T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA ICV-STZ İLE İNDÜKLENEN SPORADİK ALZHEİMER-BENZERİ HASTALIKTA ÇİNKO DURUMUNUN SPASYAL BELLEK, HİPOKAMPAL SİNAPTİK PLASTİSİTE VE İNSÜLİN SİNYALİ ÜZERİNE ETKİSİ

Saltuk Buğra BALTACI

DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ

KONYA-2021

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA ICV-STZ İLE İNDÜKLENEN SPORADİK ALZHEİMER-BENZERİ HASTALIKTA ÇİNKO DURUMUNUN SPASYAL BELLEK, HİPOKAMPAL SİNAPTİK PLASTİSİTE VE İNSÜLİN SİNYALİ ÜZERİNE ETKİSİ

Saltuk Buğra BALTACI

DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 19102046 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2021

ÖNSÖZ

Beyin insülin direnci, metallostasis ve bellek ilişkisini araştırdığım bu tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle bana her zaman destek olan danışmanım Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ'a; tez izleme komitemde yer alan Prof. Dr. Ahmet AYAR'a ve Doç. Dr. Haluk GÜMÜŞ'e; savunma jürimde yer alan Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR ve Prof. Dr. Mustafa AYYILDIZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitimim boyunca bana her zaman yardım eden değerli çalışma arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Elif GÜLBAHÇE MUTLU'ya ve Arş. Gör. Ömer ÜNAL'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımda bana büyük yardımları olan Doç. Dr. İbrahim Halil YILDIRIM'A, Dr. Ali Azzawri'ye ve Arş. Gör. Dr. Gözde ACAR'a; deneyler sırasında karşılaştığım problemlerin çözümünde tecrübeleriyle bana yol gösteren Doç. Dr. Gökhan GÖRGİŞEN'e, Dr. Öğr. Üyesi Suray PEHLİVANOĞLU'na ve Feyza KOSTAK'a; laboratuvar imkanlarından faydalanmama izin veren Prof. Dr. Bünyamin TRAŞ'a ve Arş. Gör. Tuğba PARLAK'a sonsuz teşekkür ederim.

Her şeyden öte, çalışmalarıma daha fazla zaman ayırabilmemi sağlayarak dolaylı olarak bilime büyük katkılar veren ablam Dr. Öğr. Üyesi Umay Bilge BALTACI'ya tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR vi
ÖZET vii
SUMMARY viii
1. GİRİŞ 1
1.1. Alzheimer Hastalığı 2
1.1.1. Amiloid Kaskad Hipotezi 4
1.1.2. Alzheimer ve Tau 6
1.1.3. Beyin İnsülin Direnci 6
1.2. Çinko 8
1.2.1. Çinko Eksikliği ve Çinko Takviyesi 9
1.2.2. Çinko Regülasyonu 10
1.2.3. Merkezi Sinir Sisteminde Çinko 11
1.2.4. Çinko ve Alzheimer 12
1.3. İnsulin, İnsulin Reseptörü ve Alzheimer 14
1.4. GLUT4, Çinko ve Alzheimer 15
1.5. Glikojen sentaz kinaz-3β, Çinko ve Alzheimer 16
1.6. Sirtuin1 ve Alzheimer 18
1.7. PSD95 ve Alzheimer 19
1.8. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör, Çinko ve Alzheimer 19
2. GEREÇ VE YÖNTEM 21
2.1. Hayvan Materyali ve Gruplar 21
2.2. Davranış Testleri 22
2.2.1. Morris Su Tankı Deneyleri I. Aşama 22
2.2.2.Morris Su Tankı Deneyleri II. Aşama 23
2.3. Uygulama ve Operasyonlar 23
2.3.1. STZ Çözeltisinin Hazırlanması 24
2.3.2. Stereotaksik İşlem ve ICV STZ Enjeksiyonu 24
2.3.3. Beyin Dokusunun Çıkartılması 26
2.4. Biyokimyasal İşlemler 26

2.4.1. Serum Çinko Tayinleri 26
2.4.2.Hipokampus Dokusundan RNA İzolasyonu 27
2.4.3.Western Blot Analizi 32
2.5. İstatistiksel analizler 34
3. BULGULAR 35
3.1. Serum Çinko Sonuçları.....35
3.2. Davranış Testlerinin Sonuçları.....35
3.2.1. 1. Davranış Testleri.....35
3.2.2. 2. Davranış Testleri.....36
3.3. Real-Time qPCR Sonuçları 37
3.3.1. IR Gen Ekspresyonu.....38
3.3.2. ZnT3 Gen Ekspresyonu.....38
3.3.3. SIRT1 Gen Ekspresyonu 39
3.3.4. GLUT4 Gen Ekspresyonu.....39
3.3.5. PSD95 Gen Ekspresyonu 40
3.3.6. BDNF Gen Ekspresyonu.....40
3.3.7. OST Gen Ekspresyonu 41
3.3.8. Nogo-A Faktör Gen Ekspresyonu 41
3.3.9. miR-30a Gen Ekspresyonu.....42
3.4 Western Blot Sonuçları 42
3.4.1. PSD95 Protein Ekspresyonu 42
3.4.2. SIRT1 Protein Ekspresyonu 43
3.4.3. p-GSK3β ve Total GSKβ Protein Ekspresyonu 45
3.4.4. GLUT4 Protein Ekspresyonu.....46
4.TARTIŞMA.....47
4.1. Davranış Testlerinin Tartışılması 47
4.2. PCR Bulgularının Tartışılması.....48
4.2.1. IR Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması.....48
4.2.2. PSD95 Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması 48
4.2.3. GLUT4 Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması.....49

4.2.4. ZnT3 Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması.....50
4.2.5. SIRT1 Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması 50
4.2.6. BDNF Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması. 51
4.2.7. miR-30 Gen Ekspresyon Bulguları 51
4.2.8. Osteokalsin Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması.....52
4.2.9. Nogo-A Faktör Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması 52
4.3. Western Blot Bulgularının Tartışılması.....53
4.3.1. PSD95 Protein Ekspresyon Bulgularının Tartışılması 53
4.3.2.GLUT4 Protein Ekspresyon Bulgularının Tartışılması 54
4.3.3. SIRT1 Protein Ekspresyon Bulgularının Tartışılması 54
4.3.4. p-GSK3β Protein Ekspresyon Bulgularının Tartışılması 55
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....57
6. KAYNAKLAR.....59
7. EKLER.....71
EK-A: Etik Kurulu Onayı 71
EK-B: Turnitin Raporu 72
8. ÖZGEÇMİŞ.....74

SİMGELER VE KISALTMALAR

AH: Alzheimer hastalığı

APP: Amiloid prekürsör protein

Aβ: Amiloid-β

BDNF: Beyin-kaynaklı nörotrofik faktör

BSA: Sığır serum albumin

GSK3β: Glikojen sentaz kinaz-3β

icv: İntraserebroventriküler

IDE: İnsülin degrade edici enzim

IR: İnsülin reseptörü

LTD: Long-term depression

LTP: Long-term potentiation

miR: microRNA

NFT: Nörofibriler yumak

OST: Osteokalsin

PSD: Postsinaptik densite

PVDF: Polivinilidin diflorür

SIRT1: Sirtuin 1

STZ: Streptozotosin

T2D: Tip 2 diyabet

TBS: Tris-buffered saline

yBOS: Yapay beyin omurilik sıvısı

ZIP: Zrt-, Irt-benzeri protein

Zn: Çinko

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sıçanlarda icv-STZ ile İndüklenen Sporadik Alzheimer-benzeri Hastalıkta Çinko Durumunun Spasyal Bellek, Hipokampal Sinaptik Plastisite ve İnsülin Sinyalleşmesi Üzerine Etkisi

Saltuk Buğra BALTACI

Fizyoloji (Tıp) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA–2021

Alzheimer hastalığı (AH), özellikle sporadik formu (sAH), çok faktörlü bir doğaya sahiptir. İnsüline dirençli beyin durumu ve bozulmuş çinko homeostazı, hastalığın açıklığa kavuşturulmayı bekleyen iki önemli yönüdür. Bu çalışmada, sıçanlarda intraserebroventriküler streptozotosin (icv-STZ) ile indüklenen sAH'de diyette çinko eksikliği ve takviyesinin bellek, hipokampal sinaptik plastisite ve insülin sinyali üzerindeki etkileri araştırıldı. Bilateral icv-STZ enjeksiyonu ile Alzheimer-benzeri kognitif bozukluklar indüklenen sıçanlarda bellek performansı Morris su labirenti ile değerlendirildi. Hipokampüste sinaptik plastisite ve insülin sinyal yolu ile ilgili hedef protein ve mRNA seviyelerinin ekspresyonu western blot ve gerçek zamanlı PCR ile değerlendirildi. icv-STZ enjeksiyonu yapılmış sıçanlarda çinko takviyesi ile tamamen düzeltilebilen belirgin bellek bozuklukları bulduk. Western blot analizleri, icv-STZ enjeksiyonunun hipokampal PSD95, SIRT1 ve p-GSK3β'yı önemli ölçüde azalttığını ve çinko takviyesinin normal protein seviyelerini geri kazandırdığını ortaya koydu. Hipokampal BDNF, PSD95, SIRT1, GLUT4, insülin reseptörü, ZnT3 ve osteokalsin mRNA seviyeleri icv-STZ enjeksiyonu ile azaldı ve çinko takviyesi ile normal değerlere döndü. Nogo-A faktör gen ekspresyonu, icv-STZ enjeksiyonu ile arttı ve bu artış çinko eksikliği ile şiddetlendi. Çinko takviyesi Nogo-A faktöründeki artışı hafifletti. Hipokampüste microRNA-30 (miR-30) seviyesi icv-STZ enjeksiyonu ile azaldı. Çinko eksikliği miR-30 seviyesinde daha ileri bir azalmaya neden oldu. Çinko takviyesi miR-30 seviyesini kontrol değerlerinin üzerine çıkardı. Elde ettiğimiz veriler çinko takviyesinin icv-STZ ile indüklenen Alzheimer-benzeri kognitif bozuklukları iyileştirdiğini ve hipokampüste sinaptik plastisite ve insülin sinyal yolunun temel hedeflerindeki düşüşün önüne geçtiğini göstermektedir. Ayrıca, çinko eksikliği patolojinin bazı yönlerinin kötüleşmesine neden oldu. Son olarak, çinko takviyesi, beyindeki osteokalsin eksprese eden hücreleri aktive ederek beynin intrinsik koruyucu mekanizmalarını upregüle etti.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, beyin insülin direnci, çinko, sinaptik plastisite, spasyal bellek

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

The Role of Zinc Status on Spatial Memory, Hippocampal Synaptic Plasticity, and Insulin Signaling in icv-STZ-induced Sporadic Alzheimer's-like Disease in Rats

Saltuk Buğra BALTACI

Department of Physiology

PhD THESIS / KONYA-2021

Alzheimer's disease (AD), especially its sporadic form (sAD), is of multifactorial nature. Insulin-resistant brain state and disrupted zinc homeostasis are two key aspects of the disease that remain to be elucidated. Here we investigated the effects of dietary zinc deficiency and supplementation on memory, hippocampal synaptic plasticity, and insulin signaling in intracerebroventricular streptozotocin (icv-STZ)-induced sAD in rats. Alzheimer's-like cognitive impairment was induced in rats by bilateral injection of icv-STZ, and memory performance was evaluated by Morris water maze. Expression of target protein and mRNA levels related to synaptic plasticity and insulin signaling pathway in the hippocampus was assessed by western blot and Real-Time qPCR. We found prominent memory impairments in rats that received icv-STZ, which were fully recovered by zinc supplementation. Western blot analysis revealed that icv-STZ treatment significantly reduced hippocampal PSD95, SIRT1, p-GSK3β, and zinc supplementation restored the normal protein levels. mRNA levels of BDNF, PSD95, SIRT1, GLUT4, insulin receptor, ZnT3, and osteocalcin were found to be reduced by icv-STZ and reestablished by zinc supplementation. Gene expression of Nogo-A factor increased with icv-STZ injection and zinc deficiency exacerbated it. Zinc supplementation ameliorated the increase in Nogo-A factor. microRNA-30 (miR-30) level in the hippocampus decreased with icv-STZ injection. Zinc deficiency caused a further reduction in miR-30 level. Zinc supplemetation increased miR-30 levels above control values. Our data suggest that zinc supplementation improves cognitive deficits and rescues the decline in key molecular targets of synaptic plasticity and insulin signaling in hippocampus caused by icv-STZ induced sAD in rats. In addition, zinc deficiency worsened some aspects of the pathology. Finally, zinc supplementation upregulated the intrinsic protective mechanisms of the brain by means of activating osteocalcin-expressing cells in the brain.

Key words: alzheimer's disease, brain insulin resistance, spatial memory, synaptic plasticity, zinc

1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH) multifaktöriyel doğaya sahip nörodejeneratif bir hastalıktır. 20 yıldan uzun süredir amiloid kaskad hipotezi AH'nin patogenezinin ve terapötik girişimlerinin merkezinde yer almıştır (Hardy ve Higgins 1992). Ancak, bu terapötik girişimlerin tamamı, geliştirilen ilaçların bir kısmı beklenen hedeflere etki etmesine rağmen klinik olarak bir fayda sağlamamış, aksine bazı durumlarda tablonun ağırlaşmasına neden olmuştur (Panza ve ark 2019). Bu nedenle, AH patogenezini açıklamak için yeni hedeflerin belirlenmesi gerekmektedir. AH'nin kompleks doğasına, genetik, çevresel, vasküler, inflamatuar ve metabolik faktörler katkı sağlamaktadır (Heppner ve ark 2015, Arnold ve ark 2018). Son zamanlarda öne çıkan ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde ümit veren faktörlerden ikisi, Alzheimer hastalarında sıklıkla görülen beyin insülin direnci (Talbot ve ark 2012) ve bozulmuş beyin metal homeostazıdır (Bush 2013).

AH araştırmalarında bugüne kadar klinik anlamda bir ilerleme sağlanamamasının sebeplerinden biri uygun bir deneysel modelin olmayışıdır. Sıklıkla kullanılan transgenik hayvan modelleri esasında hasta popülasyonunun sadece küçük bir kısmını hedef almaktadır. Ayrıca, transgenik hayvan modellerinde patogenez son derece hızlandırılmıştır ve patogenezin bazı kilit parçaları eksiktir (Grieb 2016). Dolayısıyla, klinikte olana daha çok benzeyen uygun bir deneysel modelin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Deney hayvanlarında diyabet indüklemek için sıklıkla kullanılan streptozotosinin intraserebroventriküler enjeksiyonunun (icv-STZ) AH benzeri kognitif ve moleküler bozukluklara yol açtığı gösterilmiştir. Transgenik hayvanların aksine, icv-STZ enjeksiyonu yapılan hayvanlarda beyin insülin mekanizmasında meydana gelen bozulmalar, daha sonra AH'nin klasik bulguları olan amiloid-β (Aβ) birikimine ve tau hiperfosforilasyonuna yol açar (Salkovic-Petrisic ve ark 2011, Salkovic-Petrisic ve ark 2013). Bu özellikleri sayesinde icv-STZ enjeksiyonu AH'nin metabolik bozukluklarının araştırılmasında yaygın olarak kullanılmıştır. Ancak, icv-STZ modelinin beyin insülin direncine nasıl yol açtığı bilinmemektedir.

AH, beynin metal işleme mekanizmalarındaki yaşa bağlı düzensizlikler ve bu metallerin Aβ ve tau ile etkileşimleri ile şekillenir (Bush 2013). Çinko (Zn), presinaptik terminale özgü bir Zn taşıyıcısı olan ZnT3 ile belirli glutamaterjik sinir terminallerinde zenginleştirilmiş bir eser elementtir (Palmiter ve ark 1996). AH'de presinaptik terminallerden serbestlenen Zn hızla insan Aβ peptitlerinin agregasyonuna yol açarak normal sinaptik fonksiyonu bozar (Mantyh ve ark 1993). Zn'nin Aβ plakları içinde tuzaklanması, TrkB reseptör transaktivasyonu (Huang ve ark 2008), pro-BDNF'in beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF)'e dönüştürülmesi (Hwang ve ark 2005, Frazzini ve ark 2018), NMDA reseptörünün inhibisyonu (Paoletti ve ark 1997) gibi Zn'nin normal fizyolojik fonksiyonlarını göstermesini engeller. Yüksek Zn konsantrasyonu GSK3β gibi kinazların aktivasyonuna yol açarak tau hiperforforilasyonuna ve toksisiteye neden olabilir (Craven ve ark 2018). Ancak, Zn aynı zamanda insülin mimetik etkilere sahiptir (Ilouz ve ark 2002). AH hastalarında serum Zn seviyeleri genellikle azalmıştır (Wang ve ark 2015). Bu nedenle, AH'de Zn homeostazının korunması, metal dishomeostazından etkilenen hastaların tedavisinde önemli olabilir.

Yukarıda sunulan bilgilerden yola çıkılarak gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışmasında, sıçanlarda icv-STZ ile indüklenen Alzheimer-benzeri hastalıkta Zn durumunun öğrenme ve bellek, hipokampal insülin sinyal yolağı ve sinaptik plastisite üzerindeki rolünü araştırdık.

1.1. Alzheimer Hastalığı

AH'nin iki ana tipi vardır: hastaların büyük kısmının 65 yaş altında olduğu ailevi veya erken başlangıçlı AH (fAH) ve hastaların çoğunlukla 65 yaş üzerinde olduğu sporadik veya geç başlangıçlı AH (sAH). fAH'de Amiloid prekürsör protein (APP), presenilin-1 ve presenilin-2 proteinlerinde görülen otozomal dominant mutasyonlar Aβ peptidlerinin üretimini veya toksik agregatlar oluşturma eğilimini artırır ve bu AH tipinin temelini oluşturur. sAH'nin gelişimi çok daha karmaşıktır belirli bir genetik mutasyondan köken almaz. Ancak, sAH'de bile genetik risk faktörlerinin etkisi çok büyüktür. sAH, genetik ve çevresel faktörler ile birlikte yaşam tarzından büyük bir şekilde etkilenir.

