu artışın izlenmesi ise fizyolojik olarak glimfatik sistemin katkısının olabileceği düşüncesini desteklemektedir.

### **7.3. Periferel Kan Plazma Örneğinin Beyin Lenfatik Drenaj Sisteminin Fonksiyonunu Yansıtmadaki Başarısı Nedir?**

Hem fonksiyonel zenginleştirme hem de protein etkileşim analiz sonuçlarına baktığımızda ortak olarak AH patogenezi ile ilişkili olduğu düşünülen uyku sonrası periferel kan plazmasında zenginleşmiş protein yolakları ve etkileşimleri izlenmiştir. Önceki bölümlerde nörotoksisite ve AH nöropatolojisi ile ilişkili bu protein yolakları ve etkileşimleri çalışma kapsamında ele alınmıştır. Bunlara ek olarak beyin lenfatik drenaj sistemi fonksiyonunu yansıtabileceği düşünülen yolaklar, sağlıklı yaşlılarda grup içi uyku öncesi ve sonrası karşılaştırmasında uyku sonrası plazmasında ERBB4 sinyalleşmesinde PI3K olayları (REAC:R-HSA-1250342) ve VEGFA-VEGFR2 sinyal yolağındaki (WP:WP3888) artış olarak kaydedilmiştir.

NRG1 nöronal sağkalım, sinaptogenez, astrositik farklılaşma ve mikroglial aktivasyonu düzenleyerek sinir sistemi gelişiminde rol oynar (135). NRG1, ErbB reseptörü (EGF reseptörü) tirozin kinazlarını aktive edebilen bir trofik faktördür (136). Yakın tarihli bazı araştırmalar, NRG1 sinyalinin AH'de bilişsel işlev ve nöropatolojisi ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (136-138). NRG1, Morris su labirenti davranışsal görevinde AH transgenik farelerde nöropatolojik iyileşmenin eşlik ettiği bellek bozukluklarını hafiflettiği izlenmiştir (139). Bununla tutarlı olarak demans hastalarından elde edilen buffy coat örneklerinde NRG1 mRNA seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir (138). Sağlıklı yaşlılarda uyku sonrası

plazmasında neuroglin-1 proteini ve ilişkili olduğu ERBB4 sinyalleşmesinde PI3K olayları yolağında uyku öncesine göre zenginleşme izlenmiştir. Uyku sonrasında izlenen bu değişiklik, NRG1'in indüklediği bu yolağın A $\beta$ 42'nin neden olduğu nörotoksitenin önlenmesindeki rolüne odaklanan daha önceki çalışmalar sebebi ile de dikkat çekmektedir. Önceki çalışmalarda PI3K/Akt aktivasyonunun inhibisyonu sonucunda, NRG1'in A $\beta$ 42 ile indüklenen LDH salınımını önleme yeteneğini ortadan kaldırarak primer kortikal nöronlarda TUNEL-pozitif hücrelerin sayılarını arttırma ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimini göstermiş olmasından dolayı önemlidir (140). Bu da NRG1 sinyalinin PI3K/Akt sinyal yolunun aktivasyonu ile A $\beta$ 42'nin neden olduğu nörotoksiteye karşı bir nöroprotektif etki uyguladığını göstermektedir. Ek olarak başka bir çalışmada APP/PS1 transgenik farelerde NRG1 $\beta$ 1, PI3-kinaz/Akt'ın ErbB4'e bağlı aktivasyonu yoluyla nöronal apoptozu antagonize ettiği gösterilmiştir. NRG1 $\beta$ 1'in hücre dışı alanı, hem in vitro çalışmalarda hem de APP/PS1 transgenik farelerde p-ErbB4 reseptörü ve p-Akt ekspresyonunu destekleyip Bcl-2 seviyesini arttırmıştır. Bu da AH'de nöronal koruma işlevi gören olası koruyucu mekanizmanın PI3-kinaz/Akt yolunun ErbB4'e bağlı aktivasyonu yoluyla gerçekleştiğini göstermektedir (141).

Ayrıca NRG1 sinyal yolağının nöroinflamasyonda da rolü olduğu bilinmektedir. NRG1, TNF- $\alpha$  ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz inflamatuvar faktörlerinin ekspresyonunu azaltıp mikroglia'nın aracılık ettiği nöroinflamatuvar yanıtı inhibe ettiği bilinmektedir. Bu durumda mikroglia'nın proinflamatuvar M1 fenotipinden anti-inflamatuvar M2 fenotipine dönüşümünü, ErbB4'ün aktivasyonu aracılığı ile NF- $\kappa$ B sinyal yolunu inhibe ederek engelliyor olabileceği fikri yapılan çalışmalar ile desteklenmiştir (137).

Beyin lenfatik drenaj sistemi fonksiyonunu yansıtabileceği düşünülen bir diğer yolak VEGFA-VEGFR2 sinyal iletim ağıdır (WP:WP3888). Bu sinyal iletim ağı, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) sistemi içerisinde öne çıkan ligand reseptör kompleksi olup hücre çoğalması, göçü, hayatta kalma ve anjiyogenezde yer alan yeni damar oluşumunda görevi olduğu bilinmektedir (142). VEGFA'nın nörodejeneratif hastalığındaki rolü oldukça karmaşıktır örneğin AH için yapılmış olunan çalışmalarda VEGFA geni ve protein ekspresyonunun beyin, kan ve BOS'da hem artışı hem de azalışı ile ilgili çeşitli kanıtlar mevcuttur (143). Bu çalışmada ise

sağlıklı yaşlılarda uyku sonrası plazmasında bu sinyal yolağında uyku öncesine göre zenginleşme izlenmiş ve daha çok glimfatik sistemin işleyişi ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Glimfatik sistem bir atık bertaraf sistemi olup, sıkıca paketlenmiş beyin parankimindeki hücre dışı boşluklardan perivenöz akış yolları boyunca kıvrımlı, makaslamayı indükleyen bir geçişe dayanır (144). A $\beta$  ve diğer proteinler için sıvı makaslamanın, amiloid kaskad reaksiyonlarını başlatan daha önce "katlanmamış" veya "yanlış katlanmış" proteinler olarak tanımlanmış olan bozulmuş konformasyona sahip A $\beta$  moleküler durumlarını indüklediği ve AH nörotoksitesine katkıda bulunan bir faktör olduğu öne sürülmektedir (144). Bu yaklaşım doğrultusunda glimfatik akışın, perivasküler BOS veya ISF dinamikleri tarafından üretilen sıvı makaslama stresi tarafından düzenlendiği ve mekanik transdüksiyon açısından glimfatik akış için önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir (145).

Son yıllarda endotelial hücre yüzeyindeki bazı moleküllerin mekanik reseptörler olarak hareket ettiği öne sürülmüştür, VEGFR2'de bunlardan biridir. Glimfatik akış üzerinde düzenleyici rolü olan makaslama stresine maruz kalan endotelial hücreler, bir mekanik dönüştürücü olarak işlev gören VEGFR-2 ve VE-cadherin- $\beta$ -katenin kompleksinin oluşumunu indüklediği ve dolayısıyla VEGFR-2 ve beraberinde yapışık bağlantının makaslama gerilimi sinyallerinin vasküler endotelial hücrelere iletilmesine aracılık ettiği bilinmektedir (146). Bu bağlamda baktığımızda uyku sonrası periferik plazma örneğinde sağlıklı yaşlılarda artmış VEGFA-VEGFR2 sinyal iletim yolağı dolaylı olarak bize glimfatik sistem işleyişini yansıtır olabileceğini düşündürmektedir.

VEGF'nin endotel hücrelerinin yanı sıra yaygın olarak astrositlerde ve nöronlarda da eksprese edildiği bilinmektedir. VEGF-A, yara iyileşmesi ve vasküler rejenerasyonda kritik olan proanjyogenik bir faktör olması yanı sıra aynı zamanda vasküler sızıntıyı da teşvik ettiği ve eksojen VEGF-A'nın KBB bozulmasını doğrudan taklit etmek için kullanılabilirliği bilinmektedir (147, 148). Bununla uyumlu olarak intraserebral VEGF enjeksiyonunun, hem KBB'de hem de glia limitans eksternada AQP4 ekspresyonunun etkili bir indükleyicisi olduğu gösterilmiştir (149).