AH'nin başlıca iki faktörü amiloid plaklarının ve nörofibriler yumakların (NFT) oluşumudur. Amiloid plakları çoğunlukla hücre dışı ortamda biriken fibrilar yapıda Aβ agregatlarından oluşurken, NFT hücre içinde mikrotübül-ilişkili hiperfosforile tau proteininin helikal filamanentlerini içerir. NFT hastalığın seyrinde ilk olarak hipokampüs ile entorinal kortekste görünür ve büyük olasılıkla klinik bulguların ilk olarak bellekte görünmesini açıklar. Patolojinin neden bazı beyin bölgelerini hedef alırken, diğerlerini aynı şiddet ile etkilemediği hala açıklanmayı beklemektedir. fAH'de bile mutant proteinler tüm hücrelerde eksprese ediliyor olmasına rağmen, patoloji yine belirli beyin bölgelerini hedef alır. Bu nedenle etkilenen beyin bölgelerinin AH'ye karşı hassasiyetinin ne olduğunun belirlenmesi AH'nin nedeninin anlaşılması için gereklidir.

Mikroglia aktivasyonu ve astrogliosis AH beyinlerinde sıklıkla görünür ve hastalığın şiddeti ile nöroinflamasyon yakın bir ilişki içindedir (Heneka ve ark 2015). Alzheimer beyni, atrofi, ileri derecede sinaps kaybı ve genişlemiş ventrikül ile karakterizedir. Kolinerjik sistem anormallikleri AH'de görülen kognitif bozukluklara katkı sağlar. Asetilkolinesteraz inhibitörleri AH tedavisi için onaylanmış az sayıdaki ilaçtan biridir.

Alzheimer beyninde meydana gelen klasik değişimler artık iyi biliniyor ve bu değişikliklerin tespiti ile tanılar başarılı bir şekilde konabiliyor olmasına rağmen şu ana kadar denenen tedavi yöntemlerinin tamamı hayal kırıklığı ile sonuçlanmıştır (Panza ve ark 2019). Şaşırtıcı olarak, bu tedavi yöntemlerinin bazıları geliştirildikleri hedeflere karşı beklenen etkileri göstermelerine rağmen hastalığın ilerleyişini durduramamıştır. Bu nedenle hastalığın mekanizmasının, özellikle sporadik AH için, tekrar değerlendirilmesi gerekmektedir. Günümüzde sporadik AH'nin tek bir sebepten kaynaklanmayabileceği, aksine farklı nedenlerden köken alan bozuklukların daha sonra AH'nin klasik patolojisine yol açabileceği fikri üzerinde durulmaktadır (Solfrizzi ve ark 2011). Sporadik AH, genetik altyapı ile birlikte, vasküler, çevresel, beyin insülin duyarlılığı ve metabolik faktörlerden etkilenir (de la Torre 2004, Solfrizzi ve ark 2011). AH ile ilişkisi gösterilen ve hastalığın şekillenmesine katkı veren bir diğer faktör beyin metal homeostazında yaş ile birlikte meydana gelen

bozulmadır (Datki ve ark 2020). Beyin metalleri, amiloid plaklarında yoğun olarak bulunur ve plak oluşumunda da aktif rol alır (Sensi ve ark 2018). Dolayısıyla, bu faktörlerin kökeninin ve Alzheimer'ın tipik belirtileri ile ilişkisinin araştırılmasına ihtiyaç vardır.

1.1.1. Amiloid Kaskad Hipotezi

Amiloid kaskad hipotezi uzun bir süredir AH'nin merkezinde yer almıştır ve tedavi girişimlerinin büyük kısmı bu hipoteze göre geliştirilmiştir (De Strooper ve Karran 2016, Selkoe ve Hardy 2016). Belirteceğimiz üzere, bu hipotezin AH'nin temelini oluşturduğu gösteren çok sayıda kanıta rağmen, doğrululuğunun sorgulanmasına yol açan büyük tutarsızlıklar da mevcuttur. Amiloid plaklarının biyokimyasal yapısı incelenmiş ve plaklarda yüksek miktarda bulunan 40 ve 42 amino asitten oluşan 2 peptit tanımlanmıştır. 40 amino asitlik peptit Aβ40 olarak ve karboksiterminal ucunda 2 ek amino asit içeren 42 amino asitlik peptit Aβ42 olarak adlandırılmıştır. Erken dönem çalışmalarda Aβ42'nin toksik etkisinin ve agregat oluşturma eğiliminin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Daha ileri araştırmalar sayesindeyse, daha uzun ve daha kısa Aβ formlarının olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu sayede Aβ peptitlerinin bir prekürsörden oluştuğu anlaşılmış ve bu prekürsör keşfedildikten sonra, APP olarak adlandırılmıştır.

APP nöronlarda yüksek miktarda eksprese edilen büyük transmembran bir glikoproteindir. α-, β- ve γ-sekretaz enzimleri ile APP proteolitik olarak işlenir. APP'nin α-sekretaz ile proteolizi Aβ oluşumunu engeller ve ekstrasellüler bir parçanın oluşumuyla sonlanır. APP'nin β- ve γ-sekretaz tarafından işlenmesiyle Aβ peptitleri ortaya çıkar. Bir multiprotein kompleksi olan γ-sekretaz APP'yi transmembran segmentini de dahil edecek şekilde proteolize uğratır. Son ürün olarak Aβ peptitleri farklı uzunluklarda bulunur. Aβ'nın, APP'nin transmembran segmentinde bulunan amino asitleri içermesi, agregasyon oluşturma eğilimi daha yüksek toksik özelliklerin kazanılmasıyla sonuçlanır. Aβ monomerleri önce oligomerlerin, daha sonra fibriler formların ve en son amiloid plaklarının oluşumuna yol açar.

Amiloid kaskad hipotezine en büyük destek fAH'de Aβ üretimini veya agregasyonunu artıran APP, presenilin-1 ve presenilin-2 mutasyonlarının bulunmasıdır. fAH'de görülen mutasyonların büyük kısmı esasında Aβ üretimini artırmaktan öte agrege olma eğilimi daha yüksek Aβ42 ve daha uzun formlarının oluşmasına neden olur. İnsan fAH'de görülen bu mutant proteinlerin kemirgenlerde eksprese ettirildiği genetik çalışmalar amiloid kaskad hipotezine güçlü kanıtlar sağladı. Bu deney hayvanları fAH'de görülen ile aynı şekilde amiloid plakları oluşturur ve derin bellek bozuklukları sergiler. Amiloid kaskad hipotezine göre, toksik Aβ ve oluşturdukları oligomerler NFT oluşumu tetikler. sAH için en büyük risk faktörü olan apolipoprotein E ε4'ün Aβ klirensini dramatik olarak azalttığı gösterilmiştir (Yamazaki ve ark 2019). Dolayısıyla, amiloid kaskad hipotezini doğrulayan geniş bir literatür mevcuttur.

Ancak, hipotezin doğruluğunun sorgulanmasına neden olan bulgular da vardır. İlk olarak, kognitif olarak sağlıklı yaşlılarda da amiloid patolojisi yaygın olarak görünmektedir (Toledo ve ark 2015). Aynı ölçüde önemli olarak, Aβ klirensini güçlendirmeye yönelik ilaçlar, beklenen etkiyi göstererek Aβ'yı azaltmalarına rağmen klinik bir iyileşme sağlamamıştır (O'Gorman ve ark 2017). Benzer şekilde, Aβ yükü ile hastalığın şiddeti arasında bir korelasyon bulunmamaktadır, ancak tau patolojisi hastalığın şiddeti ile orantılıdır (Arriagada ve ark 1992, Bierer ve ark 1995). Ek olarak, fAH proteinlerini eksprese eden transgenik hayvan modelleri insanlardaki durumu ancak zayıf olarak taklit eder. APP ve presenilin-1 mutant fareler, amiloid plakları geliştirmelerine rağmen tau patolojisi göstermezler. Üstelik, insanlarda hastaların büyük kısmı ailevi değil sporadik forma aittir. Sonuç olarak, AH anlayışımızda ciddi eksiklikler olduğu açıktır. Örneğin; fAH'de hastalar yaşamları boyunca Aβ patolojisine sahip olmalarına rağmen, orta yaşlara kadar klinik bulgular ortaya çıkmamaktadır. Bu bulgular amiloid kaskad hipotezini geçersiz kılmıyor olsa bile, hipotezin ciddi eksiklikler içerdiğini ve alternatif açıklamaların düşünülmesi gerektiğini göstermektedir.

1.1.2. Alzheimer ve Tau

AH beyninin en belirgin diğer bulgusu olan NFT, hiperforforile tau proteinini içerir. Tau mikrotübül yapısını stabilize ederek aksonal taşınımda önemli roller üstlenir ve normal fizyolojinin önemli bir parçasıdır (Wang ve Mandelkow 2016). fAH'ye yol açan bilinen herhangi bir tau mutasyonu bulunmamaktadır, ancak tau AH'ye bağlı nörodejenerasyonun anahtar oyuncularından biridir. Tau patolojisi sadece AH'ye özgü değildir, üstelik tau mutasyonları AH'ye neden olmazken, frontotemporal demansa yol açtığı gösterilmiştir (Poorkaj ve ark 1998). Ancak, tau AH'ye bağlı nörodejenerasyon ile en ciddi korelasyon gösteren bulgudur (Bierer ve ark 1995). Tau patolojisinin Aβ tarafından başlatıldığı düşünülmektedir, ancak hastalığın erken döneminde iki patolojinin lokusu birbirinden farklıdır (Braak ve Braak 1995). NFT tüm yaşlı insanlarda bulunmaktadır (Braak ve Del Tredici 2011). Bundan yola çıkarak, Aβ ve tau patolojilerinin birbirini şiddetlendirdiği düşünülmüştür ve gerçekten de deney hayvanlarında bu hipotez doğrulanmıştır (Khan ve ark 2014).

Sonuç olarak, AH beyninin iki ana aktörü hakkında detaylı bilgiler elde edilmiş olmasına rağmen henüz terapötik ilerleme kaydedilememiştir. Terapötik girişimler ya fayda sağlamamıştır ya da istenmeyen yan etkiler ortaya çıkarmıştır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, AH'nin etiyopatogenezinde, büyük ilerlemelere rağmen, bazı parçaların eksik olduğunu düşündürmektedir.

1.1.3. Beyin İnsülin Direnci

Epidemiyolojik çalışmalar tip 2 diyabeti (T2D) AH için bir risk faktörü olarak tanımlamıştır (Chatterjee ve ark 2016). AH ve T2D arasındaki ilişkinin temelinde insülin direnci yer almaktadır (Gao ve ark 2013). İnsülin reseptörü (IR) beyinde tüm hücre tiplerinde ifade edilmektedir (Rhea ve Banks 2019). Hipokampüs IR seviyesinin yüksek olduğu beyin bölgelerinden biridir (Arnold ve ark 2018). Beyin ekstrasellüler ortamında bulunan insülin büyük ölçüde pankreastan köken alır, ancak beyinde *de novo* insülin sentezi olduğunu gösteren kanıtlar mevcuttur ve insülin mRNA'sı beyinde tespit edilmiştir (Arnold ve ark 2018). İnsülin, beyinde diğer

dokularda olduğu gibi trofik etkilere sahiptir. İnsülin, long-term potentiation (LTP) ve long-term depression (LTD) gibi sinaptik plastisite mekanizmalarında modülatör etkilere sahiptir (Huang ve ark 2010). Uzun bir süre boyunca beynin glikoz kullanımının insülinden bağımsız olduğu düşünülmüştür, ancak, günümüzde bunun doğru olmadığı anlaşılmıştır (Leloup ve ark 1996). GLUT4 en azından hipokampüs gibi bazı beyin bölgelerinde eksprese edilir (Leloup ve ark 1996). Periferde olduğu gibi, insülin, fosfatidilinozitol 3-kinaz-Akt yoluyla GLUT4'ün membrana translokasyonunu artırır (McNay ve Pearson-Leary 2020). Bu sayede insülin, enerji talebinin arttığı durumlarda bu talebin karşılanmasını sağlıyor olabilir. İntranazal insülin uygulamasının T2D hastalarında bellek performansını iyileştirdiğini gösteren çalışmalar vardır (Novak ve ark 2014). Dolayısıyla, insülin beyin fonksiyonlarıyla yakından ilişkilidir.

Epidemiyolojik verilerin aksine, T2D ve AH ilişkisi araştıran moleküler biyoloji çalışmaları, iki hastalığın birbiri ile kesin bir ilişkisini göstermekte başarısız olmuştur. T2D ve sistemik insülin direnci ile beyin amiloid birikimi ilişkisini inceleyen çalışmalar sıklıkla negatif sonuçlar vermiştir (Thambisetty ve ark 2013). T2D ve AH arasındaki bağ hala doğrulanmayı beklemektedir.

Aksine, sistemik insülin direncinden bağımsız olarak, Alzheimer hastalarında beyin insülin direncini araştıran çalışmalar çoğunlukla insülin sinyal yollarında bir baskılanma saptamıştır (Hoyer 1998, Rivera ve ark 2005, Steen ve ark 2005, Tong ve ark 2009). Postmortem Alzheimer beyin dokularında IR, IRS1, fosforile Akt ve fosforile glikojen sentaz kinaz-3β (GSK3β) seviyeleri düşük bulunmuştur (Rivera ve ark 2005, Talbot ve ark 2012). Üstelik insülin sinyal yolundaki bu baskılanma hastalığın şiddeti ile orantılıdır (Rivera ve ark 2005). Beyin IR fonksiyonunda bozulmanın Aβ ve tau patolojisine ek olarak, vaskülopatiye, nöroinflamasyona ve oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir (Salkovic-Petrisic ve ark 2011, Lee ve ark 2013). GSKβ, tau hiperfosforilasyonundan sorumlu en önemli enzimlerden biridir (Toral-Rios ve ark 2020). Yetersiz IR aktivasyonu, GSK3β'nın aşırı aktive olmasına ve tau hiperfosforilasyonuna yol açıyor olabilir (Zhang ve ark 2018, Wohua ve Weiming 2019). GSK3β'nın aşırı aktive olması ayrıca doğrudan

nörodejenerasyonu işaret eden önemli markerlar arasındadır (Jaworski ve ark 2019). AH fare modellerinde beyin insülin direnci mevcuttur (Gao ve ark 2013). Sonuç olarak, beyin insülin direnci AH ve diğer nörodejeneratif hastalıklarda yeni tedavi fırsatlarının kapılarını açabilir.

1.2. Çinko

Vücuttaki en önemli eser elementlerden biri olan Zn mikroorganizmaların, bitkilerin ve hayvanların büyümesi ve gelişmesi için vazgeçilmezdir. Zn en fazla kas ve kemiklerde olmak üzere hemen tüm doku ve organlarda bulunur (Prasad 2009). Zn prostat ve göz dokusunda özellikle de retinada diğer dokulara nispeten daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur (Ugarte ve Osborne 2014, Harchegani ve ark 2018). Yetişkin vücudundaki ortalama Zn miktarı yaklaşık 1,4–2,3 g'dır (Stefanidou ve ark 2006, Prasad 2009). Zn, tüm enzim sınıflarında bulunan ve 300'den fazla enzimin kofaktörü olan tek metaldir (Zastrow ve Pecoraro 2014). Biyolojik olarak çinko her zaman Zn^{2+} değerlik durumunda kalır ve başka bir maddeyi ne oksitleyebilir ne de indirgeyebilir. Bu nedenle, Zn'nin biyolojik açıdan redoks-inert olduğu ifadesi kullanılır (Maret 2019). Zn, metallotioninlerin ekspresyonunu indükleyerek oksidatif reaksiyonları önleyici etki gösterir (Jarosz ve ark 2017). Ayrıca Zn, glutatyon ve katalaz gibi antioksidan proteinlerin ve enzimlerin aktivasyonunu arttırır (Jarosz ve ark 2017, Lee 2018). Biyolojik olarak gerekli bir eser element olan Zn; hücre büyümesi, gelişimi, farklılaşması, homeostaz, bağ dokusu büyümesi ve bakımı, DNA sentezi, RNA transkripsiyonu, hücre bölünmesi ve hücre aktivasyonu için önemlidir (Vallee 1988, MacDonald 2000). Ayrıca yara iyileşmesi, tat keskinliği, bağışıklık sistemi, prostaglandin üretimi, kemik mineralizasyonu, tiroit hormon metabolizması, kan pıhtılaşması, fetal büyüme ve spermatogenez gibi olaylarda da kritiktir (Vallee ve Falchuk 1993, Bonaventura ve ark 2015, Kogan ve ark 2017). Zn aynı zamanda belleği güçlendirmeye ve zihinsel gelişimi iyileştirmeye yardımcı olur (Ogawa ve ark 2016, Zhang ve ark 2019).

1.2.1. Çinko Eksikliği ve Çinko Takviyesi

Zn insan beslenmesinde esansiyel elementtir. Diyetteki eksikliği günler içerisinde kendisini gösterir. Zn eksikliğinde insanlarda anoreksik belirtiler ortaya çıkarken, iştahsızlık, koku ve tat almada yetersizlik, bağışıklık fonksiyonlarının baskılanması gibi olaylarda Zn eksikliğinin semptomlarıdır (Livingstone 2015). Aslında hiçbir element eksikliği Zn kadar bağışıklık fonksiyonlarını etkilemez. Zn eksikliğinde, T hücre sayısında, sitotoksik lenfosit ve buna bağlı olarak IL-2, TNF-α ve NK hücre oluşumunda baskılanma ortaya çıkar (Maares ve Haase 2016, Gammoh ve Rink 2017).