Reaktif astrositler tarafından eksprese edildiği bilinen VEGF-A, claudin-5 ve okludin ekspresyonunu bozarak KBB yıkımını indükler ve böylece MSS'ne immün hücre infiltrasyonunu arttırmış olur (150). Bu sürece katkısı olduğu düşünülen aktive edilmiş mikroglianın da IL-1, TNF- $\alpha$  gibi sitokinlerin yanı sıra VEGF-A serbestlediği de bilinmektedir (151). Sonuç olarak AH nöropatolojisi ile ilişkili yıkıcı glial aktivasyon sürecinin VEGF-A aracılığı ile nörodejeneratif süreçleri indükleye bildiği fikri kabul edilebilir.

AH'de VEGFR2'nin değişiklik gösterdiği bilinmektedir. Alzheimer transgenik fare beyin dokusunda ve endotelial hücrelerin A $\beta$  muamele edilmesi sonucunda VEGFR2 ve çözümlenür VEGFR2 düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı ve bunun da AH plazmasında VEGF artmasına karşın plazma çözümlenür VEGFR2 düzeylerinin azalmasını açıkladığı düşünülmektedir (152). AH'de VEGF sinyalleşmesinin düzensizliği ile glimfatik sistem fonksiyon kaybının korelasyonunu anlamak beyin drenaj sisteminin işleyişini anlamak açısından önemli olabilir.

#### **7.4. Klinik ve Translasyonel Alzheimer Çalışmaları İçin Bir Araç Olarak Beyin Lenfatik Drenaj Sistemi**

Kan bazlı biyobelirteçler açısından son zamanlarda AH tanı ve prognostik çalışmalarında olağanüstü ilerleme kaydedilmiştir (23). Biyobelirteçlerin yakın zamanda geliştirilmesiyle olası bir dönüm noktası geçilmiş olup AH'yi ayırt etmekte plazmada ölçülebilen A $\beta$ 42/A $\beta$ 40, f-tau (treonin 181 veya treonin 217'de fosforilize edilmiş), NfL, glial aktivasyon ve kan-beyin bariyeri işlevi yüksek tanısal performans göstermiştir (23, 24). Bununla birlikte bu belirteçler AH için potansiyel bir tahminci olarak rapor edilmiş olmasına karşın çalışmalar arasında tutarsız sonuçlar da göstermiştir (99). Kan bazlı biyobelirteç çalışmalarında bu ve benzeri sorunların çözümlenmesi, en umut verici kan bazlı biyobelirteçlerin belirlenmesi, alandaki var olan bilgi boşluklarının doldurulması ve dahası klinik ve araştırma denemelerinde uygun kullanım önerileri yakın zamanda bu alandaki uzman grup tarafından tanımlanan konsensüs sonucunda açıklanmıştır (96).

Kan bazlı belirteçler taranırken araştırmacılar tarafından sirkadiyen ve uykuya bağımlı olarak plazma da meydana gelebilecek olan olası değişiklikler göz ardı edilmektedir. Oysaki uzun süreli uyanıklık boyunca polar metabolitlerin plazmada,

sirkadiyen ve uyanıklığa bağılı olarak değişen modülasyonu gösterilmiştir (153). Uykuya bağılı olarak aktive olan beyin glimfatik sistemi ve beraberinde lenfatik drenajın da sirkadiyen kontrol altında olduğu ve AQP4'ün bu ritmi desteklediği bilinmektedir (154). Bu doğrultuda AH ve sağlıklı kişilerin kan plazma proteom çalışmalarının değerlendirmesin de uyku değişkeninin kontrol altında olmasının önemli olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmanın sonuçları da düşüncemizi destekler nitelikte hem sağlıklı yaşlılarda hem de Alzheimer grubundaki katılımcılar da uykuya bağılı olarak elde etmiş olduğumuz plazma proteom sonuçlarının hem grup içi hem de gruplar arası karşılaştırılması sonucunda hastalığın nöropatogenizi ve beyin drenaj sistemi ile ilişkilendire bileceğimiz sinyal yolaklarında değişiklik izlenmiştir.

Bununla beraber literatür de var olan AH ile ilişkili (DOID:10652) bir protein alt ağı ile çalışma sonucunda elde edilen proteinleri karşılaştırdığımızda da hem sağlıklı yaşlı hem de Alzheimer grubunda eşleşmiş olan proteinler uykuya bağılı olarak (öncesi/sonrası) sayıca değişiklik göstermiştir (Şekil 6.5.7 ve Şekil 6.5.8). Uykuya bağılı olarak değişen protein sayı farkı spot olarak anlam ifade etmese de diyagnostik açıdan önem arz edeceği düşünülmektedir. Yine sağlıklı yaşlıların uyku öncesi ve sonrası anlamlı ifadesi değişen proteinlerin AH protein alt ağı ile karşılaştırılmasında sadece uyku sonrası plazmasında ifadesi değişen proteinler de etkileşim izlenmiştir. Etkileşim içinde bulunan proteinlerin de Mikroglia patojen fagositoz yolu (filamin A, vinculin, fibronectin 1 ve inter-alpha trypsininhibitör heavy chain 4) ve Trombosit degranülasyonu yolaklarında (complement C1qA chain ve complement C1qB chain) zenginleştiği görülmüştür. Bu sonuçta hem fonksiyonel zenginleşme hem de protein etkileşim analizi ile tutarlı olarak değerlendirilmiştir.



## 8. SONUÇ

Bu tez, AH de izlenen nöropatolojinin orijini ve AH'yi tanımlama da kullanılan klinik ve translasyonel araştırmalar sonucundaki güncel yaklaşımlar ile birlikte uyku değişkenine bağlı olarak AH ve sağlıklı kişilerde meydana gelen beyin lenfatik drenaj sisteminin çalışma sistematiğini sorgulamaktadır.

Bulgular, uykuya bağımlı olarak (uyku öncesi/uyku sonrası) elde edilen plazma örneklerinin, hipokampal nöron költürü üzerindeki nörotoksik etkisi ve proteom profili değişikliğinin, tespit edilen protein ve fonksiyonel yollar aracılığıyla beyin drenaj sisteminin fonksiyonunu yansıtabileceğini göstermiştir. Daha spesifik olarak, sonuçlar şunları içermektedir:

1. Çalışma sonucunda, periferal kan plazma örneğinin merkezi sinir sistemi hücresi olan hipokampal nöron költürü üzerinde olumsuz etkisi olmasına karşın aynı etkinin niteliksel açıdan periferik sinir sisteminde yer alan dorsal arka kök ganglion nöron költüründe izlenilmemiştir;
2. sağlıklı yaşlıların uyku sonrası plazması uyku öncesine göre primer hipokampal nöron költürü üzerinde nörotoksik etki göstermiştir. Diğer koşullar için bu anlamlı farklılık izlenmemiştir;
3. proteom profili açısından sağlıklı kişilerin uyku sonrası plazmasında uyku öncesine göre immun yanıt artışı izlenmektedir;
4. AH'de uyku sonrası plazmasının uyku öncesine göre kompleman ve koagölasyon yolundaki aktivasyon artışı hastalığa özgül bir iz olabileceğini düşündürmüştür;
5. her iki grup için uykuya bağlı olarak değişen protein sayı farkı spot olarak anlam ifade etmese de diyagnostik açıdan önem arz ediyor olabileceği düşünölmektedir;
6. Çalışma sonucunda her iki grup için uykuya bağlı olarak anlamlı değişen ve dolaylı olarak beyin drenaj sisteminin fonksiyonunu yansıtan protein yollarındaki artış, beyin klirens işleyişi hakkında fikir vermekle birlikte nöropatolojik koşulda göstermiş olduğu değişikliğın daha iyi tanımlanabilmesi adına demans öncesi hafif kognitif bozukluk

durumunda da benzer çalışmaların yapılmasının uygun olacağı düşünölmüştür.