Zn eksiklikler ayrıca gastrointestinal bozukluklar, böbrek hastalığı, bazı kanser türleri, AIDS, yaşlanma gibi birçok hastalığa eşlik eder (Odeh 1992, Mocchegiani ve ark 2013, Myers ve ark 2017, Skrajnowska ve Bobrowska-Korczak 2019, Damianaki ve ark 2020). Gebe kadınlarda Zn eksikliği fetal beyin hücrelerinin azalmasına neden olarak fetal gelişimi etkileyebilir (Brion ve ark 2021). Büyüme döneminde Zn eksikliği büyüme bozuklukları ve hipoganadizme yol açabilir (Ackland ve Michalczyk 2016). Yetişkin erkeklerde Zn eksikliği spermatogenezi bozarak kısırlığa neden olabilir (Tiscione ve ark 2017). Eksiklik durumunda Zn takviyesi yukarıda bahsedilen fizyolojik fonksiyon bozukluklarının önlenmesinde güçlü bir terapötik araçtır (Kogan ve ark 2017). İnsanlarda Zn ihtiyacı, gebelik, büyüme, fiziksel aktivite, tüketilen diyet türüne, iklim koşullarına, travma ve enfeksiyonların neden olduğu stresin varlığına göre değişir. Genel olarak, önerilen günlük Zn ihtiyacı 15-25 mg/gün düzeyindedir (Maret ve Sandstead 2006). Zn kaynağının etkinliği, kesin olarak tedavinin dozu ve süresi ile ilişkili görünmektedir. Uzun süreli tedavi veya yüksek dozlarda Zn, dokularda çinko birikimini tetikleyerek bağışıklık fonksiyonlarını bozabilir (Muhamed ve Vadstrup 2014). Yaşlılıkta Zn düzeylerinin azalması nedeniyle uzun süreli fizyolojik Zn dozlarının bağışıklık fınksiyonları için gerekli olduğu önerilmiştir (Mocchegiani ve ark 2013). Fizyolojik dozda Zn desteği, oksidatif stresi ve inflamatuar sitokinlerin oluşumunu azalttığı için, yaşlanmanın gecikmesinde bir tedavi aracı gibi düşünülmüştür (Mocchegiani ve Muzzioli 2000).

1.2.2. Çinko Regülasyonu

Çinkonun demir gibi vücutta depo edilmemesi nedeniyle diyetle günlük olarak alınması gerekir. Feçes ve üriner atılımdan kaynaklanan kayıpların karşılanması için diyetle günlük alım kritiktir. Çinko iyonlarını yüksek afinite ile taşıyan bir protein olan ZnT1'in klonlanması ve böbrek dokusunda yüksek affinitesi , çinko homeostazını anlamada büyük bir ilerleme sağlamıştır (Palmiter ve Findley 1995). Bu ilk çalışmadan bu yana çinko taşıyıcıları kodlayan 24 gen tespit edilmiştir. Bu proteinler iki gruba ayrılır: ZnT çinko taşıyıcı ailesi 10 üyeden oluşur ve hücre içi sitoplazmik çinkoyu hücre içi kompartımanlara ve ekstrasellüler alana taşır. Zrt-, Irt-benzeri protein (ZIP) taşıyıcı ailesi, 14 üyeden oluşur ekstrasellüler alandan ve hücre içi kompartmanlardan sitoplazmaya çinko taşınmasında sorumludur (Liuzzi ve ark 2001). ZnT proteinlerini kodlayan genler SLC30A (1-10) olarak adlandırılırken, ZIP proteinlerini kodlayanlar SLC39A (1-14) olarak adlandırılmaktadır. ZnT proteinleri altı transmembran segmente sahiptir. ZIP proteinleri ise sekiz transmembran segmente sahiptir (Guerinot 2000). ZnT taşıyıcıları, hücre içi çinko konsantrasyonunu azaltabilirken, ZIP taşıyıcıları çinkonun sitoplazmaya aktif taşınmasını düzenlemektedir. ZnT proteinleri çinko selektifken, bazı ZIP taşıyıcıları kadmiyum, kobalt veya manganaz taşınımında da rol almaktadır (Guerinot 2000).

Sindirim sisteminden emildikten sonra, çinko kanda tüm dokulara taşınır. Konsantrasyonunun yaklaşık olarak ulaşabileceği sınır beyin dahil 200 mM seviyesindedir. Çinkonun çoğunluğunun hücre içi sekestrasyona tabi tutulduğu, hücre dışı düzeylerin nanomolar aralıkta olduğu tahmin edilmektedir (Kay 2003, Frederickson ve ark 2006). Bununla birlikte, fizyolojik olarak birçok sinaptik işlemi düzenleyebilen çinkonun, nörotransmisyon sırasındaki konsantrasyonunun mikromolar aralığa yükselebildiği sinapslarda aktif olarak salınabildiğini not etmek önemlidir (Assaf ve Chung 1984). Diğer organlarda olduğu gibi, beyinde çinko aktif taşıyıcılar tarafından düşük seviyelerde tutulur, böylece seviyeleri sıkı ve tutarlı bir şekilde düzenlenir.

1.2.3. Merkezi Sinir Sisteminde Çinko

Yaşamın her aşamasında gerekli olan çinko, merkezi sinir sistemi gelişiminde önemli bir rol oynar. Çinko amigdala, hipokampus, serebral korteks, talamus ve olfaktör kortekste en yüksek konsantrasyonlarda bulunur (Qi ve Liu 2019, Kumar ve ark 2021). Sinir sisteminde çinko, sinaptik plastisite, öğrenme, bellek ve nöronal gelişimin düzenlenmesi ile ilgilidir (Blakemore ve Trombley 2017, Sensi ve ark 2018, Neely ve ark 2019). Beyindeki çinkonun çoğu (%80-95), enzimler ve transkripsiyon faktörleri dahil olmak üzere proteinlere sıkı bir şekilde bağlıdır (Kumar ve ark 2021). Merkezi sinir sistemindeki çinkonun yaklaşık %20'si serbest formda bulunur ve serbest çinkonun çoğu glutamaterjik nöronların presinaptik veziküllerinde konsantre edilir. Bu veziküler çinko, aktiviteye bağlı bir şekilde salınır ve birçok nörotransmitter reseptörünü (örneğin AMPA, NMDA, GABA, glisin reseptörleri) ve voltaja bağlı iyon kanallarının aktivasyonunu modüle edebilir (Blakemore ve Trombley 2017). Hipokampusta, LTP'nin indüklenmesi, çinko iyonlarının konsantrasyonuna bağlıdır (Sensi ve ark 2000, Takeda ve ark 2009, Takeda 2011, Blakemore ve Trombley 2017, Sensi ve ark 2018, Neely ve ark 2019). Ayrıca, çinko takviyesi deney hayvanlarının hipokampusunda nöronal öncül hücre proliferasyonunu ve nörojenezi artırır (Cope ve ark 2016). Çinko nörobiyolojisi alanında ortaya çıkan daha ilginç fikirlerden biri, çinkonun nörotransmitter olarak davranabileceğidir (McAllister ve Dyck 2017).

Çinko nörotoksisitesi ve nörolojik bozukluklarda çinko

Çinko iyonlarının yüksek düzeyleri ve/veya çinkonun aşırı birikimi, postsinaptik nöronlarda nörotoksik hasara neden olur. Ancak çinko eksikliği de nöral fonksiyonlarda bozulmaya neden olur. Bu da merkezi sinir sisteminde çinko regülasyonunun önemini gösterir (Choi ve ark 2020).

Çinkonun nöronlar ve glia üzerindeki toksik etkilerini anlamak için, sinaptik çinko salımı, geri alım ve hücre içi tamponlama ile ilgili mekanizmaları değerlendirmek gerekir. ZnT3, beynin glutamaterjik nöronlarında sinaptik veziküllerin içinde çinkonun konsantre edilmesinden sorumlu tek mekanizmadır

(McAllister ve Dyck 2017). Çinkonun ekstraselüler alana salınmasını takiben, nöronal ve glial hücreler, çinko konsantrasyonunu dinlenme sırasında gözlenen nanomolar aralığa hızla azaltırlar. ZIP çinko taşıyıcıları (ZIP4, ZIP8) bu geri alımda anahtar rol oynamaktadır (Emmetsberger ve ark 2010).

Çinko, özellikle limbik bölgede (hipokampus, amigdala) spesifik nöronal ağlarda zenginleştirilmiştir. Epilepsi, Alzheimer, Parkinson, Huntington ve prion hastalıkları ile beyin çinko düzeyindeki değişiklikler arasında bir ilişki kurulmuştur (Prakash ve ark 2015).

1.2.4. Çinko ve Alzheimer

Çinko durumu ve Alzheimer hastalığı

AH patogenezi ile çinko dahil olmak üzere bir dizi toksik ve temel metalin bozulmuş metabolizması arasında kanıtlanmış bir ilişki vardır (González-Domínguez ve ark 2014). Deneysel Alzheimer modellerinden ve insan çalışmalarından elde edilen veriler AH'de dolaşımdaki çinko düzeylerinin azaldığını göstermektedir (Ventriglia ve ark 2015, Wang ve ark 2015, Li ve ark 2017). AH tedavisinde kullamılan asetilkolinesteraz inhibitörlerinin serum çinko düzeylerinde artışa yol açmasına rağmen (Giacconi ve ark 2019), bu artışın neokortikal çinko düzeylerinde görülmediği rapor edilmiştir (Schrag ve ark 2011). Ancak AH riski ve bilişssel fonksiyonlardaki bozulma ile diyetle çinko alımı arasında anlamlı bir ilişki olmadığı Loef ve ark (2012) tarafından rapor edilmiştir. Buna karşın bir grup yaşlı Alzheimer hastasına uygulanan çinko desteğinin bakır düzeylerini azaltarak bilişsel fonksiyonların bozulmasını önleyebileceği gösterilmiştir (Brewer ve Kaur 2013).

Alzheimer hastalığında çinko taşıyıcılar

Alzheimer hastalarında çinko kullanımında gözlenen değişikliklere çinko taşıyıcıların anormal ifadesi aracılık eder (Xu ve ark 2019). Alzheimer hastalarının otopsilerinde beyin doku örneklerindeki çinko taşıyıcı proteinlerin (ZIP1, ZnT1, ZnT4 ve ZnT6) mRNA seviyelerinin AH şiddetine paralel olarak arttığı rapor edilmiştir (Beyer ve ark 2012). Benzer bulgular transgenik fare beyinlerinde de elde

edilmiştir (Zhang ve ark 2010). Beyin omurilik sıvısında artan ZnT3 seviyesinin de AH'deki bilişsel düşüş ile ilişkili olduğu Enache ve ark. (2020) tarafından gösterilmiştir. Bununla birlikte, Alzheimer hastalarında artan tau yumak patolojisiyle ilişkili olarak azalan serebral ZnT3 seviyeleri bildirilmiştir (Whitfield ve ark 2014, Whitfield ve ark 2018). Alzheimer hastalarının hipokampusunda, ZnT3 ekspresyonunun azalmasıyla bağlantılı olarak sinaptik veziküllerde çinko seviyelerinin önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (Bjorklund ve ark 2012).

ZnT3 ve Alzheimer hastalığı

ZnT3, hipokampüs ve neokortekste glutamaterjik nöronların sinaptik veziküllerine çinkonun taşınmasını sağlar (Cole ve ark 1999). Presinaptik veziküllerden sinaptik olarak salınan çinko, nörotransmisyon ve plastisitede merkezi roller oynar. ZnT3 muhtemelen yaşlanma ile ilişkili bilişsel kayıptan korunmayı sağlamaya katkıda bulunmaktadır çünkü ZnT3 ekspresyon düzeyleri yaşlanma ile (Adlard ve ark 2010), AH'de (Adlard ve ark 2010, Bjorklund ve ark 2012) ve Parkinson hastalığında düşer (Whitfield ve ark 2014). Bu sonuçlarla uyumlu olarak, yaşlı ZnT3KO fareler öğrenme ve bellek bozuklukları sergilerler (Adlard ve ark 2010, Sindreu ve ark 2011). ZnT3KO farelerde, aynı zamanda, nörotransmisyonda önemli protein ve genlerin ekspresyonunda temel değişiklikler olduğu bildirilmiştir (Adlard ve ark 2010, Nakashima ve ark 2011). ZnT3 tarafından sinaptik veziküllerde biriktirilen çinkonun, hipokampüs bağımlı öğrenme sırasındaki presinaptik Erk1/2 sinyalleşmesi için temel bir rol oynadığı gösterilmiştir (Sindreu ve ark 2011). Ek olarak, nörotransmiterlerin reseptörlerinin çinko bağlayıcı alanları mutasyona uğratılmış farelerle yapılan çalışmalarda, ZnT3 tarafından taşınan sinaptik çinkonun önem taşıdığı gösterilmiştir (Nozaki ve ark 2011). Sinaptik çinko, yaşlanma bağımlı bir biçimde, amiloid birikimine katkıda bulunuyor olabilir (Lee ve ark 2002). Bu yüzden, ZnT3 tarafından sinaptik veziküllere çinkonun uygun aktarılamaması, AH'nin başlangıcının önlenmesinde kritik rol oynuyor olabilir.

1.3. İnsulin, İnsulin Reseptörü ve Alzheimer

Daha önce beyin, insülinden bağımsız bir organ olarak kabul edilirken, yayınlanan raporlarla bazı beyin bölgelerinde insülin ve insülin reseptörlerinin varlığı kanıtlanmıştır (Zhao ve ark 2004). Duarte ve ark. (2012) sıçan beyninin akson, sinaps ve dendritlerinde preproinsülin-I ve mRNA'larının varlığını bildirmiştir. Bu da nöronlarda insülin sentezinin olduğunu gösterir. Ayrıca beyindeki nöromodülatör, nörotrofik ve nöroprotektif eylemler, insülin tarafından düzenlenerek bellek ve bilişsel fonksiyonlar iyileştirilmektedir (Salcedo ve ark 2012). Bununla ilişkili olarak insülin sinyal yolağının moleküllerindeki düzensizliklerin Alzheimer patogenezinde rol oynadığı önerilmiştir (Aleman ve Torres-Alemán 2009).

İnsanlarda ve hayvan AH modellerinden elde edilen veriler bilişsel bozulma ve Alzheimer patolojisinin faktörlerinden biri olarak "insüline dirençli beyin durumu" olarak adlandırılan düzensiz beyin insülin sinyalini ortaya çıkarmıştır (Talbot ve ark 2012).

AH azalmış insülin duyarlılığı ve düzensiz IRS-1/PI3K sinyali ile karakterizedir (Talbot ve ark 2012). PI3K/Akt'nin azalmış aktivasyonu, AH'nin iki ana patolojik özelliği olan artmış tau fosforilasyonu ve Aβ plaklarının birikmesinden sorumlu olan GSK-3β'nin artan aktivasyonuna yol açar (Baki ve ark 2004). PI3K/ Akt'nin fosforilasyon/aktivasyonu ve GSK-3β'nın fosforilasyon/inaktivasyonu ise AH'nin patolojik özelliklerini iyileştirir (Griffin ve ark 2005). Bir çalışmada, beyin insülin direncinin; nöroinflamasyon, oksidatif stres, Aβ toksisitesi ve nörofibriler yumak oluşumunu desteklediği bildirilmiştir (M de la Monte 2012). Alzheimer patolojisinde, nöroinflamasyon ve oksidatif stres ile insülin direnci arasında güçlü bir bağlantı vardır (Verdile ve ark 2015). İnsülin, Aβ peptidin hücre dışına sekresyonuna ve insülin degrade edici enzim (IDE) ekspresyonunun artırılmasına neden olur. IDE eksikliğinin, Aβ birikiminden ve hiperinsülinemiden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Farris ve ark 2003). IDE, insülinin yanı sıra, Aβ'nın yıkılımından da sorumludur. Ayrıca, artan beyin insülininin, Alzheimer patolojisine katkıda bulunan Aβ klirensini önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (Shiiki ve ark 2004). İnsülin hem Aβ hem de

tau metabolizmasını kontrol eder (Biessels ve Kappelle 2005). İnsülin disfonksiyonu ve insülin eksikliği tau hiperfosforilasyonu ile sonuçlanır (Grünblatt ve ark 2007). Farelerde, streptozotosin ile pankreatik β hücrelerinin yıkımı ve insülin salgısının azalmasının, AH'nin başlıca ayırt edici özelliği olan tau patolojisiyle sonuçlandığı rapor edilmiştir (Clodfelder-Miller ve ark 2006).

İnsülin reseptörleri büyük ölçüde serebral korteks ile hipokampus çekirdeklerinde ve bir dereceye kadar olfaktör bulbus ve hipotalamusta bulunur (MARKS ve ark 1990). İnsülin, IGF-1 ve IGF-2, hücre farklılaşması, büyüme regülasyonu ve metabolik aktiviteler gibi hücresel hayatta kalma mekanizmalarında daha fazla rol oynayan IR'yi aktive eder. İnsülin reseptörlerinin aracılık ettiği düzensiz glikoz metabolizmasının, AH'nin en erken bulgularından biridir ve ilk klinik bulgu ortaya çıkmadan onlarca yıl önce tespit edilebilir (Mosconi ve ark 2006). Aβ, IR'ye bağlanmak için insülin ile rekabet eder. Bu rekabet, insülinin IR'ye afinitesini azaltır ve dolayısıyla insülin direnci ile sonuçlanır. Bu durum, AH patolojisini daha da ağırlaştırır (Xie ve ark 2002).

1.4. GLUT4, Çinko ve Alzheimer

Periferde, insülinin birincil rolü, gerektiğinde hücrelere artan glikoz girişine izin vermek için hücre yüzeyine hareket eden GLUT4 aracılığıyla glikozu kandan uzaklaştırmaktır. GLUT4, hipokampusta yoğun şekilde eksprese edilir (El Messari ve ark 2002). Hipokampal bilişsel süreçlerin glikoz kullanımıyla sınırlı olduğu gerçeğiyle birlikte ele alındığında (McNay ve Gold 2001), hipokampusa glikoz verilmesi hipokampal metabolizmada bir artışa neden olur ve bu da gelişmiş bellek peformansı ile bağlantılıdır (Newman ve ark 2011, Pearson-Leary ve McNay 2012, Gold ve ark 2013). İnsülin hipokampal metabolizmayı akut olarak artırır (McNay ve ark 2010). Burada kesin olan bir şey vardır ki; insülin tarafından bilişsel güçlendirme ve bellek fonksiyonları için glikoz sağlanmasının temel aracısı olarak GLUT4 translokasyonunun gerektiğidir (Leloup ve ark 2006).

GLUT4'ün senteziyle ilgili düzenleyicilerin çoğu, bellek süreçlerinde yer alır, bu da GLUT4'ün doğrudan belleğe katkıda bulunabileceğini düşündürür. Aktif

olmadığında, GLUT4, veziküllerinde sitozol içinde tutulur. GLUT4'ün depolama veziküllerinden hücre yüzeyine translokasyonu, insülin ve östrojen, norepinefrin ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) dahil olmak üzere hipokampal öğrenme ve bellek süreçlerinde yer alan birkaç moleküle yanıt olarak meydana gelir (Kishi ve ark 1996, Barros ve ark 2006). Bu translokasyon aynı zamanda protein kinaz C-zeta, histon asetilleyici proteinler, protein kinaz A ve CaMKII tarafından düzenlenir ve bunların tümü bellek fonksiyonları ile yakından ilişkilidir (Barros ve ark 2006, Suwa ve ark 2010, Dehvari ve ark 2012, Ojuka ve ark 2012). Önemli olarak, depolama vezikülleri yalnızca GLUT4'ü değil, aynı zamanda ek molekülleri örneğin, Ras-GTPaz aktive edici benzeri protein (IQGAP1), insülinle düzenlenen aminopeptidaz (IRAP) ve insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü-2 IGF2R'yi içerir (Keller 2004). Bu moleküller artık iyi anlaşılmış bellek regülatörleridir (Schrick ve ark 2007, Jedrychowski ve ark 2010, Chen ve ark 2011, Gao ve ark 2011). Sonuç olarak merkezi sinir sisteminde eksprese edilen ve hipokampüste sinaps oluşumuna katkıda bulunan GLUT4, öğrenme ve hafıza oluşumu sırasında, nöronal membranlara taşınır ve fosfatidilinositol 3 kinaz-Akt sinyal yolu ile sinapsların yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü korumak için nöronlara bir glikoz kaynağı sağlar (Zhao ve ark 2021).

1.5. Glikojen sentaz kinaz-3β, Çinko ve Alzheimer

Glikojen sentaz kinaz-3 (GSK3), nörodejenerasyonda da yer alan birçok anahtar hücre biyolojisi yolunun düzenlenmesinde yer alan yapısal olarak aktif bir serin-treonin kinazdır (Leroy ve Brion 1999). GSK-3 başlangıçta glikojen sentazın aktivitesini negatif olarak düzenleyen bir enzim olarak tanımlandı (Leroy ve ark 2002). GSK-3'ün büyüme ve gelişme, onkogenez ve apoptozun düzenlenmesinde yer alan çeşitli sinyal yollarında yer aldığı bilinmektedir (Leroy ve ark 2002). GSK3'ün GSKα ve GSKβ olmak üzere amino asit sekansı %85 ortak ancak farklı fonksiyonlara sahip iki izoformu bulunur (Woodgett 1990). Merkezi sinir sisteminde, GSK3-β daha yüksek seviyede bulunur ve ekspresyon düzeylerinin yaşla birlikte arttığı bilinmektedir (Lee ve ark 2006). Kalori kısıtlaması ile yaşlanma ile ilişkili bu artışın önüne geçilebildiği rapor edilmiştir (Martin ve ark 2016). İnsülin sinyal yolunun da dahil olduğu bir dizi kinaz GSK3β'yı serin 9 üzerinden fosforile eder ve

enzimin inhibisyonunu sağlar. İlginç olarak, GSK3β'nın LTP sırasında da inhibe olduğu ve bellek konsolidasyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir (Peineau ve ark 2007, Asok ve ark 2018). Aksine, LTD sırasında enzim aktivitesi artar. Ancak, LTD'nin fizyolojik sınırların dışına çıkması önce sinapsların kaybına ve daha sonra apoptoza yol açar (Mango ve ark 2019). GSK3β aşırı aktivasyonu nörodejenerasyonla ilişkilidir (Bradley ve ark 2012, Jaworski ve ark 2019). GSK3β, Alzheimer hastalarının beyninde hiperaktif olarak bulunur ve farklı mekanizmalar yoluyla Alzheimer patologenezindeki olaylara karışır (Leroy ve ark 2000). Transgenik fare çalışmaları, Aβ'nın, GSK3β'nın serin 9 üzerindeki fosforilasyonunu önleyerek enzimin aktivasyonuna yol açtığını göstermiştir (Hooper ve ark 2008). GSK3β taunun hiperfosforilasyonundan sorumlu başlıca kinazlar arasındadır. Aβ ve tau patolojisi ile birlikte, insülin sinyal yolundaki baskılanma GSK3β aktivasyonunun şiddetlenmesine yol açarak nörodejenerasyonu hızlandırır (Leroy ve ark 2007, Deng ve ark 2014). icv-STZ enjeksiyonunda da benzer bir durum rapor edilmiştir (Xu ve ark 2014). Bu özellikleri nedeniyle GSK3β, beyin insülin direnci ile AH arasındaki köprü olabilir. Fizyolojik GSK3β fosforilasyonunu sağlayacak girişimler AH'nin de dahil olduğu nörolojik hastalıkların merkezi tedavi hedeflerinden biridir.

Çinko takviyesinin çeşitli patolojik tablolar altında GSK3β inhibisyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Chanoit ve ark (2008) çinko takviyesi ile reperfüzyon hasarı sonrası GSK3β aktivasyonunun arttığını gösterdi. Ilouz ve ark (2002) HEK293 hücrelerinde çinko takviyesi ile enzimin inhibe olduğunu ve fare adipositlerinde 3 kat glikoz artışı gerçekleştiğini bildirmiştir. Yazarlar, çinkonun insülin mimetik etkisinin doğrudan GSK3β inhibisyonu ile gerçekleştiğini ileri sürmüştür. Iitsuka ve ark (2013) STZ ile diyabet indüklenmiş rat tibiasında çinko takviyesi ile GSK3β'nın inhibe olduğunu ve kemik dokusunda koruyucu etki gösterdiğini rapor etmiştir. Sun ve ark (2014) Akt2 geninin silindiği farelerde çinkonun GSK3β inhibisyonuna yol açtığını ve kardiyak disfonksiyonu iyileştirdiğini göstermiştir. Bu çalışmanın ilginç yanı, çinko takviyesinin Akt yolundan bağımsız olarak da GSK3β'yı etkileyebildiğini göstermesidir. Wu ve ark (2016) miyoblast hücrelerinde çinkonun glikoz kullanımını arttırdığını ve bu etkinin Akt, GSK3β ve GLUT4 aracılığıyla gerçekleştiğini bildirmiştir. Sonuç olarak, çinkonun farklı koşullar altında insülin mimetik etki

gösterdiğini ve bu etkinin birden fazla mekanizma ile ortaya çıktığını gösteren geniş bir literatür mevcuttur. GSK3β, beyin insülin direncinin AH'yi tetiklemesinde önemli bir aktör olarak tanımlanmıştır ve bu enzimin inhibisyonunu sağlayacak terapötik girişimlere ihtiyaç vardır.

1.6. Sirtuin1 ve Alzheimer

Sirtuin 1 (SIRT1), sirtuin ailesinin bir üyesidir ve enerji homeostazı, gelişim, hücre sağ kalımı ve yaşam süresini içeren hücre içi düzenleyici bir protein olarak görev yapar (Nogueiras ve ark 2012). SIRT1 nöral hücrelerde bazı kritik fonksiyonlarla ilişkilendirilmiştir. Bunlar, mitokondri fonksiyonunu koruma ve DNA hasarına verilen yanıtları modüle etme yeteneğini içerir (Chuang ve ark 2019). SIRT1 ayrıca PPARγ ve PGC-1α ile fonksiyonel olarak etkileşime girerek ve mitokondri biyogenezinde kritik bir rol üstlenir (Tang 2016). Sirtuin protein ailesi içerisinde ilk tanımlanan ve en çok çalışılan protein SIRT1'dir (Tang 2016). Hayvan modellerinde yaşlanma ve uzun yaşama dahil olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark 2020). SIRT1, çekirdekte ve sitoplazmada tespit edilir ve nükleer ve sitozolik proteinlerle etkileşime girer (Nogueiras ve ark 2012). Beyin dokusunda yaygın bir şekilde ifade edilir ve başlıca prefrontal korteks, hipokampus, bazal ganglionlar, serebellum, hipotalamus gibi nörodejeneratif süreçlerle ilgili alanlarda bulunur (Lattanzio ve ark 2014, Lattanzio ve ark 2016). Alzheimer hastalarının beyin otopsilerinde gerçekleştirilen analizlerde SIRT1 düzeylerinin azalması ile AH'nin süresi ve tau birikimi arasında güçlü bir ilişki kurulmuştur. Aynı çalışmada SIRT1 kaybının Alzheimer hastalarının nörodejenerasyonuna eşlik ettiği de gösterilmiştir (Julien ve ark 2009). Sonuç olarak araştırmacılar SIRT1 aktivitesindeki bir azalmanın sinir hücreleri üzerinde zararlı etkilere sahip olabileceğinden, Alzheimer hastalarının beyninde Sirtuin proteinlerinin aktivitesini arttırmayı amaçlayan terapötik stratejilerin daha fazla araştırma yapmayı gerektirdiği sonucuna varmışlardır (Julien ve ark 2009). SIRT1 Alzheimer'da Aβ agregasyonunu önleyerek Aβ üretimi ile amiloid plak oluşumunu azaltmaktadır. Aynı zamanda SIRT1, tau ile etkileşime girerek deasitilasyon yolu ile tau oluşumunu azaltmaktadır. Bu etkilerin yanı sıra SIRT1 nöroinflamasonu azaltarak ve mitokondriyal disfonksiyonu önleyerek

Alzheimer hastalığında bir tedavi unsuru olarak görülmektedir (Rizzi ve Roriz-Cruz 2018).

1.7. PSD95 ve Alzheimer

PSD95, postsinaptik densite (PSD) en bol bulunan yapısal proteinlerden biridir ve glutamat reseptörleri, regülatör sinyal proteinleri, adhezyon molekülleri, ve diğer yapısal proteinlerin postsinaptik sonlanmalarda organize olduğu bir mikroalan sağlar (van Zundert ve ark 2004, Elias ve Nicoll 2007). PSD95, AMPA ve NMDA tipi glutamat reseptörlerinin PSD'de sabit olarak tutulmasından sorumludur. Bazal koşullarda altında SynGAP adı verilen bir Ras/Rap GTPaz-aktive edici protein AMPA reseptörlerinin bağlanabileceği alanları kısıtlar (Herring ve Nicoll 2016). Sinaptik aktivite ile SynGAP'te meydana gelen değişiklikler, PSD95'e afinitesinin azalmasına yol açar ve AMPA reseptörlerinin PSD'de birikebileceği alanlar açar (Araki ve ark 2015). PSD95 öğrenme süreçleriyle birlikte upregüle olur ve sinapsların hem yapısal hem de fonksiyonel özelliklerinin korunmasından sorumludur (Bosch ve Hayashi 2012, Bosch ve ark 2014). PSD95'in azalması sıklıkla nörodejenerasyon ile ilişkilidir. AH'de PSD95'in azaldığı rapor edilmiştir (Whitfield ve ark 2014, Xu ve ark 2014). Yakın zamanda, PSD95'in sinapsları Aβ toksisitesinden koruduğu gösterilmiştir. Aksine, PSD95 seviyesi azalmış nöronların AH patolojisinden daha fazla etkilenir (Dore ve ark 2021). Bu nedenle, AH'de PSD95 seviyesini artırabilecek girişimler hastalığı hafifletebilecek potansiyele sahiptir. Sinapslarda çinkonun uzaklaştırılması, PSD95, glutamat reseptörleri ve Homer1 gibi proteinlerin kaybıyla postsinaptik densitenin parçalanmasına yol açarken, çinkonun varlığı sinaps oluşumu ve sinaptik bütünlüğün korunması için gereklidir (Grabrucker ve ark 2011).

1.8. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör, Çinko ve Alzheimer

BDNF en yoğun araştırılan nörotrofindir ve tüm nörotrofinler arasında sinapslar üzerindeki güçlü etkileri ve plastisite ile ilişkisi ile ön planda bulunur (Harward ve ark 2016). BDNF sentezi ve serbestlenmesi, nöral aktivite ye bağımlı olarak düzenlenmesi ile diğer nörotrofinlerden ayrılır (Panja ve Bramham

2014). BDNF, öğrenme ve belleğin hücresel mekanizmalarından hipokampal LTP'nin stabilizasyonu için gereklidir (Patterson ve ark 2001). Ayrıca, BDNF plastisite ile ilişkili sinaps-spesifik protein sentezini kontrol eden ana regülatörlerden biridir (Barco ve ark 2005).

Kanıtlar, BDNF sinyalleşmesindeki yetersizliklerin, Huntington hastalığı, AH ve depresyonun patogenezine katkıda bulunduğunu güçlü bir şekilde göstermektedir (Phillips 2017, Amidfar ve ark 2020). Bu nedenle BDNF, AH'yi de içine alan çeşitli nörolojik ve psikiyatrik bozukluklara uygulanabilir bir tedavi yaklaşımı olabilir. Zn takviyesinin, fare AH modellerinde proBDNF'yi olgun BDNF'ye dönüştüren matris metalloproteinazın aktivasyonu ile BDNF ekspresyonunun artmasına neden olduğu gösterilmiştir (Hwang ve ark 2005, Corona ve ark 2010). Olgun BDNF'in trofik etkilerinin aksine, proBDNF proapoptotik etkilere sahiptir ve çinkonun BDNF'in olgunlaşması üzerindeki etkisi bu yönüyle nöronal sağkalımı için önemlidir (Pang ve ark 2004). Çinko şelasyonu sinaptik plastisite ile ilgili proteinleri azaltarak fonksiyonel ve dendritik spine yoğunluğunu azaltarak yapısal bozukluklara yol açar, ve bu etki kısmen BDNF aracılığı ile gerçekleşir (Frazzini ve ark 2018).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen Wistar 40 adet erişkin erkek sıçan üzerinde Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Fizyoloji Laboratuarında gerçekleştirildi. Çalışma protokolü Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Etik Kurulu tarafından onaylandı (27.09.2019 tarih ve 2019-44 sayılı karar). Hayvanlar eşit sayıda (n=8) 5 gruba ayrıldı.

2.1. Hayvan Materyali ve Gruplar

Çalışma grupları şu şekilde oluşturuldu:

1. Grup: Sham1: Bu grubu oluşturan sıçanların cerrahi işlemler öncesi 1.davranış testleri gerçekleştirildi. Daha sonra bu grubu oluşturan hayvanlara ICV enjeksiyon ile iki gün arayla (5. ve 7. günlerde) STZ çözücüsü (yapay beyin omurilik sıvısı; yBOS) enjeksiyonu yapıldı. Bu grubu oluşturan sıçanlar uygulama gruplarındaki hayvanlarla eş zamanlı olarak tekrar 2. davranış testlerine tabii tutuldu.

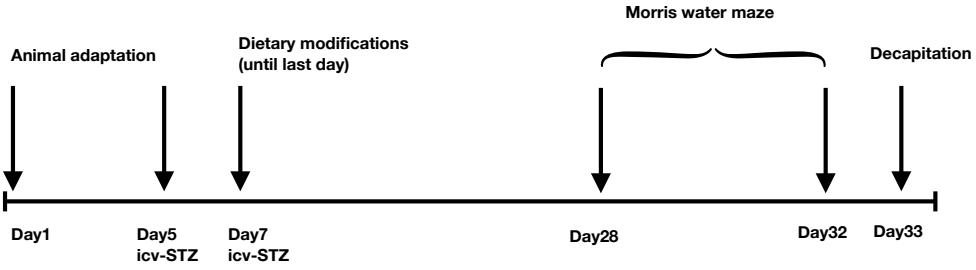
2. Grup: Sham2: Bu grubu oluşturan sıçanların cerrahi işlemler öncesi 1. davranış testleri gerçekleştirildi. Daha sonra bu grubu oluşturan hayvanlara ICV enjeksiyon ile iki gün arayla (5. ve 7. günlerde) STZ çözücüsü (yapay beyin omurilik sıvısı; yBOS) enjeksiyonu yapıldı. 7.günden sonra bu hayvanlara i.p. çinko sülfat çözücüsünün (ip serum fizyolojik) 21 gün süreyle (5 mg/kg/gün serum fizyolojik) enjeksiyonu yapıldı. Bu grubu oluşturan sıçanlar uygulamaların bitiminde 2. davranış testlerine tabii tutuldular.

3. Grup: STZ: Bu grubu oluşturan sıçanların cerrahi işlemler öncesi 1. davranış testleri gerçekleştirildi. Daha sonra bu grubu oluşturan hayvanlara ICV olarak 5. ve 7. günlerde 3 mg/kg/ STZ enjeksiyonu yapıldı. Son STZ enjeksiyonundan 21 gün sonra bu gruptaki hayvanlar 2. davranış testlerine tabii tutuldular.

4. Grup: STZ-ZnDef: Bu grubu oluşturan sıçanların cerrahi işlemler öncesi 1. davranış testleri gerçekleştirildi. Daha sonra hayvanlara ICV olarak 5. ve 7. günlerde 3 mg/kg/ STZ enjeksiyonu yapıldı. Bu grubu oluşturan hayvanlar 7. günden sonra

(21 gün boyunca) çinko eksik (28,20 mg/kg çinko) diyetle beslendiler. Diğer gruplardaki hayvanlarla eş zamanlı olarak son STZ enjeksiyonundan 21 gün sonra 2. davranış testlerine tabii tutuldular.

5. Grup: STZ-ZnSup: Bu grubu oluşturan sıçanların cerrahi işlemler öncesi 1. davranış testleri gerçekleştirildi. Daha sonra bu grubu oluşturan hayvanlara ICV olarak 5. ve 7. günlerde 3 mg/kg/ STZ enjeksiyonu yapıldı. Bu grubu oluşturan hayvanlara 7. günden sonra (21 gün boyunca) i.p. çinko çinko sülfat (5 mg/kg/gün) enjeksiyonu yapıldı. Diğer gruplardaki hayvanlarla eş zamanlı olarak son STZ enjeksiyonundan 21 gün sonra 2. davranış testlerine tabii tutuldular.