## 9. KAYNAKLAR

1. Erkinen MG, Kim MO, Geschwind MD. Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018 Apr 2;10(4). PubMed PMID: 28716886. Epub 2017/07/19.
2. Mirza Z, Ali A, Ashraf GM, Kamal MA, Abuzenadah AM, Choudhary AG, et al. Proteomics Approaches to Understand Linkage Between Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. *Cns Neurol Disord-Dr.* 2014;13(2):213-25. PubMed PMID: WOS:000340835800006. English.
3. Gauthier S R-NP, Morais JA, & Webster C. World Alzheimer Report. Journey through the diagnosis of dementia London, England: Alzheimer's Disease International. 2021.
4. Perl DP. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.* 2010 Jan-Feb;77(1):32-42. PubMed PMID: 20101720. PMCID: PMC2918894. Epub 2010/01/27.
5. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82(4):239-59. PubMed PMID: 1759558. Epub 1991/01/01.
6. Jessen NA, Munk AS, Lundgaard I, Nedergaard M. The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem Res.* 2015 Dec;40(12):2583-99. PubMed PMID: 25947369. PMCID: PMC4636982. Epub 2015/05/08.
7. DeMattos RB, Bales KR, Parsadanian M, O'Dell MA, Foss EM, Paul SM, et al. Plaque-associated disruption of CSF and plasma amyloid-beta (A $\beta$ ) equilibrium in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2002 Apr;81(2):229-36. PubMed PMID: 12064470. Epub 2002/06/18.
8. Plog BA, Nedergaard M. The Glymphatic System in Central Nervous System Health and Disease: Past, Present, and Future. *Annu Rev Pathol.* 2018 Jan 24;13:379-94. PubMed PMID: 29195051. PMCID: PMC5803388. Epub 2017/12/02.
9. 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 beta. *Sci Transl Med.* 2012 Aug

15;4(147):147ra11. PubMed PMID: 22896675. PMCID: PMC3551275. Epub 2012/08/17.

10. Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiyagarajan M, et al. Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science*. 2013 Oct 18;342(6156):373-7. PubMed PMID: 24136970. PMCID: PMC3880190. Epub 2013/10/19.

11. Yulug B, Hanoglu L, Kilic E. Does sleep disturbance affect the amyloid clearance mechanisms in Alzheimer's disease? *Psychiatry Clin Neurosci*. 2017 Oct;71(10):673-7. PubMed PMID: 28523718. Epub 2017/05/20.

12. Ooms S, Overeem S, Besse K, Rikkert MO, Verbeek M, Claassen JA. Effect of 1 night of total sleep deprivation on cerebrospinal fluid beta-amyloid 42 in healthy middle-aged men: a randomized clinical trial. *JAMA Neurol*. 2014 Aug;71(8):971-7. PubMed PMID: 24887018. Epub 2014/06/03.

13. Kress BT, Iliff JJ, Xia M, Wang M, Wei HS, Zeppenfeld D, et al. Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain. *Ann Neurol*. 2014 Dec;76(6):845-61. PubMed PMID: 25204284. PMCID: PMC4245362. Epub 2014/09/11.

14. Iliff JJ, Wang M, Zeppenfeld DM, Venkataraman A, Plog BA, Liao Y, et al. Cerebral arterial pulsation drives paravascular CSF-interstitial fluid exchange in the murine brain. *J Neurosci*. 2013 Nov 13;33(46):18190-9. PubMed PMID: 24227727. PMCID: PMC3866416. Epub 2013/11/15.

15. Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 May;25(5):932-43. PubMed PMID: 15731494. Epub 2005/02/26.

16. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Jr., Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011 May;7(3):263-9. PubMed PMID: 21514250. PMCID: 3312024.

17. Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clinical anatomy*. 1995;8(6):429-31. PubMed PMID: 8713166.
18. Keuck L. Diagnosing Alzheimer's disease in Kraepelin's clinic, 1909–1912. *History of the Human Sciences*. 2018;31(2):42-64.
19. DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2019 Aug 2;14(1):32. PubMed PMID: 31375134. PMCID: 6679484.
20. Jack CR, Jr., Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, et al. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *The Lancet Neurology*. 2013 Feb;12(2):207-16. PubMed PMID: 23332364. PMCID: 3622225.
21. Pereira JB, Janelidze S, Stomrud E, Palmqvist S, van Westen D, Dage JL, et al. Plasma markers predict changes in amyloid, tau, atrophy and cognition in non-demented subjects. *Brain*. 2021 Oct 22;144(9):2826-36. PubMed PMID: 34077494. PMCID: 8557344.
22. Molinuevo JL, Ayton S, Batrla R, Bednar MM, Bittner T, Cummings J, et al. Current state of Alzheimer's fluid biomarkers. *Acta Neuropathol*. 2018 Dec;136(6):821-53. PubMed PMID: 30488277. PMCID: 6280827.
23. Hansson O. Biomarkers for neurodegenerative diseases. *Nature medicine*. 2021 Jun;27(6):954-63. PubMed PMID: 34083813.
24. Palmqvist S, Tideman P, Cullen N, Zetterberg H, Blennow K, Alzheimer's Disease Neuroimaging I, et al. Prediction of future Alzheimer's disease dementia using plasma phospho-tau combined with other accessible measures. *Nature medicine*. 2021 Jun;27(6):1034-42. PubMed PMID: 34031605.
25. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984 May 16;120(3):885-90. PubMed PMID: 6375662.

26. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta pharmacologica Sinica*. 2017 Sep;38(9):1205-35. PubMed PMID: 28713158. PMCID: 5589967.
27. Bu XL, Xiang Y, Jin WS, Wang J, Shen LL, Huang ZL, et al. Blood-derived amyloid-beta protein induces Alzheimer's disease pathologies. *Mol Psychiatry*. 2018 Sep;23(9):1948-56. PubMed PMID: 29086767.
28. Tornquist M, Michaels TCT, Sanagavarapu K, Yang X, Meisl G, Cohen SIA, et al. Secondary nucleation in amyloid formation. *Chemical communications*. 2018 Aug 2;54(63):8667-84. PubMed PMID: 29978862.
29. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002 Jul 19;297(5580):353-6. PubMed PMID: 12130773.
30. Lewczuk P, Esselmann H, Otto M, Maler JM, Henkel AW, Henkel MK, et al. Neurochemical diagnosis of Alzheimer's dementia by CSF A $\beta$ <sub>42</sub>, A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub> ratio and total tau. *Neurobiol Aging*. 2004 Mar;25(3):273-81. PubMed PMID: 15123331.
31. Shoji M, Matsubara E, Kanai M, Watanabe M, Nakamura T, Tomidokoro Y, et al. Combination assay of CSF tau, A $\beta$ <sub>1-40</sub> and A $\beta$ <sub>1-42</sub>(43) as a biochemical marker of Alzheimer's disease. *Journal of the neurological sciences*. 1998 Jun 30;158(2):134-40. PubMed PMID: 9702683.
32. Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, Kato T, Doecke J, Dore V, et al. High performance plasma amyloid-beta biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*. 2018 Feb 8;554(7691):249-54. PubMed PMID: 29420472.
33. Palmqvist S, Janelidze S, Stomrud E, Zetterberg H, Karl J, Zink K, et al. Performance of Fully Automated Plasma Assays as Screening Tests for Alzheimer Disease-Related beta-Amyloid Status. *JAMA Neurol*. 2019 Sep 1;76(9):1060-9. PubMed PMID: 31233127. PMCID: 6593637.
34. Schindler SE, Bollinger JG, Ovod V, Mawuenyega KG, Li Y, Gordon BA, et al. High-precision plasma beta-amyloid 42/40 predicts current and future brain

amyloidosis. *Neurology*. 2019 Oct 22;93(17):e1647-e59. PubMed PMID: 31371569. PMCID: 6946467.

35. Verberk IMW, Slot RE, Verfaillie SCJ, Heijst H, Prins ND, van Berckel BNM, et al. Plasma Amyloid as Prescreener for the Earliest Alzheimer Pathological Changes. *Ann Neurol*. 2018 Nov;84(5):648-58. PubMed PMID: 30196548. PMCID: 6282982.

36. Janelidze S, Stomrud E, Palmqvist S, Zetterberg H, van Westen D, Jeromin A, et al. Plasma beta-amyloid in Alzheimer's disease and vascular disease. *Sci Rep*. 2016 May 31;6:26801. PubMed PMID: 27241045. PMCID: 4886210.

37. Arendt T, Stieler JT, Holzer M. Tau and tauopathies. *Brain research bulletin*. 2016 Sep;126(Pt 3):238-92. PubMed PMID: 27615390.

38. Conze C, Rierola M, Trushina NI, Peters M, Janning D, Holzer M, et al. Caspase-cleaved tau is senescence-associated and induces a toxic gain of function by putting a brake on axonal transport. *Mol Psychiatry*. 2022 Apr 7. PubMed PMID: 35393558.

39. Karikari TK, Pascoal TA, Ashton NJ, Janelidze S, Benedet AL, Rodriguez JL, et al. Blood phosphorylated tau 181 as a biomarker for Alzheimer's disease: a diagnostic performance and prediction modelling study using data from four prospective cohorts. *The Lancet Neurology*. 2020 May;19(5):422-33. PubMed PMID: 32333900.

40. Lantero Rodriguez J, Karikari TK, Suarez-Calvet M, Troakes C, King A, Emersic A, et al. Plasma p-tau181 accurately predicts Alzheimer's disease pathology at least 8 years prior to post-mortem and improves the clinical characterisation of cognitive decline. *Acta Neuropathol*. 2020 Sep;140(3):267-78. PubMed PMID: 32720099. PMCID: 7423866.

41. Palmqvist S, Janelidze S, Quiroz YT, Zetterberg H, Lopera F, Stomrud E, et al. Discriminative Accuracy of Plasma Phospho-tau217 for Alzheimer Disease vs Other Neurodegenerative Disorders. *Jama*. 2020 Aug 25;324(8):772-81. PubMed PMID: 32722745. PMCID: 7388060.

42. Barro C, Chitnis T, Weiner HL. Blood neurofilament light: a critical review of its application to neurologic disease. *Annals of clinical and translational neurology*. 2020 Dec;7(12):2508-23. PubMed PMID: 33146954. PMCID: 7732243.
43. Ashton NJ, Janelidze S, Al Khleifat A, Leuzy A, van der Ende EL, Karikari TK, et al. A multicentre validation study of the diagnostic value of plasma neurofilament light. *Nature communications*. 2021 Jun 7;12(1):3400. PubMed PMID: 34099648. PMCID: 8185001.
44. Khalil M, Teunissen CE, Otto M, Piehl F, Sormani MP, Gatteringer T, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nature reviews Neurology*. 2018 Oct;14(10):577-89. PubMed PMID: 30171200.
45. Lewczuk P, Ermann N, Andreasson U, Schultheis C, Podhorna J, Spitzer P, et al. Plasma neurofilament light as a potential biomarker of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2018 Jul 28;10(1):71. PubMed PMID: 30055655. PMCID: 6064615.
46. Preische O, Schultz SA, Apel A, Kuhle J, Kaeser SA, Barro C, et al. Serum neurofilament dynamics predicts neurodegeneration and clinical progression in presymptomatic Alzheimer's disease. *Nature medicine*. 2019 Feb;25(2):277-83. PubMed PMID: 30664784. PMCID: 6367005.
47. Cicognola C, Janelidze S, Hertze J, Zetterberg H, Blennow K, Mattsson-Carlgren N, et al. Plasma glial fibrillary acidic protein detects Alzheimer pathology and predicts future conversion to Alzheimer dementia in patients with mild cognitive impairment. *Alzheimers Res Ther*. 2021 Mar 27;13(1):68. PubMed PMID: 33773595. PMCID: 8005231.
48. Verberk IMW, Thijssen E, Koelewijn J, Mauroo K, Vanbrabant J, de Wilde A, et al. Combination of plasma amyloid beta(1-42/1-40) and glial fibrillary acidic protein strongly associates with cerebral amyloid pathology. *Alzheimers Res Ther*. 2020 Sep 28;12(1):118. PubMed PMID: 32988409. PMCID: 7523295.
49. Cai Z, Qiao PF, Wan CQ, Cai M, Zhou NK, Li Q. Role of Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2018;63(4):1223-34. PubMed PMID: 29782323.



50. Janelidze S, Hertze J, Nagga K, Nilsson K, Nilsson C, Swedish Bio FSG, et al. Increased blood-brain barrier permeability is associated with dementia and diabetes but not amyloid pathology or APOE genotype. *Neurobiol Aging*. 2017 Mar;51:104-12. PubMed PMID: 28061383. PMCID: 5754327.
51. Kumar A, Ghosh SK, Faiq MA, Deshmukh VR, Kumari C, Pareek V. A brief review of recent discoveries in human anatomy. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2019 Aug 1;112(8):567-73. PubMed PMID: 30335170.
52. Peng W, Achariyar TM, Li B, Liao Y, Mestre H, Hitomi E, et al. Suppression of glymphatic fluid transport in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2016 Sep;93:215-25. PubMed PMID: 27234656. PMCID: 4980916.
53. Zhang L, Chopp M, Jiang Q, Zhang Z. Role of the glymphatic system in ageing and diabetes mellitus impaired cognitive function. *Stroke and vascular neurology*. 2019 Jul;4(2):90-2. PubMed PMID: 31338217. PMCID: 6613875.
54. Hershenhouse KS, Shaully O, Gould DJ, Patel KM. Meningeal Lymphatics: A Review and Future Directions From a Clinical Perspective. *Neuroscience insights*. 2019;14:1179069519889027. PubMed PMID: 32363346. PMCID: 7176397.
55. 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 Apr - May;163-164:118-43. PubMed PMID: 28903061.
56. Yang G, Deng N, Liu Y, Gu Y, Yao X. Evaluation of Glymphatic System Using Diffusion MR Technique in T2DM Cases. *Frontiers in human neuroscience*. 2020;14:300. PubMed PMID: 32922272. PMCID: 7456821.
57. Lee HJ, Lee DA, Shin KJ, Park KM. Glymphatic system dysfunction in obstructive sleep apnea evidenced by DTI-ALPS. *Sleep medicine*. 2022 Jan;89:176-81. PubMed PMID: 35030357.
58. Liu J, Guo Y, Zhang C, Zeng Y, Luo Y, Wang G. Clearance Systems in the Brain, From Structure to Function. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2021;15:729706. PubMed PMID: 35173581. PMCID: 8841422.

59. Mestre H, Tithof J, Du T, Song W, Peng W, Sweeney AM, et al. Flow of cerebrospinal fluid is driven by arterial pulsations and is reduced in hypertension. *Nature communications*. 2018 Nov 19;9(1):4878. PubMed PMID: 30451853. PMCID: 6242982.
60. Kiviniemi V, Wang X, Korhonen V, Keinänen T, Tuovinen T, Autio J, et al. Ultra-fast magnetic resonance encephalography of physiological brain activity - Glymphatic pulsation mechanisms? *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2016 Jun;36(6):1033-45. PubMed PMID: 26690495. PMCID: 4908626.
61. Horsburgh K, Wardlaw JM, van Agetmael T, Allan SM, Ashford MLJ, Bath PM, et al. Small vessels, dementia and chronic diseases - molecular mechanisms and pathophysiology. *Clinical science*. 2018 Apr 30;132(8):851-68. PubMed PMID: 29712883. PMCID: 6700732.
62. 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 Jan 1;74(1):91-9. PubMed PMID: 27893874.
63. Reeves BC, Karimy JK, Kundishora AJ, Mestre H, Cerci HM, Matouk C, et al. Glymphatic System Impairment in Alzheimer's Disease and Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus. *Trends in molecular medicine*. 2020 Mar;26(3):285-95. PubMed PMID: 31959516. PMCID: 7489754.
64. Oliver G, Kipnis J, Randolph GJ, Harvey NL. The Lymphatic Vasculature in the 21(st) Century: Novel Functional Roles in Homeostasis and Disease. *Cell*. 2020 Jul 23;182(2):270-96. PubMed PMID: 32707093. PMCID: 7392116.
65. Escobedo N, Oliver G. The Lymphatic Vasculature: Its Role in Adipose Metabolism and Obesity. *Cell metabolism*. 2017 Oct 3;26(4):598-609. PubMed PMID: 28844882. PMCID: 5629116.
66. Aspelund A, Anttila S, Proulx ST, Karlsen TV, Karaman S, Detmar M, et al. A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and

macromolecules. *The Journal of experimental medicine*. 2015 Jun 29;212(7):991-9. PubMed PMID: 26077718. PMCID: 4493418.

67. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. 2015 Jul 16;523(7560):337-41. PubMed PMID: 26030524. PMCID: 4506234.

68. Da Mesquita S, Louveau A, Vaccari A, Smirnov I, Cornelison RC, Kingsmore KM, et al. Functional aspects of meningeal lymphatics in ageing and Alzheimer's disease. *Nature*. 2018 Aug;560(7717):185-91. PubMed PMID: 30046111. PMCID: 6085146.

69. Rasmussen MK, Mestre H, Nedergaard M. Fluid transport in the brain. *Physiological reviews*. 2022 Apr 1;102(2):1025-151. PubMed PMID: 33949874. PMCID: 8897154.

70. Mogensen FL, Delle C, Nedergaard M. The Glymphatic System (En)during Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 13;22(14). PubMed PMID: 34299111. PMCID: 8305763.