Şekil 2.1. Deney şeması

2.2. Davranış Testleri

2.2.1. Morris Su Tankı Deneyleri I. Aşama

Hayvanların uzamsal öğrenme ve hafızaları, Morris su tankı kullanılarak test edildi. Morris su tankı, 60 cm yüksekliğinde, 150 cm çapında paslanmaz çelikten yapılmış, siyah ve büyük bir dairesel havuzdur. Suyun sıcaklığı otomatik ısıtıcı sayesinde 23±1°C seviyelerinde korunabilmektedir. Su yüzeyinin 1 cm altına, çapı 8 cm olan sabit konumlu ve siyah renkli bir platform yerleştirilmiştir. Sıçan, yüzme zorluğundan kaçmak için platform üzerine tırmanabilecektir. Platformun yerini gizlemek için su, toksik olmayan siyah bir boya (Mixol konsantre boya renklendirici 20 ml No:1 Siyah) ile renklendirilmiştir.

Havuz, 4 varsayımsal çeyrek daireye bölünmüştür (kuzey, güney, doğu, batı). Veriler, havuzun merkezi üzerinde tavana sabitlenmiş video izleme sistemine bağlı bir video kamera ile elde edilmiştir. Deney hayvanlarına çalışmanın ilk 4 gününde platformun yerini bulma eğitimi verilmiştir. Hayvanlara platformu bulmaları için 60 saniye süre tanınmış, platformun yerini bulamayan hayvanlar platforma yönlendirilmiş ve 30 saniye boyunca platformda tutulmuştur. 5. günde platform kaldırılmış ve probe testi gerçekleştirilmiştir. Deneyler boyunca platformu bulma süresi, hangi kadranda ne kadar zaman geçirildiği, yüzme hızları ve toplam katedilen mesafe gibi veriler kaydedilmiştir.

2.2.2.Morris Su Tankı Deneyleri II. Aşama

Tüm gruplara yapılan operasyon ve uygulamalardan 21 gün sonra (28. Günden itibaren) daha önce anlatıldığı şekilde Morris su tankı deneyleri tekrar yapılarak ve veriler kaydedildi. Davranış testleri bittikten sonra elde edilen veriler EthoVision XT10 Image Analysis (Noldus İnformation Tech.) software programı yardımıyla analiz edilerek, istatistik analizler kısmında belirtilen testler kullanılarak kıyaslandı. Son testleri takiben hayvanlar genel anesteziyle sakrifiye edilerek kan ve beyin dokuları alındı. Alınan doku örnekleri analiz zamanına -80°C'de muhafaza edildi.

2.3. Uygulama ve Operasyonlar

Yapay Beyin Omurilik Sıvısının Hazırlanması: Hem çözücü olarak doğrudan uygulamak için hem de STZ'yi çözmek amacıyla kullanılacak olan yBOS hazırlamak için Şekil 1.'de belirtilen kimyasal bileşikler tartılarak 500 ml steril distile su içerisinde iki farklı çözelti elde edilecektir. 1 ve 2. çözelti 1:1 hacminde karıştırılarak yBOS elde edildi.

Tablo 2.1. Yapay beyin omurilik sıvısının içerdiği bileşikler ve miktarları

1. çözelti	**2 çözelti**		
Bileşik	Miktar (g)	Bileşik	Miktar (g)
NaCI	8.66	Na_2HPO_4 . $7H_2O$	214
KCI	224	NaH_2PO_4 . H_2O	27
$CaCI_2$. $2H_2O$	206		
$MgCI_2$. $6H_2O$	163		

2.3.1. STZ Çözeltisinin Hazırlanması

Hayvanlara icv yolla enjekte edilecek olan STZ, biyolojik emniyet kabininde steril şartlarda taze olarak hazırlanıp yine steril yBOS içerisinde çözdürülerek 3 mg/ kg dozuna ayarlanacaktır.

2.3.2. Stereotaksik İşlem ve ICV STZ Enjeksiyonu

Sıçanlar, ip olarak 70 mg/kg ketamin (Richter Pharma AG, Avustralya) ve 8 mg/kg xylazine (Bioveta PLC, Çek Cumhuriyeti) ile anestezi altına alındılar. Sıçanların anesteziye girip girmediklerine parmak kıstırma ve fizyolojik yanıtların izlenmesi sonunda karar verildi. Anesteziye giren sıçanların kafa derisi traş edilerek kafatası dış kulak yolundan stereotaksik cihaza yerleştirildi (Small Animal Stereotaxic System, ASI Instruments, ABD). Antiseptik solüsyonla temizlenen kafa derisine, gözler hizasından enseye kadar bir insizyon yapılarak periost sıyrıldı. Paxinos-Watson Stereotaksik Rat Beyin Atlası'na göre Bregma noktası referans alınarak (Bregmadan 0.8 mm posteriyor, sagital suturdan 1.4 mm lateral ve kafatası kemiğinden 4.8 mm vertikal) sağ ve sol lateral ventrikülün koordinatları tespit edildi. Kafatası kemiği üzerinde tespit edilen ve işaretlenen sağ ve sol lateral ventrikülün yeri duraya zarar vermeden 2 mm çaplı matkap ucu ile delinip, Hamilton enjektörü yardımıyla her iki ventriküle icv olarak 8. ve 10. günlerde STZ ve çözücü enjeksiyonları yapıldı.



Şekil 2.2. Stereotaksik yöntem ile icv-STZ enjeksiyonu

Her bir sıçan için tek seferde her ventriküle 10 µl enjeksiyon yapıldı. İnsizyon yeri dikildikten sonra % 10 povidon iyodin sürülerek hayvanlar iyileşmeleri için tekli kafeslere alındı.

STZ, toprak bakterilerinden türetilen ve ilk kez 1963'te anti-kanser ajan olarak geliştirilen glukozamin-nitrozoüre bileşiği olup deney hayvanlarında diyabeti indüklediği bulunmuştur. O zamandan beri sistemik STZ uygulaması, insüline bağımlı (Tip I) diyabetin en sık başvurulan deneysel modeli olmuştur. Kimyasal olarak kararsız bir molekül olan STZ, pankreas β hücrelerinde birikir ve toksik radikaller üretir. Sıçanlara düşük diyabetojenik dozda icv-STZ enjekte edildiğinde

beyin glukoz ve enerji metabolizmasında uzun süreli bozulmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak öğrenme ve hafıza bozukluğu ile birlikte hipokampus kolin asetil transferaz düzeylerinde azalma görülmüştür. Son zamanlarda icv-STZ modeli deneysel çalışmalarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

2.3.3. Beyin Dokusunun Çıkartılması

Genel anestezi altında hayvanlar sakrifiye edildikten hemen sonra makasla foramen magnum'u açığa çıkarmak için kafatası üzerindeki deri ve kas tabakaları ayrıldıktan sonra makasın bir ucu Foramen magnum'un içinden sokularak (sağlı ve sollu olarak) beyine dokunulmadan kafatası kemiği kesildi. Kesilen kemik bir pens yardımıyla kaldırılarak, daha sonra beyin, foramen magnum'un alt tarafından ucu künt bir pens ile sinir bağlantıları kesilerek bulunduğu yerden çıkarıldı. Beyin dokusu çıkarılır çıkarılmaz sağ ve sol hipokampus bölgesi ayrılarak, western blot ve Real-Time qPCR analizlerine kadar -80^{0}C'de muhafaza edildi.

2.4. Biyokimyasal İşlemler

2.4.1. Serum Çinko Tayinleri

Deney hayvanlarından elde edilen serum örneklerinde çinko seviyelerinin belirlenebilmesi alınan kan örnekleri santrifüj edilip serumları ayrıştırıldıktan sonra, plastik kapaklı tüpler içerisinde analiz zamanına kadar -80^{o}C'de muhafaza edildi.

Serum örnekleri, %1'lik Triton X-100 (Sigma Chemical Co: T-9284) çözeltisi ile 1/50 oranında dilue edilmek suretiyle çinko düzeylerinin tayini Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak bölümünde bulunan inductively coupled plasma emission spectrophotometry (ICP-AES; Varian Australia Pty LTD, Australia) atomik emisyon cihazında gerçekleştirildi. Sonuçlar µg/dl olarak belirlendi.

2.4.2.Hipokampus Dokusundan RNA İzolasyonu

Real-Time-PCR yöntemi ile INS, ZNT3, BDNF, PSD95, SIRT1, GLUT4 ve microRNA-30a (miR-30a), genlerinin ifadesinin belirlenmesi için öncelikle total RNA izole edildi. Bu izolasyonun gerçekleşmesi için ise hazır ticari kit (Bio Basic; Kanada) kullanıldı.

Hipokampus dokusundan 25-50 mg alındı ve 1 ml lizis buffer (miRNAExtractor) ilave edilerek buz üzerinde bir homojenizatör (SONOPULSmini20, BANDELİN; Almanya) kullanılarak parçalanması sağlandı. Homejenizasyon sonrasında, örneklerin tamamen parçalandığından emin olmak için oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildi. Tamamen parçalanmayan örnekler yeniden homojenize edildi. Ardından 30 saniye vorteksleyerek 0.2 ml (200 µl) kloroform eklendi. Bu işlemin ardından kit kılavuzunda belirtildiği gibi 4°C'de 10 dakika boyunca 12.000×g'de santrifüj edildi. Sanrtifüjleme sonunda süpernatant temiz bir 1.5 ml RNaz içermeyen santrifüj tüpüne aktarıldı, 1.5 hacimde %100 etanol ilave edildi ve birkaç kez yukarı ve aşağı pipetleyerek iyice karıştırıldı. Elde edilen çözelti kit içerisinde bulunan Spin Kolonuna aktarıldı ve 12,000 × g'de 2 dakika santrifüj edildi. Böylece nükleik asit molekülü kolana sabitlendi. Spin Kolona 0,5 ml RPE Solüsyonu eklendi, 30 saniye boyunca 12,000×g'de santrifüj edildi. Bu işlem birkaç kez tekrar edildi. Ardından yeni bir 1.5 ml santrifüj tüpüne kolon yerleştirildi. Üzerine 50 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 2 dakika süre ile bekletildi. Ardından 30 saniye boyunca 12000×g'de santrifüjlendi. Elde edilen RNA çözeltisi -20°C'de saklandı.

Elde edilen RNA'ların miktarı ve saflığını belirlemek için nanodrop (SMA 1000, Merinton, China) kullanıldı. Bu aşamada optik dansitelerinden hareketle (OD260/280) OD260/280 oranı hesaplanarak, elde edilen değerlerden 1.9 ve üzerinde olan RNA'lar çalışmada kullanıldı.

Ayrıca RNA'ların kullanılabilir olup olmadığı %1'lik agaroz jelde yürütülerek ve spesifik 18S ve 28S bantları görülerek belirlendi. Ardından cDNA sentezine geçildi ve cDNA işlemine kadar elde edilen total RNA'lar -80°C'de saklandı.

cDNA'ların Elde Edilmesi

INS, ZNT3, BDNF, PSD95, SIRT1 ve GLUT4 Genleri için cDNA Eldesi

Elde edilen total RNA içindeki mRNA'yı cDNA'ya çevirmek için hazır ticari kit (OneScript Plus, ABM; Canada) kullanıldı ve her bir örnekten eşit miktarda RNA kullanılarak protokolde belirtilen basamaklar sırası ile uygulandı (Çizelge 1). Öncelikle Çizelge 2.2.'de belirtildiği gibi RNA-Primer karışımı hazırlanarak 65°C'de 5 dakika süreyle inkübe edilerek denatüre edildi ve tüpler buz üzerine alındı.

Tablo 2.2. mRNA'dan cDNA elde etmek için uygulanan RNA-primer karışımı

Bileşim	**Miktar**
Total RNA	25ng
Random Primer	1 µl
10mM dNTP mix	1 µl
RNAse içermeyen su	2,5 µl

Ardından Çizelge 2.3.'de belirtildiği gibi cDNA sentez karışımı hazırlandı ve her bir örnek için 10 µl bu karışımdan alınıp RNA-primer karışımı üzerine ilave edildi. Her bir tüp dikkatlice karıştırıldıktan sonra Thermal Cycler (Biorad, ABD) cihazı ile revers transkripsiyon programı çalıştırıldı. Bu program öncelikle 25°C'de 10 dakika primer bağlanması, ardından 50°C'de 50 dakika cDNA sentezi ve ardından 85°C'de 5 dakika denatürasyon ve +4°C'de bekleme basamağını içermektedir.

Tablo 2.3. mRNA'dan cDNA elde etmek için uygulanan cDNA sentez karışımı

Bileşim	**Miktar**
RT buffer	4 µl
Rinhibitor	0,5 µl
OneScriptRT	1 µl

Elde edilen cDNA % 2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi ve qPCR gerçekleştirene kadar -20°C'de saklandı.

miR-30a Geni için Poli-A Kuyruğunun Eklenmesi

Elde edilen RNA'ya PoliA kuyruğu eklemek için hazır ticari kit olan Poly(A) Polymerase, Yeast (ABM; Applied Biological Materials, Kanada) kullanılmıştır. Hazırlanan mix çözeltisi Çizelge 2.4.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.4. Poli-A Kuyruğu içim mix içeriği

Bileşim	Miktar
RNA	0,2 µM
ATP(10mM)	1,25 µl
Poli(A) Polimeraz,Yeast (1U/ µl)	1 µl
5XPoli(A)Polimeraz, Yeast Reaksiyon Buffer	5 µl
25mM $MnCl_2$	2,5 µl
Nükleaz içermeyen su	25 µl'ye tamamlanır

Hazırlanan mix karışımı hazırlandıktan sonra 37°C'de 20 dakika inkübe edildi, ardından 65°C'de 20 dakika tutularak sonlandırma işlemi gerçekleştirildi. Poli-A eklenen RNA'lar kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

miR-30a Geni için cDNA Sentezi

miRNA ifadesinin belirlenmesi için cDNA sentezi miRNA cDNA sentez Kit (ABM; Applied Biological Materials, Kanada) kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir örnekten eşit miktarda Poli-A eklenmiş RNA kullanılarak protokolde belirtilen basamaklar sırası ile uygulandı. Öncelikle Çizelge 2.5.'de belirtildiği gibi RNA-Primer karışımı hazırlanarak 65°C'de 5 dakika süreyle inkübe edilerek denatüre edildi ve tüpler buz üzerine alındı.

Tablo 2.5. Poli-A+RNA ve Oligo dT Karışımı

Bileşim	Miktar
Poli-A+RNA	2 µg total RNA
miRNA oligo (dT) adaptör (10 µM)	2 µl

Ardından Çizelge 2.6.'da belirtildiği gibi cDNA sentez karışımı hazırlandı ve total hacim 20 µl olacak şekilde Poli-A+RNA ve Oligo dT karışımı ile birleştirildi.

Tablo 2.6. miR-30A Geni için cDNA sentez karışımı

Bileşim	Miktar
dNTP(s) (10mM)	1 µl
5X RT Buffer	4 µl
RNaseOFF Ribonukleaz inhibitör (40 U/ µl)	0,5 µl
OneScript RTase (200 U/µl)	1 µl
RNAse içermeyen su	1,5 µl
Toplam Hacim	20 µl

Ardından elde edilen mix 42°C'de 15 dakika inkübe edildi ve daha sonra 70°C'de 10 dakika bekletikerek buz üzrine alındı ve qPCR analizi için hazır hale getirildi.

INS, ZNT3, BDNF, PSD95, SIRT1, GLUT4 ve miR-30a Genlerinin İfade Düzeyinin Belirlenmesi

Real-Time PCR reaksiyonları hazırlanırken, standart eğrilerin çizilebilmesi amacıyla herhangi bir uygulama yapılmayan (Kontrol grubu) dokulardan elde edilen cDNA örneğinden 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ve 1/32 oranlarında seri dilüsyonlar hazırlandı. Real-Time PCR gerçekleştirilerek standart eğriler çizildi. Ayrıca primerin uygun sıcaklıkta bağlanabilmesi için sıcaklık aralıkları denenerek standardizyon yapıldı.

Hedef genlerin mRNA düzeyinde ekspresyon analizi için kullanılan primerler üretici firmada (Sentebiolab, Türkiye) sentezi yaptırılarak elde edildi. Çalışmada kullanılan primerlerden her bir reaksiyonda yaklaşık 50 ng olacak şekilde kullanıldı (Çizelge 2.7.).

Tablo 2.7. Gerçek zamanlı PCR için kullanılan primerler

Gen	Primer dizisi	Fonksiyonu
INS ileri	5’-CTGAAGGAGCTGGGTCTTTAC -3’	Hedef gen
INS geri	5’-GCCAGGTAGCAGAGTTCATTAT -3’	Hedef gen
ZNT3 ileri	5’-ACCACCTTCCTCTTCTCTATCT-3’	Hedef gen
ZNT3 geri	5’-TCCCTTACAGGCTCAAATTCC-3’	Hedef gen
BDNF ileri	5’-TGGCTCTCATACCCACTAAGA -3’	Hedef gen
BDNF geri	5’-CGGAAACAGGAACAGAAAC -3’	Hedef gen
PSD95 ileri	5’-ACGAGAGTGGTCAAGGTTAAAG -3’	Hedef gen
PSD95 geri	5’-GATGATGATGGGACGAGCATAG -3’	Hedef gen
SIRT1 ileri	5’-CATAGGTTAGGTGGCGAGTATG-3’	Hedef gen
SIRT1 geri	5’-GTTGGTGGCAACTCTGATAAATG -3’	Hedef gen
GLUT4 ileri	5’-CAGTGGTTGCTGTATTCT -3’	Hedef gen
GLUT4 geri	5’-GCTCTGTTCAATCAGTTTCTGTG -3’	Hedef gen
GAPDH ileri	5’- GGGCCAAAAGGGTCATCATC -3’′	Referans gen
GAPDH geri	5’- AACCTGGTCCTCAGTGTAGC -3’	Referans gen
miR-30a	5’- TGTAAACATCCTGGACTGGAAG-3’	Hedef gen
U6-2 Universal Primer	MPH00001 (ABM; Applied Biological Materials, Kanada)	Referans gen

PCR reaksiyonları için hazır ticari kit (FastStart Essential DNA Green Master, İsviçre) kullanıldı. Reaksiyonlar toplamda 20 µl hacimde uygulandı. Reaksiyon içeriği 10 µl Master mix karışımı (Enzim, dNTP, Mg, tampon ve su), 1 µl cDNA, 1 µl ileri ve 1 µl geri primerler (10 pmol/µl) ve 7 µl RNAse içermeyen su şeklide hazırlandı.