71. Li J, Vitiello MV, Gooneratne NS. Sleep in Normal Aging. *Sleep medicine clinics*. 2022 Jun;17(2):161-71. PubMed PMID: 35659071.

72. Copinschi G, Caufriez A. Sleep and hormonal changes in aging. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2013 Jun;42(2):371-89. PubMed PMID: 23702407.

73. Reddy OC, van der Werf YD. The Sleeping Brain: Harnessing the Power of the Glymphatic System through Lifestyle Choices. *Brain sciences*. 2020 Nov 17;10(11). PubMed PMID: 33212927. PMCID: 7698404.

74. Fultz NE, Bonmassar G, Setsompop K, Stickgold RA, Rosen BR, Polimeni JR, et al. Coupled electrophysiological, hemodynamic, and cerebrospinal fluid oscillations in human sleep. *Science*. 2019 Nov 1;366(6465):628-31. PubMed PMID: 31672896. PMCID: 7309589.

75. Leger D, Debellemanni E, Rabat A, Bayon V, Benchenane K, Chennaoui M. Slow-wave sleep: From the cell to the clinic. *Sleep medicine reviews*. 2018 Oct;41:113-32. PubMed PMID: 29490885.
76. Rainey-Smith SR, Mazzucchelli GN, Villemagne VL, Brown BM, Porter T, Weinborn M, et al. Genetic variation in Aquaporin-4 moderates the relationship between sleep and brain Abeta-amyloid burden. *Translational psychiatry*. 2018 Feb 26;8(1):47. PubMed PMID: 29479071. PMCID: 5865132.
77. Peters R. Ageing and the brain. *Postgraduate medical journal*. 2006 Feb;82(964):84-8. PubMed PMID: 16461469. PMCID: 2596698.
78. Harada CN, Natelson Love MC, Triebel KL. Normal cognitive aging. *Clinics in geriatric medicine*. 2013 Nov;29(4):737-52. PubMed PMID: 24094294. PMCID: 4015335.
79. Nyberg L, Lovden M, Riklund K, Lindenberger U, Backman L. Memory aging and brain maintenance. *Trends in cognitive sciences*. 2012 May;16(5):292-305. PubMed PMID: 22542563.
80. Shi L, Chen SJ, Ma MY, Bao YP, Han Y, Wang YM, et al. Sleep disturbances increase the risk of dementia: A systematic review and meta-analysis. *Sleep medicine reviews*. 2018 Aug;40:4-16. PubMed PMID: 28890168.
81. Yaffe K, Falvey CM, Hoang T. Connections between sleep and cognition in older adults. *The Lancet Neurology*. 2014 Oct;13(10):1017-28. PubMed PMID: 25231524.
82. Meerlo P, Mistlberger RE, Jacobs BL, Heller HC, McGinty D. New neurons in the adult brain: the role of sleep and consequences of sleep loss. *Sleep medicine reviews*. 2009 Jun;13(3):187-94. PubMed PMID: 18848476. PMCID: 2771197.
83. Tononi G, Cirelli C. Sleep and synaptic homeostasis: a hypothesis. *Brain research bulletin*. 2003 Dec 15;62(2):143-50. PubMed PMID: 14638388.
84. McAlpine CS, Kiss MG, Rattik S, He S, Vassalli A, Valet C, et al. Sleep modulates haematopoiesis and protects against atherosclerosis. *Nature*. 2019 Feb;566(7744):383-7. PubMed PMID: 30760925. PMCID: 6442744.

85. Boespflug EL, Simon MJ, Leonard E, Grafe M, Woltjer R, Silbert LC, et al. Targeted Assessment of Enlargement of the Perivascular Space in Alzheimer's Disease and Vascular Dementia Subtypes Implicates Astroglial Involvement Specific to Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2018;66(4):1587-97. PubMed PMID: 30475760. PMCID: 6360949.
86. Jia Y, Liu C, Li H, Li X, Wu J, Zhao Y, et al. Enlarged Perivascular Space and Its Correlation with Polysomnography Indicators of Obstructive Sleep Apnea. *Nature and science of sleep.* 2021;13:863-72. PubMed PMID: 34211302. PMCID: 8242141.
87. Iliff JJ, Lee H, Yu M, Feng T, Logan J, Nedergaard M, et al. Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI. *The Journal of clinical investigation.* 2013 Mar;123(3):1299-309. PubMed PMID: 23434588. PMCID: 3582150.
88. Falter A, Van Den Bossche MJA. How non-rapid eye movement sleep and Alzheimer pathology are linked. *World journal of psychiatry.* 2021 Nov 19;11(11):1027-38. PubMed PMID: 34888171. PMCID: 8613758.
89. Simon M, Wang MX, Ismail O, Braun M, Schindler AG, Reemmer J, et al. Loss of perivascular aquaporin-4 localization impairs glymphatic exchange and promotes amyloid beta plaque formation in mice. *Alzheimers Res Ther.* 2022 Apr 26;14(1):59. PubMed PMID: 35473943. PMCID: 9040291.
90. Korte N, Nortley R, Attwell D. Cerebral blood flow decrease as an early pathological mechanism in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2020 Dec;140(6):793-810. PubMed PMID: 32865691. PMCID: 7666276.
91. Lee WJ, Jung KH, Park HM, Sohn CH, Lee ST, Park KI, et al. Periodicity of cerebral flow velocity during sleep and its association with white-matter hyperintensity volume. *Sci Rep.* 2019 Oct 29;9(1):15510. PubMed PMID: 31664128. PMCID: 6820785.
92. Im JJ, Jeong HS, Park JS, Na SH, Chung YA, Yang Y, et al. Associations between Brain Perfusion and Sleep Disturbance in Patients with Alzheimer's

Disease. *Dementia and neurocognitive disorders*. 2017 Sep;16(3):72-7. PubMed PMID: 30906374. PMCID: 6427985.

93. Ahram M, Petricoin EF. Proteomics Discovery of Disease Biomarkers. *Biomarker insights*. 2008 Jun 6;3:325-33. PubMed PMID: 19578516. PMCID: 2688375.

94. Ignjatovic V, Geyer PE, Palaniappan KK, Chaaban JE, Omenn GS, Baker MS, et al. Mass Spectrometry-Based Plasma Proteomics: Considerations from Sample Collection to Achieving Translational Data. *Journal of proteome research*. 2019 Dec 6;18(12):4085-97. PubMed PMID: 31573204. PMCID: 6898750.

95. Shi L, Buckley NJ, Bos I, Engelborghs S, Sleegers K, Frisoni GB, et al. Plasma Proteomic Biomarkers Relating to Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis Based on Our Own Studies. *Front Aging Neurosci*. 2021;13:712545. PubMed PMID: 34366831. PMCID: 8335587.

96. Hansson O, Edelmayer RM, Boxer AL, Carrillo MC, Mielke MM, Rabinovici GD, et al. The Alzheimer's Association appropriate use recommendations for blood biomarkers in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2022 Jul 31. PubMed PMID: 35908251.

97. Vermunt L, Sikkes SAM, van den Hout A, Handels R, Bos I, van der Flier WM, et al. Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. *Alzheimers Dement*. 2019 Jul;15(7):888-98. PubMed PMID: 31164314. PMCID: 6646097.

98. Jack CR, Jr., Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2018 Apr;14(4):535-62. PubMed PMID: 29653606. PMCID: 5958625.

99. Hardy-Sosa A, Leon-Arcia K, Llibre-Guerra JJ, Berlanga-Acosta J, Baez SC, Guillen-Nieto G, et al. Diagnostic Accuracy of Blood-Based Biomarker Panels: A Systematic Review. *Front Aging Neurosci*. 2022;14:683689. PubMed PMID: 35360215. PMCID: 8963375.

100. Baird AL, Westwood S, Lovestone S. Blood-Based Proteomic Biomarkers of Alzheimer's Disease Pathology. *Frontiers in neurology*. 2015;6:236. PubMed PMID: 26635716. PMCID: 4644785.
101. Ray S, Britschgi M, Herbert C, Takeda-Uchimura Y, Boxer A, Blennow K, et al. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nature medicine*. 2007 Nov;13(11):1359-62. PubMed PMID: 17934472.
102. Zetterberg H, Burnham SC. Blood-based molecular biomarkers for Alzheimer's disease. *Molecular brain*. 2019 Mar 28;12(1):26. PubMed PMID: 30922367. PMCID: 6437931.
103. Pichet Binette A, Palmqvist S, Bali D, Farrar G, Buckley CJ, Wolk DA, et al. Combining plasma phospho-tau and accessible measures to evaluate progression to Alzheimer's dementia in mild cognitive impairment patients. *Alzheimers Res Ther*. 2022 Mar 29;14(1):46. PubMed PMID: 35351181. PMCID: 8966264.
104. Cullen NC, Leuzy A, Janelidze S, Palmqvist S, Svenningsson AL, Stomrud E, et al. Plasma biomarkers of Alzheimer's disease improve prediction of cognitive decline in cognitively unimpaired elderly populations. *Nature communications*. 2021 Jun 11;12(1):3555. PubMed PMID: 34117234. PMCID: 8196018.
105. Raudvere U, Kolberg L, Kuzmin I, Arak T, Adler P, Peterson H, et al. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic acids research*. 2019 Jul 2;47(W1):W191-W8. PubMed PMID: 31066453. PMCID: 6602461.
106. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research*. 2019 Jan 8;47(D1):D607-D13. PubMed PMID: 30476243. PMCID: 6323986.
107. Doncheva NT, Morris JH, Gorodkin J, Jensen LJ. Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data. *Journal of proteome research*. 2019 Feb 1;18(2):623-32. PubMed PMID: 30450911. PMCID: 6800166.

108. Fu R, Shen Q, Xu P, Luo JJ, Tang Y. Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. *Mol Neurobiol*. 2014 Jun;49(3):1422-34. PubMed PMID: 24395130. PMCID: 4012154.
109. Woodburn SC, Bollinger JL, Wohleb ES. The semantics of microglia activation: neuroinflammation, homeostasis, and stress. *J Neuroinflammation*. 2021 Nov 6;18(1):258. PubMed PMID: 34742308. PMCID: 8571840.
110. Stalder M, Deller T, Staufenbiel M, Jucker M. 3D-Reconstruction of microglia and amyloid in APP23 transgenic mice: no evidence of intracellular amyloid. *Neurobiol Aging*. 2001 May-Jun;22(3):427-34. PubMed PMID: 11378249.
111. Paresce DM, Chung H, Maxfield FR. Slow degradation of aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein by microglial cells. *The Journal of biological chemistry*. 1997 Nov 14;272(46):29390-7. PubMed PMID: 9361021.
112. Dheen ST, Kaur C, Ling EA. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Current medicinal chemistry*. 2007;14(11):1189-97. PubMed PMID: 17504139.
113. Kaindl AM, Degos V, Peineau S, Gouadon E, Chhor V, Loron G, et al. Activation of microglial N-methyl-D-aspartate receptors triggers inflammation and neuronal cell death in the developing and mature brain. *Ann Neurol*. 2012 Oct;72(4):536-49. PubMed PMID: 23109148.
114. Kaushal V, Schlichter LC. Mechanisms of microglia-mediated neurotoxicity in a new model of the stroke penumbra. *J Neurosci*. 2008 Feb 27;28(9):2221-30. PubMed PMID: 18305255. PMCID: 6671848.
115. Taylor DL, Jones F, Kubota ES, Pocock JM. Stimulation of microglial metabotropic glutamate receptor mGlu2 triggers tumor necrosis factor alpha-induced neurotoxicity in concert with microglial-derived Fas ligand. *J Neurosci*. 2005 Mar 16;25(11):2952-64. PubMed PMID: 15772355. PMCID: 6725132.
116. Feng W, Zhang Y, Wang Z, Xu H, Wu T, Marshall C, et al. Microglia prevent beta-amyloid plaque formation in the early stage of an Alzheimer's disease



mouse model with suppression of glymphatic clearance. *Alzheimers Res Ther.* 2020 Oct 2;12(1):125. PubMed PMID: 33008458. PMCID: 7532614.

117. Unger JW. Glial reaction in aging and Alzheimer's disease. *Microscopy research and technique.* 1998 Oct 1;43(1):24-8. PubMed PMID: 9829455.

118. Gong CX, Liu F, Iqbal K. Multifactorial Hypothesis and Multi-Targets for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2018;64(s1):S107-S17. PubMed PMID: 29562523.

119. Yankova G, Bogomyakova O, Tulupov A. The glymphatic system and meningeal lymphatics of the brain: new understanding of brain clearance. *Reviews in the neurosciences.* 2021 Nov 25;32(7):693-705. PubMed PMID: 33618444.

120. Lai KSP, Liu CS, Rau A, Lanctot KL, Kohler CA, Pakosh M, et al. Peripheral inflammatory markers in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of 175 studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2017 Oct;88(10):876-82. PubMed PMID: 28794151.

121. Savage MJ, Iqbal M, Loh T, Trusko SP, Scott R, Siman R. Cathepsin G: localization in human cerebral cortex and generation of amyloidogenic fragments from the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience.* 1994 Jun;60(3):607-19. PubMed PMID: 7936190.

122. Kanashiro A, Hiroki CH, da Fonseca DM, Birbrair A, Ferreira RG, Bassi GS, et al. The role of neutrophils in neuro-immune modulation. *Pharmacological research.* 2020 Jan;151:104580. PubMed PMID: 31786317. PMCID: 7023896.

123. Bawa KK, Krance SH, Herrmann N, Cogo-Moreira H, Ouk M, Yu D, et al. A peripheral neutrophil-related inflammatory factor predicts a decline in executive function in mild Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 2020 Mar 14;17(1):84. PubMed PMID: 32171317. PMCID: 7071641.

124. Smyth LCD, Murray HC, Hill M, van Leeuwen E, Hight B, Magon NJ, et al. Neutrophil-vascular interactions drive myeloperoxidase accumulation in the brain in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica communications.* 2022 Mar 24;10(1):38. PubMed PMID: 35331340. PMCID: 8944147.

125. Heurich M, Focking M, Mongan D, Cagney G, Cotter DR. Dysregulation of complement and coagulation pathways: emerging mechanisms in the development of psychosis. *Mol Psychiatry*. 2022 Jan;27(1):127-40. PubMed PMID: 34226666. PMCID: 8256396.
126. Berkowitz S, Chapman J, Dori A, Gofrit SG, Maggio N, Shavit-Stein E. Complement and Coagulation System Crosstalk in Synaptic and Neural Conduction in the Central and Peripheral Nervous Systems. *Biomedicines*. 2021 Dec 20;9(12). PubMed PMID: 34944766. PMCID: 8698364.
127. Aiyaz M, Lupton MK, Proitsi P, Powell JF, Lovestone S. Complement activation as a biomarker for Alzheimer's disease. *Immunobiology*. 2012 Feb;217(2):204-15. PubMed PMID: 21856034.
128. Tenner AJ, Stevens B, Woodruff TM. New tricks for an ancient system: Physiological and pathological roles of complement in the CNS. *Molecular immunology*. 2018 Oct;102:3-13. PubMed PMID: 29958698. PMCID: 6478444.
129. Shinjyo N, Kagaya W, Pekna M. Interaction Between the Complement System and Infectious Agents - A Potential Mechanistic Link to Neurodegeneration and Dementia. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2021;15:710390. PubMed PMID: 34408631. PMCID: 8365172.
130. Winston CN, Goetzl EJ, Schwartz JB, Elahi FM, Rissman RA. Complement protein levels in plasma astrocyte-derived exosomes are abnormal in conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease dementia. *Alzheimer's & dementia*. 2019 Dec;11:61-6. PubMed PMID: 31032394. PMCID: 6477776.
131. Evin G, Li QX. Platelets and Alzheimer's disease: Potential of APP as a biomarker. *World journal of psychiatry*. 2012 Dec 22;2(6):102-13. PubMed PMID: 24175176. PMCID: 3782192.
132. Carbone MG, Pagni G, Tagliarini C, Imbimbo BP, Pomara N. Can platelet activation result in increased plasma Abeta levels and contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Ageing Res Rev*. 2021 Nov;71:101420. PubMed PMID: 34371202.