Primerlerin optimizasyonu sonrası PCR şartları; ilk denatürasyon, 95°C’de 10 dakika, denatürasyon 95^{o}C’de 10 saniye, bağlanma 60^{o}C’de 10 saniye ve polimerizasyon 70^{o}C’de 10 saniye olarak gerçekleştirildi ve döngü sayısı 45 olarak yapıldı. Melting curve analizi, 95°C’de 15 saniye, 60°C’de 10 saniye, 95°C’de 10 saniye olmak üzere 1 döngü şeklinde yapıldı. Tüm reaksiyonlar CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Amerika) cihazında gerçekleştirildi (Livak ve Schmittgen 2001).

2.4.3.Western Blot Analizi

Protein Ekstraksiyonu ve Protein Konsantrasyonların Belirlenmesi

Western Blot ile protein seviyelerini belirlemek üzere deney hayvanlarının hipokampüsleri hızla çıkarıldı ve sıvı nitrojen ile donduruldu. Protein ekstraksiyonu gerçekleştirilene kadar dokular -80°C'de saklandı. Lizis tamponu, RIPA tamponuna (pH 8.0, 50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, %1 NP-40, %0.5 sodyum deoksikolat, %0.1 sodyum dodesil sülfat), proteaz/fosfataz inhibitör kokteyl (#5872, Cell Signaling Technology, ABD) eklenerek hazırlandı.

Hipokampüs dokularının üzerine lizis tamponu eklendi ve sonikasyon (SONOPULS mini20, Bandelin, Almanya) yöntemi ile homojenize edildi. Homojenatlar 20 dakika boyunca kırık buz üzerinde tutuldu ve 5 dakikada bir karıştırıldı. Daha sonra homojenatlar 15,000 RPM'de, +4°C'de, 30 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar toplanarak -80°C ve -20°C'de saklanmak üzere alikotlandı.

Protein konsantrasyonunun belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanıldı. Protein izolatları, ölçüm yönteminin dinamik aralığına getirmek amacıyla 1/5 oranında dilüe edildi. Spektrofotometre küvetlerine 1 mL Bradford ayracı ve 20 µL dilüe edilmiş protein örneği eklendi. Ayraç ve örnek karıştırıldı ve 5 dakika beklendi. Daha sonra spektrofometre (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH, Almanya) ile absorbans değerleri belirlendi. Belirli konsantrasyonlarda sığır serum albumin (BSA) ile hazırlanmış standart eğrisinden faydalanarak protein konsantrasyonları tespit edildi.

SDS-PAGE ve Transfer

Örnekler elektroforez aşamasına hazırlık için, 4x Laemmli örnek tamponu (1610747, Bio-Rad, ABD) ile karıştırıldı ve 70°C'de 10 dk boyunca inkübe edildi. Daha sonra hemen buzun içine alındı. Poliakrilamid jeller hazırlandı ve her bir kuyucuğa 40 µg protein yüklendi. Tris/Glisin/SDS tamponu (1610732, Bio-Rad, ABD) içinde, protein örneklerinin ayrışması sağlandı.

Proteinlerin ayrışması gerçekleştirildikten sonra Bio-Rad Trans-Blot Turbo Transfer Sistemi ile poliakrilamid jellerden polivinilidin diflorür (PVDF) membranlara (ITM-P3031, iNtRON, Güney Kore) proteinlerin aktarılması sağlanmıştır. PVDF membranlar metanol içinde aktifleştirildi. Sonrasında membran ve filtre kağıtları (1703960, Bio-Rad, ABD) transfer tamponu (10026938, Bio-Rad, ABD) ile dengeye getirildi. 13 dk boyunca 1.3 A ve 25 V maksimal değerlerinde transfer gerçekleştirildi. Transfer sonrasında membran kısa bir süre için metanol ile tekrar aktifleştirildi.

Membranın Bloklanması ve Antikorlarlar ile İşaretleme

Transfer sonrası metanol içine alınan membran 5 dk boyunca TBS-T [20 mM Tris, 500 mM NaCl, %0.2 Tween-20 (1706531, Bio-Rad, ABD)] ile yıkandı. Takiben membran bloklama aşaması için %1 BSA içeren TBS-T ile 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Bloklama sonrası membranlar primer antikor işaretlemesi için 14 saat boyunca +4°C'de bırakıldı. Primer antikorlar bloklama için kullanılan çözelti ile dilüe edildi. Primer antikor işaretlemesi için monoklonal anti-PSD95 (1:1000 dilüsyon ile) (sc-32290, Santa Cruz, ABD), monoklonal anti-SIRT1 (1:1000) (sc-74465, Santa Cruz, ABD), monoklonal anti-GLUT4 (1:2000) (sc-53566, Santa Cruz, ABD), monoklonal anti-fosforile GSK3β (Ser9) (1:2000) (sc-373800, Santa Cruz, ABD), monoklonal anti-GSK3β (1:2000) (sc-81462, Santa Cruz, ABD) ve monoklonal anti-β-actin (1:2000) (sc-8432, Santa Cruz, ABD) antikorları kullanıldı. Primer antikor inkübasyonu sonrası membranlar 3 defa 10 dakika boyunca TBS-T ile yıkandı ve Horseradish Peroksidaz enzimine kenetli sekonder antikor işaretlemeleri için bloklama için kullanılan çözelti ile dilüe edilmiş sekonder antikorlar (1:10000) (ab98693, Abcam, BK) (31430, Invitrogen, ABD) (sc-516102, Santa Cruz, ABD) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Sekonder antikor işaretlemesi tamamlandıktan sonra membran tekrar 3 defa 10 dakika boyunca TBS-T ile yıkandı ve görüntüleme ile devam edildi. Membranlar hedef proteinlerin görüntülenmesini takiben 30 dk stripleme tamponu ile oda sıcaklığında inkübe edilerek striplendi (21059, Thermo Fisher Scientific, ABD). Daha sonra eşit yükleme ve normalize etme amacıyla, β-actin ile inkübe edildi.

Görüntünün Geliştirilmesi ve Sonuçların Elde Edilmesi

Sinyal oluşumu için Enhanced Chemiluminescence solüsyonu (1705060, Bio-Rad, ABD) ile membranlar 2 dakika boyunca inkübe edildi. ChemiDoc XRS+ sistemi (1708265, Bio-Rad, ABD) kullanılarak görüntüleme işlemi tamamlandı. Elde edilen görüntüler Image Lab 6.1 Software for Mac yazılımı (Bio-Rad, ABD) ile analiz edildi ve gruplar arası görece ekspresyon seviyeleri belirlendi.

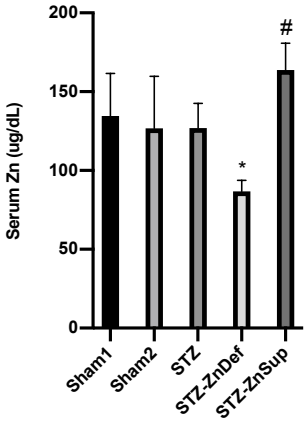
2.5. İstatistiksel analizler

Bulguların istatistiksel açıdan yorumlanması SPSS 22.0 bilgisayar paket programı ile yapılmış, bütün parametrelerin aritmetik ortalamaları ve standart hataları hesaplanmıştır. Verilerin homojenliğinin belirlenmesi amacıyla "Shapiro-Wilk" testi yapıldı ve verilerin normal dağılım gösterdiği belirlendi. Gruplar arasındaki farkın tespitinde "Tek yönlü varyans analizi (ANOVA)" testi, farklılıklarının hangi gruptan kaynaklandığının belirlenmesi için iseçoklu karşılaştırma testlerinden olan "Duncan" testi kullanıldı. $P<0,05$ düzeyindeki farklılıklar anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Serum Çinko Sonuçları

Serum örneklerinde en düşük serum çinko seviyeleri icv-STZ çinko eksik grupta (P<0,05), en yüksek serum çinko değerleri ise icv-STZ çinko takviyeli grupta elde edildi (P<0,05). icv-STZ ve sham gruplarının çinko düzeyleri birbirlerinden farklı değildi (Grafik 3.1.).

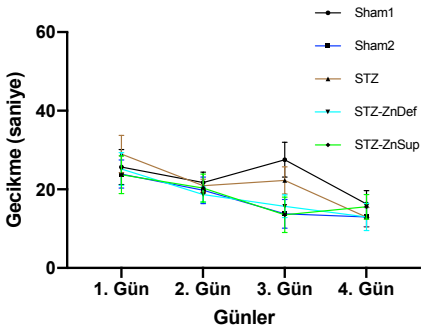


Grafik 3.1. Serum Çinko Düzeyleri.

3.2. Davranış Testlerinin Sonuçları

3.2.1. 1. Davranış Testleri

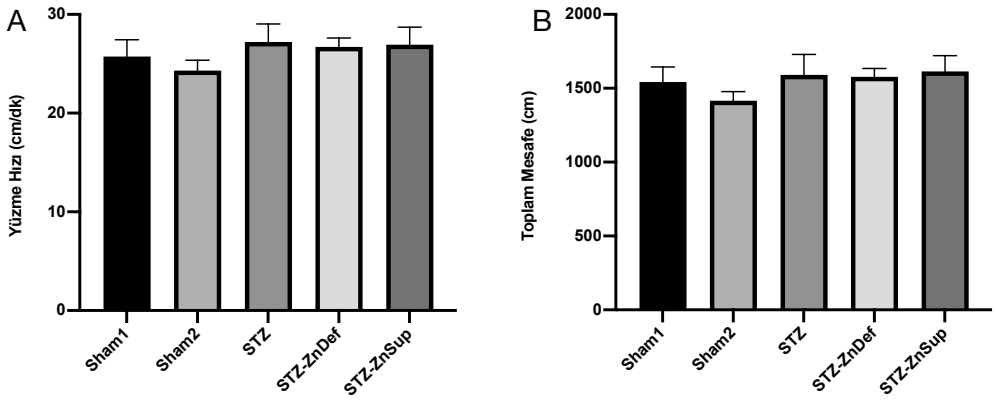
Morris su labirentinde öğrenme ve bellek testleri gruplar arasında eğitim ve probe günlerinde önemli bir farklılık göstermedi (Grafik 3.2.1.).



Grafik 3.2. Morris su labirentinde platformu bulma eğitimi.

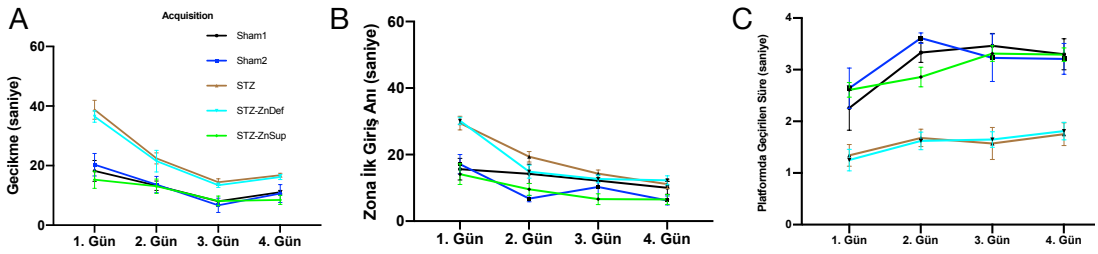
3.2.2. 2. Davranış Testleri

Morris su labirentinde deney hayvanlarının yüzme hızları ve katedilen mesafeler probe gününde gruplar arasında önemli bir farklılık göstermedi.



Grafik 3.3. Morris su labirentinde probe gününde yüzme hızları (A) ve katedilen toplam mesafe (B).

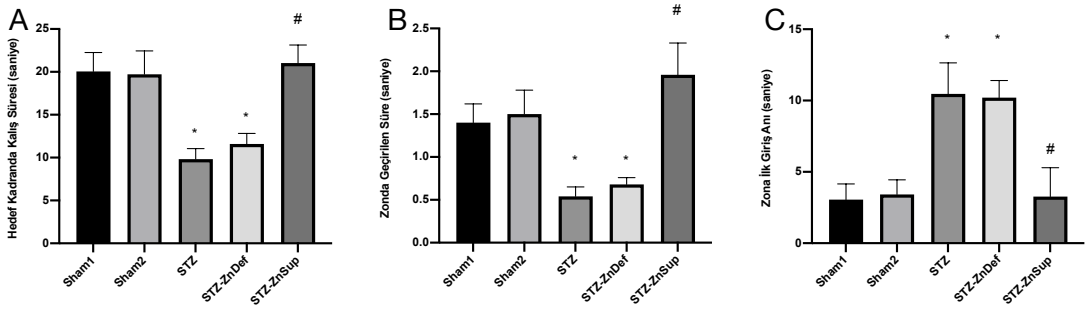
Platformu bulma eğitiminde, hem platform zonuna ilk giriş anına kadar geçen süre hem de platformu bulma gecikmesi icv-STZ enjeksiyonu ile önemli miktarda uzadı ($p<0.05$, Grafik 3.2.3.). Diyetsel çinko eksikliği sürelerde önemli bir değişikliğe yol açmazken, çinko takviyesi ile süreler normal düzeylere döndü ($p<0.05$). icv-STZ enjeksiyonu ile platformda geçirilen toplam süre önemli ölçüde azaldı ($p<0.05$). Diyetsel çinko eksikliği platformda geçirilen süreyi etkilemezken, çinko takviyesi ile süre normal düzeylere döndü ($p<0.05$). Sham1, Sham2 ve STZ-ZnSup grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı.



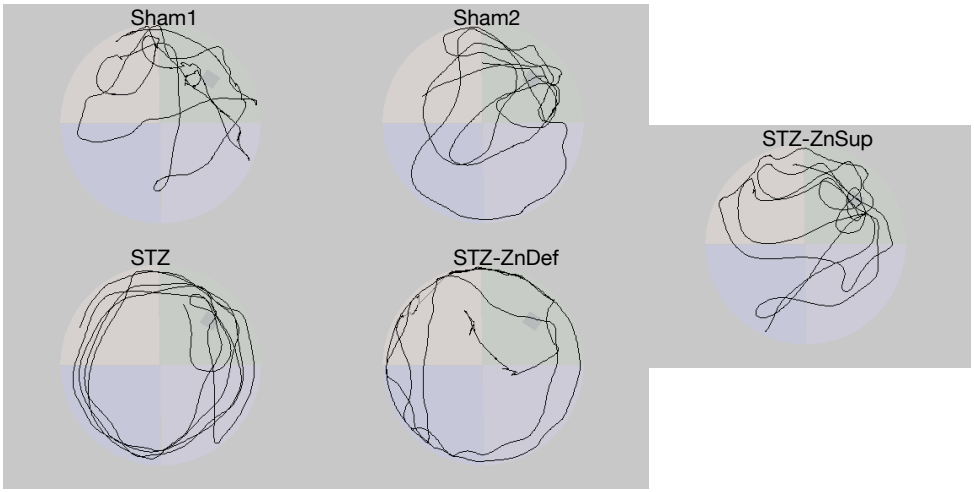
Grafik 3.4. Platformu bulma eğitiminde gecikme süresi (A), zona ilk giriş anına kadar geçen süre (B), platformda geçirilen süre (C).

Belleğin kalıcılığını belirlemek amacıyla suyun içinde gizlenen platformu kaldırıp deney hayvanlarını tekrar bellek testine tabi tuttuğumuzda, icv-STZ enjeksiyonu ile deney hayvanlarında hedef kadranda kalış süresi ve zonda geçirilen

sürenin önemli ölçüde azaldığını bulduk ($p<0.05$, Grafik 3.2.4.). Aksine, zona ilk giriş anı yönünden karşılaştırdığımızda, icv-STZ enjeksiyonu ile sürenin uzadığını bulduk ($p<0.05$). Diyetsel çinko eksikliği bu parametreleri etkilemezken, çinko takviyesi ile süreler normal değerlere döndü ($p<0.05$). Sham1, Sham2 ve STZ-ZnSup gruplarında anlamlı bir farklılık saptanmadı.



Grafik 3.5. Probe testinde hedef kadranda kalış süresi (A), zonda geçirilen süre (B), zona ilk giriş anı (C). *$p<0.05$ Sham gruplarına, #$p<0.05$ STZ ve STZ-ZnDef gruplarına kıyasla anlamlı farklılığı göstermektedir.



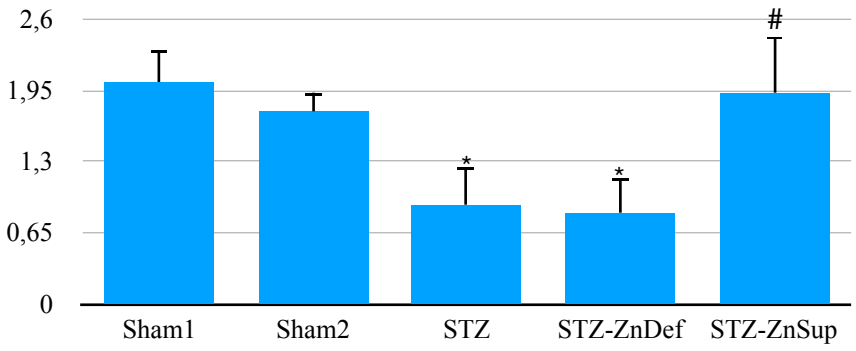
Şekil 3.1. Representatif probe testi sonuçları

3.3. Real-Time qPCR Sonuçları

Deney hayvanlarının hipokampüslerinde Real-Time qPCR yöntemi ile IR, ZnT3, PSD95, SIRT1, GLUT4, BDNF, osteokalsin (OST), Nogo-A faktör ve miR-30 gen ekspresyonu analizleri yapıldı. Hedef mRNA'ların normalizasyonu için GAPDH kontrol geni kullanıldı. MicroRNA-30'un normalizasyonu için ise U6-2 Universal Primer (Applied Biological Materials, Kanada) kullanıldı.