133. Donner L, Falker K, Gremer L, Klinker S, Pagani G, Ljungberg LU, et al. Platelets contribute to amyloid-beta aggregation in cerebral vessels through integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-induced outside-in signaling and clusterin release. *Science signaling*. 2016 May 24;9(429):ra52. PubMed PMID: 27221710.
134. Shen MY, Hsiao G, Fong TH, Chen HM, Chou DS, Lin CH, et al. Amyloid beta peptide-activated signal pathways in human platelets. *European journal of pharmacology*. 2008 Jul 7;588(2-3):259-66. PubMed PMID: 18511035.
135. Ou GY, Lin WW, Zhao WJ. Neuregulins in Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci*. 2021;13:662474. PubMed PMID: 33897409. PMCID: 8064692.
136. Mouton-Liger F, Dumurgier J, Cognat E, Hourregue C, Zetterberg H, Vanderstichele H, et al. CSF levels of the BACE1 substrate NRG1 correlate with cognition in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2020 Jul 20;12(1):88. PubMed PMID: 32690068. PMCID: 7372801.
137. Ma Y, Fan P, Zhao R, Zhang Y, Wang X, Cui W. Neuregulin-1 regulates the conversion of M1/M2 microglia phenotype via ErbB4-dependent inhibition of the NF-kappaB pathway. *Molecular biology reports*. 2022 May;49(5):3975-86. PubMed PMID: 35166983.
138. Martinez-Iglesias O, Naidoo V, Cacabelos N, Cacabelos R. Epigenetic Biomarkers as Diagnostic Tools for Neurodegenerative Disorders. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 21;23(1). PubMed PMID: 35008438. PMCID: 8745005.
139. Xu J, de Winter F, Farrokhi C, Rockenstein E, Mante M, Adame A, et al. Neuregulin 1 improves cognitive deficits and neuropathology in an Alzheimer's disease model. *Sci Rep*. 2016 Aug 25;6:31692. PubMed PMID: 27558862. PMCID: 4997345.
140. Baik TK, Kim YJ, Kang SM, Song DY, Min SS, Woo RS. Blocking the phosphatidylinositol 3-kinase pathway inhibits neuregulin-1-mediated rescue of neurotoxicity induced by A $\beta$ 1-42. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2016 Aug;68(8):1021-9. PubMed PMID: 27230708.

141. Cui W, Tao J, Wang Z, Ren M, Zhang Y, Sun Y, et al. Neuregulin1beta1 antagonizes apoptosis via ErbB4-dependent activation of PI3-kinase/Akt in APP/PS1 transgenic mice. *Neurochem Res.* 2013 Nov;38(11):2237-46. PubMed PMID: 23982319.
142. Abhinand CS, Raju R, Soumya SJ, Arya PS, Sudhakaran PR. VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. *Journal of cell communication and signaling.* 2016 Dec;10(4):347-54. PubMed PMID: 27619687. PMCID: 5143324.
143. Mahoney ER, Dumitrescu L, Moore AM, Cambronerero FE, De Jager PL, Koran MEI, et al. Brain expression of the vascular endothelial growth factor gene family in cognitive aging and alzheimer's disease. *Mol Psychiatry.* 2021 Mar;26(3):888-96. PubMed PMID: 31332262. PMCID: 6980445.
144. Trumbore CN. Shear-Induced Amyloid Formation in the Brain: I. Potential Vascular and Parenchymal Processes. *J Alzheimers Dis.* 2016 Sep 6;54(2):457-70. PubMed PMID: 27567812. PMCID: 5026135.
145. Maneshi MM, Maki B, Gnanasambandam R, Belin S, Popescu GK, Sachs F, et al. Mechanical stress activates NMDA receptors in the absence of agonists. *Sci Rep.* 2017 Jan 3;7:39610. PubMed PMID: 28045032. PMCID: 5206744.
146. Shay-Salit A, Shushy M, Wolfovitz E, Yahav H, Breviario F, Dejana E, et al. VEGF receptor 2 and the adherens junction as a mechanical transducer in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jul 9;99(14):9462-7. PubMed PMID: 12080144. PMCID: 123163.
147. Argaw AT, Asp L, Zhang J, Navrazhina K, Pham T, Mariani JN, et al. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *The Journal of clinical investigation.* 2012 Jul;122(7):2454-68. PubMed PMID: 22653056. PMCID: 3386814.
148. Rustenhoven J, Tanumihardja C, Kipnis J. Cerebrovascular Anomalies: Perspectives From Immunology and Cerebrospinal Fluid Flow. *Circulation research.* 2021 Jun 25;129(1):174-94. PubMed PMID: 34166075.

149. Rite I, Machado A, Cano J, Venero JL. Intracerebral VEGF injection highly upregulates AQP4 mRNA and protein in the perivascular space and glia limitans externa. *Neurochemistry international*. 2008 Mar-Apr;52(4-5):897-903. PubMed PMID: 18022290.
150. Alvarez JI, Katayama T, Prat A. Glial influence on the blood brain barrier. *Glia*. 2013 Dec;61(12):1939-58. PubMed PMID: 24123158. PMCID: 4068281.
151. Chen AQ, Fang Z, Chen XL, Yang S, Zhou YF, Mao L, et al. Microglia-derived TNF-alpha mediates endothelial necroptosis aggravating blood brain-barrier disruption after ischemic stroke. *Cell death & disease*. 2019 Jun 20;10(7):487. PubMed PMID: 31221990. PMCID: 6586814.
152. Cho SJ, Park MH, Han C, Yoon K, Koh YH. VEGFR2 alteration in Alzheimer's disease. *Sci Rep*. 2017 Dec 18;7(1):17713. PubMed PMID: 29255164. PMCID: 5735090.
153. Grant LK, Ftouni S, Nijagal B, De Souza DP, Tull D, McConville MJ, et al. Circadian and wake-dependent changes in human plasma polar metabolites during prolonged wakefulness: A preliminary analysis. *Sci Rep*. 2019 Mar 14;9(1):4428. PubMed PMID: 30872634. PMCID: 6418225.
154. Hablitz LM, Pla V, Giannetto M, Vinitsky HS, Staeger FF, Metcalfe T, et al. Circadian control of brain glymphatic and lymphatic fluid flow. *Nature communications*. 2020 Sep 2;11(1):4411. PubMed PMID: 32879313. PMCID: 7468152.

## 10.EKLER

### 10.1. Katılımcı Bilgi Ve Onam Formu

#### KATILIMCI BİLGİ ve 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  $\beta$  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. İsmi tamamen gizli tutulacaktır.

Bunun yanında kognitif düzeyinizi değerlendirmek açısından sizlere 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 ret edebilir 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 Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel:

Tarih ve İmza:

**Onay alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin**

**/görüşme tanığının:**

Adı Soyadı:

Görev:

Adresi:

Tel:

Tarih ve İmza:



## 10.2. Arka Kök Ganglion Nöron Kültürü

Kan plazma örneğinin merkezi sinir sisteminde yer alan hipokampal nöron kültürleri üzerindeki etkisinin, periferik sinir sisteminde yer alan AKG nöronları üzerinde nasıl izleneceğini test etmek için farklı oranlardaki plazma örnekleri yaşam vasatlarına eklenmiştir. Deneye ait metot aşağıda sırasıyla gerçekleştirilmiştir.

### 10.2.1. Deney hayvanı

Tez çalışması kapsamında yapılan deneylerde 6-8 haftalık Balb/c farelerden izole edilen arka kök ganglion (AKG) hücreleri kullanılmıştır.

### 10.2.2. Vasatların hazırlanması

Vasatlar, kültürün hemen öncesinde hazırlanmış olup vasat içerikleri aşağıda belirtildiği gibidir.

- **Diseksiyon vasatı;** RPMI içerisine %1 Antibiyotik ve %1 GlutaMAX eklenerek hazırlanmıştır. Diseksiyon aşamasına kadar 4°C'de bekletilmiştir.
- **Kültür vasatı ;** Neurobasal-A içerisine %1 Antibiyotik, %1 GlutaMAX, %2 B27. Kullanım süresine kadar 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda bekletilmiştir.
- **Yaşam vasatı;** Neurobasal-A içerisine %1 Antibiyotik, %1 GlutaMAX, %2 B27 ve %5 Horse Serum eklenerek hazırlanmıştır. Hücrelerin ekim aşamasına kadar 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda bekletilmiştir.

### 10.2.3. Kültür petri kaplarının kaplanması

Standart 35mm cam tabanlı petri kapları, steril ddH<sub>2</sub>O içerisinde 1:10 oranında seyreltilmiş poly-D-lisin solüsyonu ile kaplanmıştır. Kaplanan petrilerden (2 saat) poly-D-lisin solüsyonu aspire edilerek steril ddH<sub>2</sub>O ile (2 kez) iyice yıkanmıştır. Ardından %1 laminin ile kaplanmış (37°C'de 12 saat) ve sonrasında laminin aspire edilerek steril ddH<sub>2</sub>O ile (2 kez) iyice yıkanmıştır. Petri kapları kabin içerisinde kurumaya bırakılmıştır.