3.3.1. IR Gen Ekspresyonu

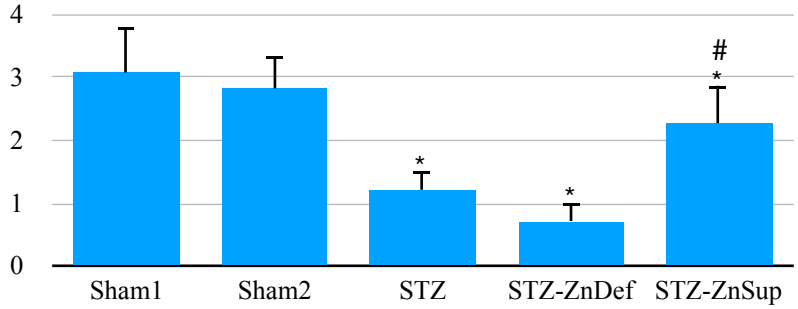
icv-STZ enjeksiyonu IR gen ekspresyonunda Sham gruplarına kıyasla anlamlı bir düşüşe neden oldu ($p<0.05$). Diyetsel çinko eksikliği gen ekspresyonunda bir değişikliğe neden olmazken, çinko takviyesi IR gen ekspresyonunu tekrar normal değerlere yükseltti ($p<0.05$, Grafik 3.3.1). Sham1, Sham2 ve STZ-ZnSup grupları arasında anlamlı bir farklılık yoktu.



Grafik 3.6. IR gen ekspresyonu kat değişimi. *p<0.05 Sham gruplarına, #p<0.05 STZ ve STZ-ZnDef gruplarına kıyasla anlamlı farklılığı göstermektedir.

3.3.2. ZnT3 Gen Ekspresyonu

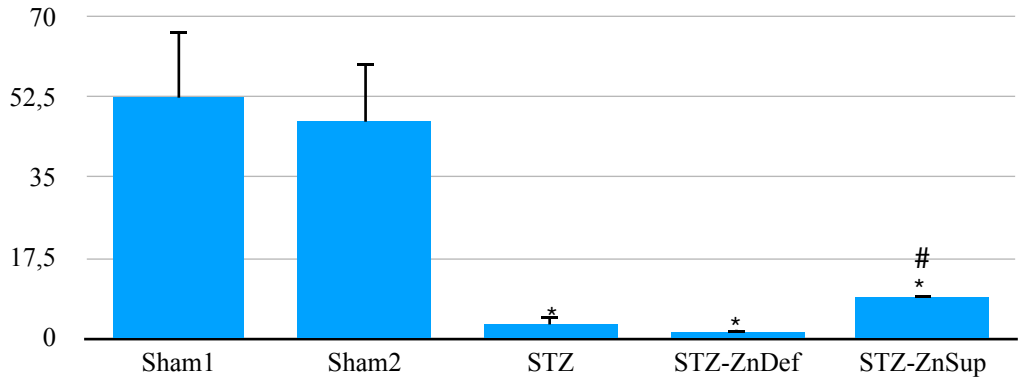
icv-STZ enjeksiyonu ZnT3 gen ekspresyonunda Sham gruplarına kıyasla anlamlı bir düşüşe neden oldu ($p<0.05$). Diyetsel çinko eksikliği gen ekspresyonunda bir değişikliğe neden olmazken, çinko takviyesi ZnT3 gen ekspresyonunu artırdı ($p<0.05$). STZ-ZnSup grubunun ZnT3 ekspresyonu Sham gruplarına kıyasla düşüktü ($p<0.05$).



Grafik 3.7. ZnT3 gen ekspresyonu kat değişimi. *p<0.05 Sham gruplarına, #p<0.05 STZ ve STZ-ZnDef gruplarına kıyasla anlamlı farklılığı göstermektedir.

3.3.3. SIRT1 Gen Ekspresyonu

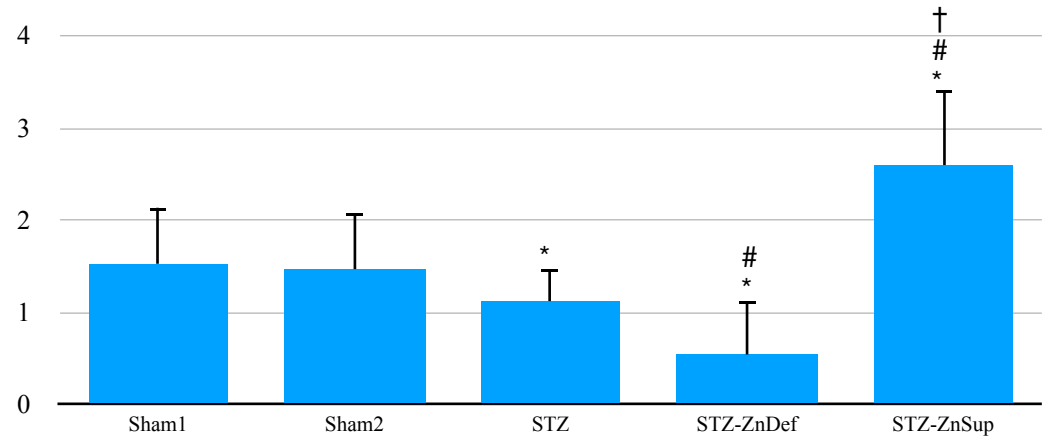
icv-STZ enjeksiyonu SIRT1 gen ekspresyonunda Sham gruplarına kıyasla anlamlı bir düşüşe neden oldu ($p<0.05$). Diyetsel çinko eksikliği gen ekspresyonunda anlamlı bir değişikliğe neden olmazken, çinko takviyesi SIRT1 gen ekspresyonunu artırdı ($p<0.05$). STZ-ZnSup grubunun SIRT1 ekspresyonu Sham gruplarına kıyasla düşüktü ($p<0.05$).



Grafik 3.8. SIRT1 gen ekspresyonu kat değişimi. *p<0.05 Sham gruplarına, #p<0.05 STZ ve STZ-ZnDef gruplarına ve kıyasla anlamlı farklılığı göstermektedir.

3.3.4. GLUT4 Gen Ekspresyonu

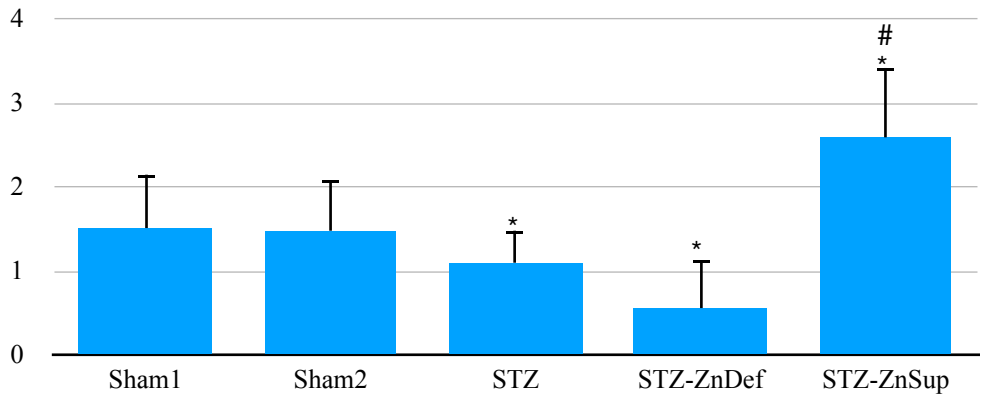
icv-STZ enjeksiyonu GLUT4 gen ekspresyonunda Sham gruplarına kıyasla anlamlı bir azalışa neden oldu ($p<0.05$). En düşük GLUT4 diyetsel çinko eksikliği ile elde edildi ($p<0.05$). Çinko takviyesi ile en yüksek GLUT4 değerleri elde edildi ($p<0.05$).



Grafik 3.9. GLUT4 gen ekspresyonu kat değişimi. *p<0.05 Sham gruplarına, #p<0.05 STZ grubuna, †p<0.05 STZ-ZnDef grubuna kıyasla anlamlı farklılığı göstermektedir.

3.3.5. PSD95 Gen Ekspresyonu

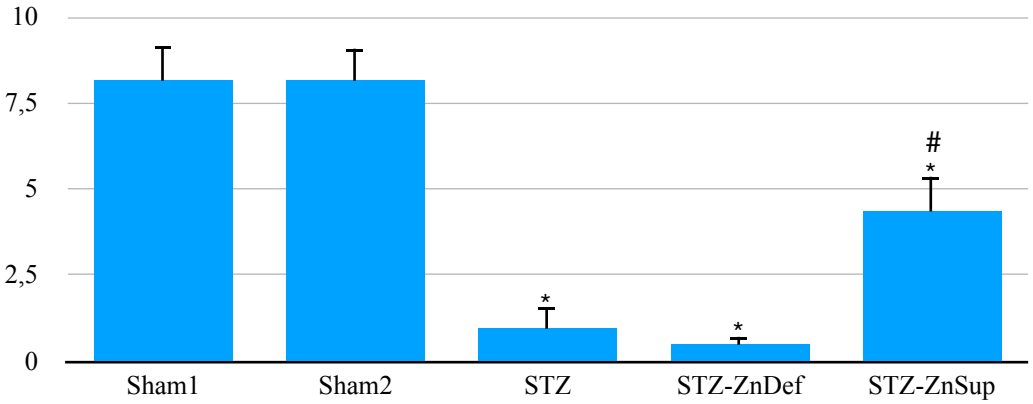
icv-STZ enjeksiyonu PSD95 gen ekspresyonunda Sham gruplarına kıyasla anlamlı bir azalışa neden oldu ($p<0.05$). Diyetsel çinko eksikliği anlamlı bir değişikliğe neden olmadı. Çinko takviyesi ile en yüksek PSD95 değerleri elde edildi ($p<0.05$).



Grafik 3.10. PSD95 gen ekspresyonu kat değişimi. *p<0.05 Sham gruplarına, #p<0.05 STZ ve STZ-ZnDef gruplarına kıyasla anlamlı farklılığı göstermektedir.

3.3.6. BDNF Gen Ekspresyonu

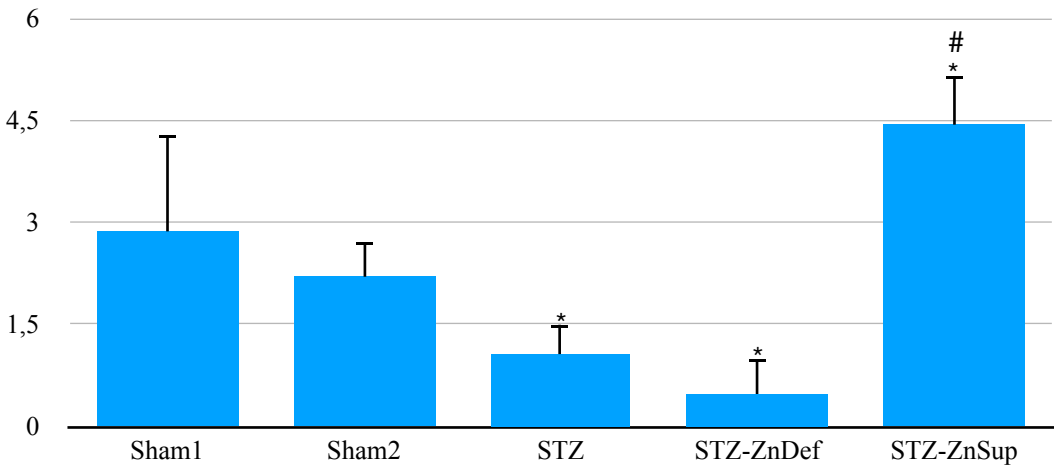
icv-STZ enjeksiyonu BDNF gen ekspresyonunda Sham gruplarına kıyasla anlamlı bir düşüşe neden oldu ($p<0.05$). Diyetsel çinko eksikliği gen ekspresyonunda anlamlı bir değişikliğe neden olmazken, çinko takviyesi BDNF gen ekspresyonunu artırdı ($p<0.05$). STZ-ZnSup grubunun BDNF ekspresyonu Sham gruplarına kıyasla düşüktü ($p<0.05$).



Grafik 3.11. BDNF gen ekspresyonu kat değişimi. *p<0.05 Sham gruplarına, #p<0.05 STZ ve STZ-ZnDef gruplarına kıyasla anlamlı farklılığı göstermektedir.

3.3.7. OST Gen Ekspresyonu

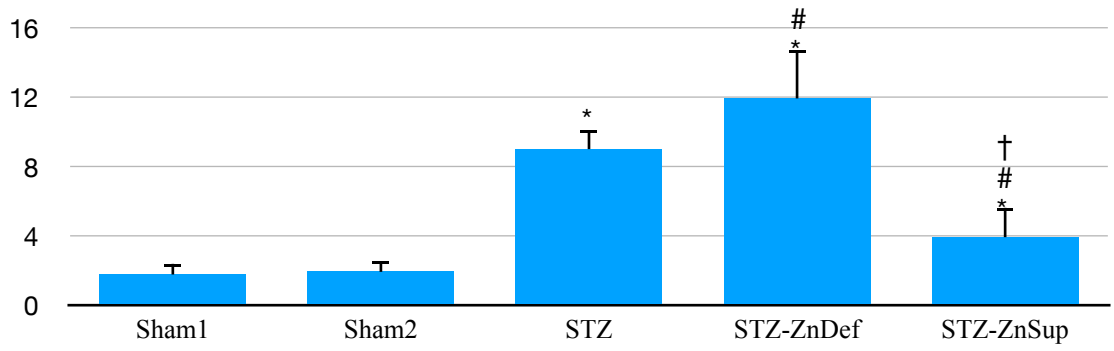
icv-STZ enjeksiyonu OST gen ekspresyonunda Sham gruplarına kıyasla anlamlı bir azalışa neden oldu ($p<0.05$). Diyetsel çinko eksikliği anlamlı bir değişikliğe neden olmadı. Çinko takviyesi ile en yüksek OST değerleri elde edildi ($p<0.05$).



Grafik 3.12. OST gen ekspresyonu kat değişimi. *p<0.05 Sham gruplarına, #p<0.05 STZ ve STZ-ZnDef gruplarına kıyasla anlamlı farklılığı göstermektedir.

3.3.8. Nogo-A Faktör Gen Ekspresyonu

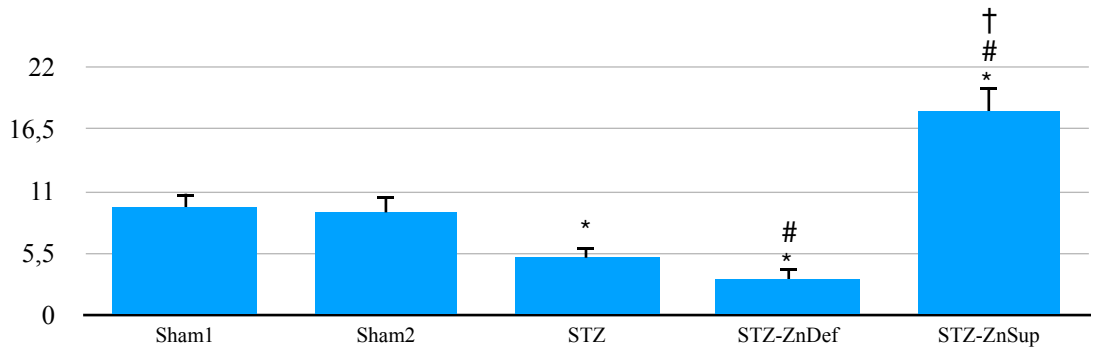
icv-STZ enjeksiyonu Nogo-A faktör gen ekspresyonunda Sham gruplarına kıyasla anlamlı bir artışa neden oldu ($p<0.05$). En yüksek Nogo-A faktör gen ekspresyonu diyetsel çinko eksikliği ile elde edildi ($p<0.05$). STZ-ZnSup grubunun Nogo-A faktör ekspresyonu, Sham gruplarına kıyasla yüksek ($p<0.05$), STZ grubuna kıyasla düşük bulundu ($p<0.05$).



Grafik 3.13. Nogo-A faktör gen ekspresyonu kat değişimi. *p<0.05 Sham gruplarına, #p<0.05 STZ grubuna, †p<0.05 STZ-ZnDef grubuna kıyasla anlamlı farklılığı göstermektedir.

3.3.9. miR-30a Gen Ekspresyonu

icv-STZ enjeksiyonu miR-30a gen ekspresyonunda Sham gruplarına kıyasla anlamlı bir azalışa neden oldu ($p<0.05$). En düşük miR-30 diyetsel çinko eksikliği ile elde edildi ($p<0.05$). Çinko takviyesi ile en yüksek miR-30 değerleri elde edildi ($p<0.05$).



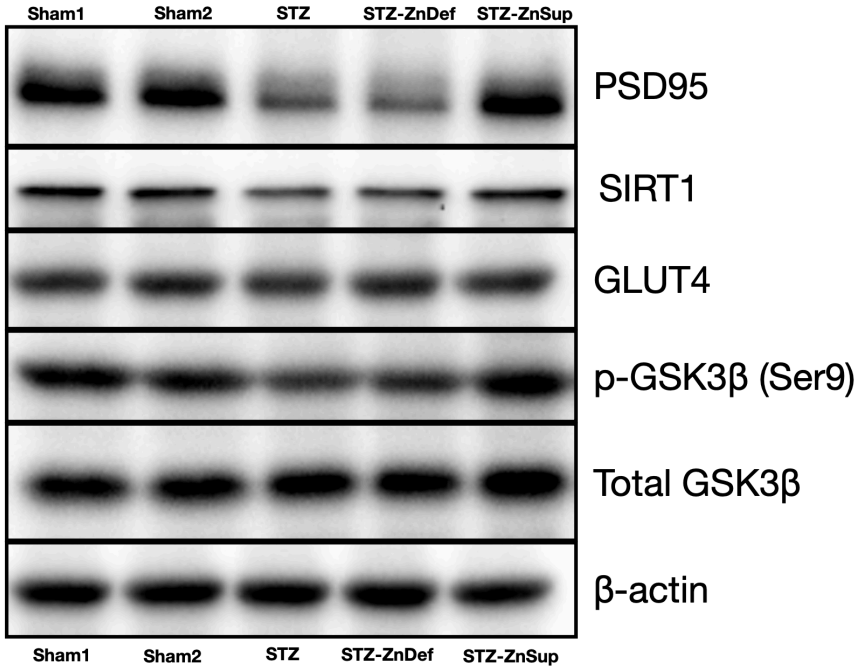
Grafik 3.14. miR-30 gen ekspresyonu kat değişimi. *p<0.05 Sham gruplarına, #p<0.05 STZ grubuna, †p<0.05 STZ-ZnDef grubuna kıyasla anlamlı farklılığı göstermektedir.