#### **10.2.4. Arka kök ganglion diseksiyonu**

6-8 haftalık Balb/c fareler CO<sup>2</sup> inhalasyon yoluyla sakrifiye edilmiştir. Farelerin steril şartlarda AKG diseksiyonu gerçekleştirilmesi için tüm diseksiyon aletleri ve fare %70 EtOH ile yıkanmıştır. Farenin sırt derisi açılarak disekte edilen kostalar soğuk tabla üzerindeki diseksiyon vasatı içerisine aktarılmıştır. Diseksiyon vasatı içerisindeki eritrositlerin uzaklaştırılmasını takiben Carl Zeiss stereo mikroskobu altında kostaların omurga ile birleştiği alanda bulunan AKG'ler uygun yöntem ile ayrıştırılmıştır.

#### **10.2.5. Arka kök ganglion hücrelerinin elde edilmesi**

Arka kök ganglion hücreleri, %1 Tip I kolajenaz bulunan kültür vasatı içerisinde 40 dakika boyunca %5 CO<sup>2</sup>'li ortamda 37 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Enzim solüsyonunun uzaklaştırılmasını takiben 1 ml HBSS ile 3 kez iyice yıkanmıştır. Sonrasında içerisinde 1mg/ml Tripsin-EDTA bulunan 1 ml kültür vasatı içerisinde 15 dakika boyunca %5 CO<sup>2</sup>'li ortamda 37 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Süre sonunda içerisine %1 DNaz eklenerek önce 1000 µl pipet ucu sonra ise 200 µl pipet ucu ile doku homojenize olana dek tritürasyon işlemine tabi tutulmuştur. Son olarak solüsyon insülin iğnesinden 2 kez geçirilerek mekanik olarak ayrıştırılma işlemi tamamlanmıştır. Ardından hücreler tekrar %1 DNaz eklenerek 30 dakika boyunca %5 CO<sup>2</sup>'li ortamda 37 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Süre sonunda 1000 rpm de 3 dk santrifüj edilerek hücreler dibe toplanmıştır. Süpernatant atılarak hücre peleti üzerine %10 FBS, %7 Tripsin inhibitörü içeren kültür vasatı eklenmiştir. Kültür vasatı içerisinde 3 seviyeli (% 60, %35 ve %10) Percoll gradient katmanları oluşturulmuştur ve enzim solüsyonu içerisinde bulunan hücreler dikkatlice en üst gradient katmanının üzerine bırakılarak 1700 rpm de 20 dk santrifüj edilmiştir. %35'lik Percoll katmanında bulunan hücreler toplanarak 3ml kültür vasatı içerisine alınmış ve 1000 rpm de 3 dk santrifüj edilerek hücreler dibe toplanmıştır. Süpernatant atılarak hücre peleti üzerine yaşam vasatı eklenmiştir. Hücre sayımı sonrasında her petride yaklaşık 1500-2000 hücre olacak şekilde ekim gerçekleştirilmiştir. Hücreler yapıştıktan sonra (~ 2 saat) 1 ml olacak şekilde yaşam vasatı ile tamamlanmıştır.

### **10.3. Plazmanın Arka Kök Ganglion Kültürü zerindeki Etkisi**

Plazma rneklerinin hipokampal nöronlar üzerindeki etkisinin tanımlanması sonrasında aynı plazma örneklerinin periferel AKG nöron kültürün üzerindeki etkisini görebilmek için AKG nöron ekimini takip eden 5. gün itibari ile taze hazırlanan yaşam vasatı içerisine %1, %5 ve %10 oranında plazma eklenmiştir. Takip eden her  günde bir mevcut yaşam vasatının yarısı taze hazırlanan yaşam vasatı ile değiştirilmiştir. Süreç Carl Zeiss Invert Mikroskop ile 7. güne kadar takip edilmiştir.



## 11. ETİK KURUL ONAYI



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

Sayı : E-38828770-772.02-2818  
Konu: Etik Kurulu Kararı

12/05/2022

Sayın NAGİHAN MANTAR

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 20.06.2018 tarihli 39 karar no ile onay verilen "Nörotoksik  $\beta$ -Amiloid Protein Birikimi ve Glimfatik Döngü Arasındaki İlişkinin Araştırılması" isimli çalışmanız için aşağıda verilen değişiklikler uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

- Yukarıda ismi belirtilen araştırma açık adı yerine "Alzheimer hastalığında uykuun beyin lenfatik drenaj sistemi üzerindeki etkisinin plazma proteom profili ve nörotoksosite açısından araştırılması" olarak değiştirilmesi isteği.

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 3B327D2EX7 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

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

Ayrıntılı Bilgi İçin: Bilge KAYA  
Tel: ~~5050 12 34567890~~



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

Sayı : E-10840098-772.02-2828  
Konu: Etik Kurulu Kararı

12/05/2022

**Sayın NAGİHAN MANTAR**

Üniversitemizin Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 27.06.2018 tarihli 351 karar no ile onay verilen "Nörotoksik  $\beta$ -Amiloid Protein Birikimi ve Glimfatik Döngü Arasındaki İlişkinin Araştırılması" isimli çalışmanız için aşağıda verilen değişiklikler uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

- Yukarıda ismi belirtilen araştırma açık adı yerine "Alzheimer Hastalığında Uykunun Beyin Lenfatik Drenaj Sistemi Üzerindeki Etkisinin Plazma Proteom Profili ve Nörotoksosite Açısından Araştırılması" 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 3D24359AXE kodu ile doğrulayabilirsiniz.

Medipol Üniversitesi Kavacak Yerleşkesi (Ana Yerleşke Raktörlük)  
Kavacak Mah. Ekinçiler Cad. No: 19, Kavacak Kavşağı, 34810 Beykoz, İstanbul  
T: 444 85 44 F: 0212 531 75 55  
E-Posta: [bilesi@medipol.edu.tr](mailto:bilesi@medipol.edu.tr) İnternet Adresi: [www.medipol.edu.tr](http://www.medipol.edu.tr)  
Kop Adresi: [medipoluniversitesi@hs03.kep.tr](mailto:medipoluniversitesi@hs03.kep.tr)

Ayrıntılı Bilgi İçin: Bilge KAYA  
Tel: [00902125317555](tel:00902125317555)





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

E-İmzalıdır

Sayı : 10840098-604.01.01-E.23856  
Konu : Etik Kurulu Kararı

05/07/2018

**Sayın Nagihan MANTAR**

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Nörotoksik  $\beta$ -Amiloid Protein Birikimi Ve Glimfatik Döngü Arasındaki İlişkinin Araştırılması” isimli başvurunuz incelenmiş olup etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Ek:  
-Karar Formu (2 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi OZBEK tarafından 05.07.2018 tarihinde e-imzalanmıştır.  
Evrağımızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden B7FFDEE9X8 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacak Mah. Ekinciler Cad. No.19 Kavacak Kavşağı - Beykoz  
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44

İnternet: [www.medipol.edu.tr](http://www.medipol.edu.tr)  
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto:bilgi@medipol.edu.tr)

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR  
ETİK KURULU KARAR FORMU

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Nörotoksik $\beta$ -Amiloid Protein Birikimi Ve Glimfatik Döngü Arasındaki İlişkinin Araştırılması			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Nagihan MANTAR			
	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"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ**  
**GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR**  
**ETİK KURULU KARAR FORMU**

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ PLANI				Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU		19.06.2018		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
Karar Bilgileri	<b>Karar No: 351</b>	<b>Tarih: 27/06/2018</b>				
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.					

**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

BAŞKANIN UNVANI/ ADI/ SOYADI Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlgili		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 ÖLÇAY	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.17480  
Konu : Etik Kurulu Kararı

20/06/2018

**Sayın Nagihan MANTAR**

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğumuz “Nörotoksik  $\beta$ -Amiloid Protein Birikimi Ve Glimfatik Döngü Arasındaki İlişkinin 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-İmzalanmıştır.  
Evrakınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden BA5964CDX1 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

**İstanbul Medipol Üniversitesi**

Kavacak Mah. Ekinciler Cad.No:19 Kavacak Kavşağı 34810  
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44  
İnternet: [www.medipol.edu.tr](http://www.medipol.edu.tr)  
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto:bilgi@medipol.edu.tr)



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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
20/06/2018	39		Nagihan MANTAR

"Nörotoksik  $\beta$ -Amiloid Protein Birikimi Ve Glimfatik Döngü Arasındaki İlişkinin 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. Hanevi 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	