3.4 Western Blot Sonuçları

Çalışma gruplarının hipokampüs dokularında western blot yöntemi ile PSD95, SIRT1, GLUT4, p-GSK3β (Ser9), ve total GSK3β proteinlerinin analizi gerçekleştirildi. PSD95, SIRT1 ve GLUT4 için elde edilen sonuçlar β-actin seviyelerine göre normalize edildi. p-GSK3β ise önce total GSK3β'ya ve daha sonra β-actin'e normalize edildi (Şekil 3.4.1.). Ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna oranlanarak yüzde değişim şeklinde ifade edildi.

3.4.1. PSD95 Protein Ekspresyonu

PSD95 sonuçları Sham1 grubuna oranlanarak yüzde değişim şeklinde ifade edildi. icv-STZ enjeksiyonu PSD95 seviyesinde Sham gruplarına kıyasla anlamlı bir düşüşe neden oldu ($p<0.05$). Diyetsel çinko eksikliği protein seviyesinde bir değişikliğe yol açmazken, çinko takviyesi ile PSD95 ekspresyonu normal düzeylere döndü ($p<0.05$). Sham1, Sham2 ve STZ-ZnSup grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı.



Şekil 3.2. PSD95, SIRT1, GLUT4, p-GSK3β, total GSK3β ve β-actin proteinlerinin görece ekspresyon seviyeleri western blot ile belirlendi.



Grafik 3.14. PSD95 seviyeleri. icv-STZ enjeksiyonu PSD95 seviyesinin düşmesine neden olurken, çinko takviyesi protein düzeylerinin normale dönmesini sağladı. Veriler ortalama ± standart hata olarak sunuldu. *p<0.05 Sham1 ve Sham2 gruplarına, #p<0.05 STZ ve STZ-ZnDef gruplarına kıyasla anlamlı farklılığı göstermektedir.

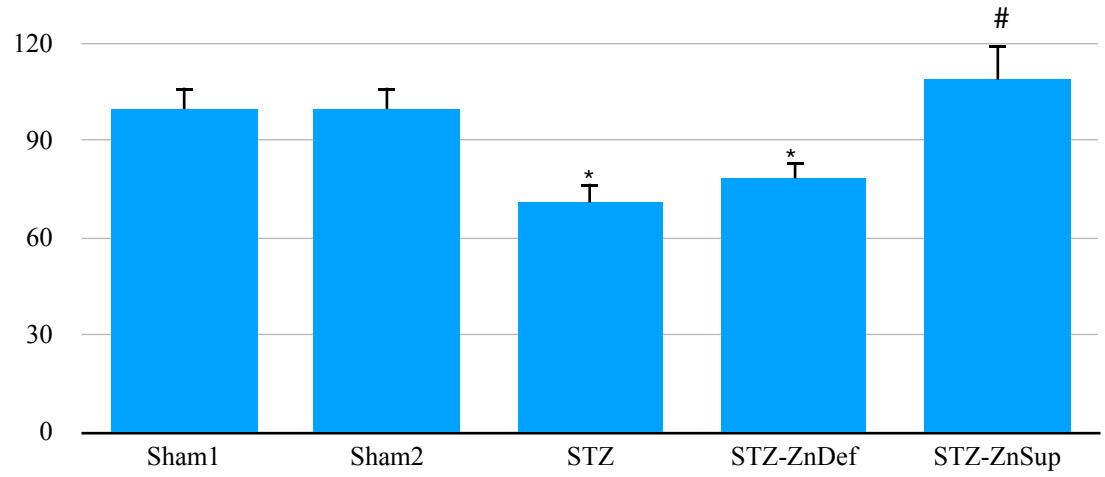
Tablo 3.1. PSD95 Protein Ekspresyonu

Gruplar	**PSD95 Seviyesi**
Sham1	100±4,82
Sham2	97,29±5,32
STZ	70,35±3,88
STZ-ZnDef	65,79±8,95
STZ-ZnSup	97,98±6,73

Veriler ortalama ± standart hata olarak sunuldu.

3.4.2. SIRT1 Protein Ekspresyonu

SIRT1 sonuçları Sham1 grubuna oranlanarak yüzde değişim şeklinde ifade edildi. icv-STZ enjeksiyonu SIRT1 seviyesinde Sham gruplarına kıyasla anlamlı bir düşüşe neden oldu ($p<0.05$). Diyetsel çinko eksikliği protein seviyesinde bir değişikliğe yol açmazken, çinko takviyesi ile SIRT1 ekspresyonu normal düzeylere döndü ($p<0.05$). Sham1, Sham2 ve STZ-ZnSup grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı.



Grafik 3.15. SIRT1 seviyeleri. icv-STZ enjeksiyonu SIRT1 seviyesinin düşmesine neden olurken, çinko takviyesi protein düzeylerinin normale dönmesini sağladı. Veriler ortalama ± standart hata olarak sunuldu. *$p<0.05$ Sham1 ve Sham2 gruplarına, #$p<0.05$ STZ ve STZ-ZnDef gruplarına kıyasla anlamlı farklılığı göstermektedir.

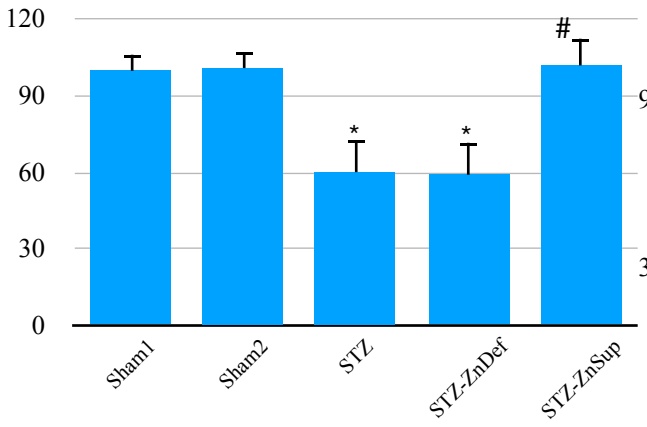
Tablo 3.2. SIRT1 Protein Ekspresyonu

Gruplar	SIRT1 Seviyesi
Sham1	100±6,61
Sham2	99,93±6,36
STZ	70,71±6,12
STZ-ZnDef	78,02±5,01
STZ-ZnSup	109,08±10,45

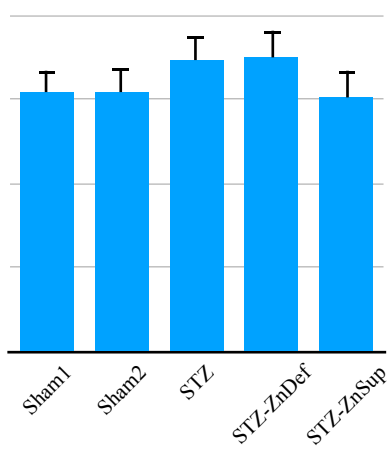
Veriler ortalama ± standart hata olarak sunuldu.

3.4.3. p-GSK3β ve Total GSKβ Protein Ekspresyonu

p-GSK3β sonuçları Sham1 grubuna oranlanarak yüzde değişim şeklinde ifade edildi. icv-STZ enjeksiyonu p-GSK3β seviyesinde Sham gruplarına kıyasla anlamlı bir düşüşe neden oldu ($p<0.05$). Diyetsel çinko eksikliği protein seviyesinde bir değişikliğe yol açmazken, çinko takviyesi ile p-GSK3β ekspresyonu normal düzeylere döndü ($p<0.05$). Sham1, Sham2 ve STZ-ZnSup grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Total GSK3β sonuçları Sham1 grubuna oranlanarak yüzde değişim şeklinde ifade edildi. Total GSK3β seviyelerinde gruplar arasında herhangi bir farklılık saptanmadı.



Grafik 3.16. p-GSK3β seviyeleri. icv-STZ enjeksiyonu p-GSK3β seviyesinin düşmesine neden olurken, çinko takviyesi protein düzeylerinin normale dönmesini sağladı. Veriler ortalama ± standart hata olarak sunuldu. *$p<0.05$ Sham1 ve Sham2 gruplarına, #$p<0.05$ STZ ve STZ-ZnDef gruplarına kıyasla anlamlı farklılığı göstermektedir.



Grafik 3.17. Total GSK3β seviyeleri. Gruplar arasında herhangi bir farklılık saptanmadı. Veriler ortalama ± standart hata olarak sunuldu.

Tablo 3.3. p-GSK3β Protein Ekspresyonu

Gruplar	p-GSK3β Seviyesi
Sham1	100±6,22
Sham2	100,29±6,46
STZ	59,83±12,27
STZ-ZnDef	58,49±12,83
STZ-ZnSup	101,94±10,21

Veriler ortalama ± standart hata olarak sunuldu.

3.4.4. GLUT4 Protein Ekspresyonu

GLUT4 sonuçları Sham1 grubuna oranlanarak yüzde değişim şeklinde ifade edildi. GLUT4 seviyelerinde gruplar arasında herhangi bir farklılık saptanmadı.



Grafik 3.18. GLUT4 seviyeleri. Gruplar arasında herhangi bir farklılık saptanmadı. Veriler ortalama ± standart hata olarak sunuldu.

4.TARTIŞMA

4.1. Davranış Testlerinin Tartışılması

AH, hastalığın altında yatabilecek farklı nedenlerin göz önünde bulundurulmasını gerektiren multifaktöriyel bir hastalıktır. Bu çalışma beyin insülin direnci ve Alzheimer benzeri patolojik değişiklikleri incelemek için yaygın olarak kullanılan icv-STZ enjekte edilmiş sıçanlarda çinkonun potansiyel yararlı etkilerini inceledi.

Uygulamalara başlamadan önceki 1. davranış test parametreleri gruplar arasında önemli bir farklılık görünmedi. Çalışmamızda 2. davranış testleri mukayese edildiğinde yüzme hızları ve kat edilen mesafe yönünden gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ve bu yaptığımız uygulamaların sıçanlarda motor bozukluğa yol açmadığını gösterir.

STZ ve STZ-ZnDef grupları, 4 günlük eğitim boyunca platformu diğer gruplara kıyasla daha uzun sürede buldu. Çinko takviyesi ise bellek performansındaki bu düşüşün tamamen ortadan kalkmasını sağladı. 5. günde su içinde gizlenmiş platform kaldırıldığında ölçülen Probe 2 testlerinde de benzer sonuç elde edildi: STZ ve STZ-ZnDef grupları zonuna daha geç geldi ve hedef kadranda daha az zaman geçirdi. Çinko desteği ise bu parametreleri tamamen düzeltti. Sıçan Alzheimer modelinde bilişsel ve davranışsal parametrelerin etkilendiğini gösteren çok sayıda çalışma vardır (Li ve ark 2016, Mehri ve ark 2020, Pfutzenreuter ve ark 2020). Hipokampal çinko sinyalinin LTP fonksiyonlara katıldığı bilindiğinden, hipokampusta çinko eksikliğinin bilişsel fonksiyonlarda bozulmaya yol açması beklenir (Takeda 2011). Alzheimer hastalığında çinko desteğinin APP'yi işleyen moleküler yolakları düzenleyerek bilişsel fonksiyonları iyileştirdiğine vurgu yapılmaktadır (Singla ve Dhawan 2014, 2017, Song ve ark 2017). Travmatik beyin hasarı oluşturulan sıçanlarda oral çinko desteğinin bilişsel bozulma ve depresyon gibi davranışsal eksiklikleri iyileştirmede etkili bir tedavi seçeneği olabileceği Cope ve ark (Cope ve ark 2012) tarafından önerilmiştir. Çalışmamızda STZ ve STZ-ZnDef gruplarında, diğer gruplarla mukayese edildiğinde yukarıda sonuçları verilen

davranış parametrelerinin önemli ölçüde bozulduğu görülmüştür. Buna karşın 5 mg/kg/gün dozundaki çinko tedavisi sporadik Alzheimer modelinde bozulan bilişsel fonksiyonları iyileştirmiştir.

4.2. PCR Bulgularının Tartışılması

4.2.1. IR Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması

Alzheimer hastalığı, beyin insülin sinyalizasyonu ile güçlü bir şekilde ilişkilidir (Nassar ve ark 2020). Hipokampusa özgü insülin direncinin etkilerini inceleyen çalışmalar, beyin insülin direncinin nöroplastisiteyi bozabileceğini göstermektedir (Grillo ve ark 2019). Deneysel Alzheimer modelinde insülin reseptör gen ekspresyonunda önemli bir baskılanma olduğu Rajasekar ve ark (2017) tarafından gösterilmiştir. Çinko içermeyen insülin formülasyonunun, kronik olarak kullanıldığında yaşla birlikte bilişsel gerilemeyi hızlandırabileceğinin ortaya konması (Anderson ve ark 2017), çinkonun bilişsel fonksiyonların düzenlenmesinde, insulin sinyal yolaklarındaki önemini gösterir. Çinkonun insülin reseptör beta alt ünitesinin fosforilasyonunu uyararak insulinin etkilerine dahil olduğu bilinmektedir (Anderson ve ark 2017). Çalışmamızda, hipokampal insulin reseptör gen ekspresyonunun hem STZ hem de STZ-ZnDef gruplarında baskılanması yukarıda bulguları sunulan raporlarla kuvvetli uyumluluk gösterir. Verilerimiz, sporadik Alzheimer modelinde bozulan insülin reseptör gen ekspresyon düzeylerinin intraperitoneal çinko uygulamasıyla düzeldiğini göstermektedir.

4.2.2. PSD95 Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması

PSD95, yaşlanma, AH ve çok sayıda psikiyatrik bozuklukla ilişkilidir (Savioz ve ark 2014). Whitfield ve ark (2014), PSD95'in bilişsel fonksiyonlarla ilişkisine dikkat çekerek, Alzheimer hastalarında PSD95'le birlikte beyinde çok önemli bir çinko transport proteini olan ZnT3 düzeylerinde bir azalma olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada bu noktadan yola çıkarak çinkonun PSD95 seviyelerinin regülasyonunda kritik bir modülatör olabileceği önerilmiştir. Çinkonun sinapstogenez ve sinaps olgunlaşması için gerekli olduğu, aksine, çinkonun sinapstan uzaklaştırılması ile sinaptik bütünlüğün korunamadığı ve sinaps kaybı olduğu rat

hipokampal nöron kültürlerinde gösterilmiştir (Grabrucker ve ark 2011). PSD95'in AH'de nöronları Aβ toksisitesinden koruduğu, PSD95 seviyeleri azalan nöronların hasara en açık hücreler olduğu yakın zamanda yapılan bir çalışmada detaylı olarak ortaya konmuştur (Dore ve ark 2021). Çalışmamızda literatür bulgularıyla uyumlu olarak sAH indüklenen hayvanlarda PSD95 seviyelerinin azaldığını bulduk. Çinko eksik diyet en azından çalışmamızda uyguladığımız diyet süresince protein seviyesini değiştirmedi. Çinko takviyesi ile birlikte ise Alzheimer ile azalan PSD95 seviyesinin, normal değerlere geri döndüğünü bulduk. Sonuç olarak PSD95 ile Alzheimer ve çinko arasında açık bir ilişki vardır ve çalışmamızın bulguları literatür ile uyumludur.

4.2.3. GLUT4 Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması

Glikoz taşıyıcıları (GLUT) ailesi çok sayıda üyeye sahiptir. Bu taşıyıcı proteinler arasında insüline bağımlı olan GLUT4, merkezi sinir sisteminde eksprese edilir ve hipokampusta sinaps oluşumuna katkıda bulunur (McNay ve Pearson-Leary 2020). GLUT4'ün hem akut hem de kronik intraserebroventriküler blokajının hipokampal aracılı bellek performansını bozduğu ortaya konulmuştur (McNay ve Pearson-Leary 2020). İnsülin benzeri etkilere sahip olan çinkonun, GLUT4 translokasyonunu ve GSK3β fosforilasyonunu aktive ederek hücrelerin glukoz kullanımını artırdığı bildirilmiştir (Wu ve ark 2016). Çinko takviyesinin insülin mimetik etkilerini ve GLUT4 ile ilişkisini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur ve periferde bu ilişki artık iyi anlaşılmıştır. Ancak bu ilişki merkezi sinir sisteminde geçerli olup olmadığı hala açık değildir. Çalışmamızın IR, SIRT1 ve GSK3β bulguları, çinkonun periferal dokulardaki etkisinin beyinde de geçerli olabileceğini düşündürmektedir. Verilerimiz, hipokampüste GLUT4 mRNA seviyesinin sAH ile birlikte azaldığını, çinko eksik diyetin bu azalmayı biraz daha şiddetlendirdiğini, çinko takviyesinin ise mRNA seviyelerini Sham değerlerinin üzerine çıkardığını göstermiştir. Bu sonuçlar çinkonun GLUT4 üzerine periferdeki etkisinin beyinde de geçerli olabileceğini düşündürmektedir, ancak benzer sonuçlar western blot analizlerimiz ile doğrulanamamıştır.

4.2.4. ZnT3 Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması

Çinko taşıyıcı 3 (ZnT3), beynin glutamaterjik nöronlarında sinaptik veziküllerin içinde çinkonun konsantre edilmesinden sorumlu tek mekanizmadır (McAllister ve Dyck 2017). ZnT3 aracılı sinaptik çinko dengesinin bilişsel fonksiyonların sürdürülmesinde kritik olduğu, ZnT3 kaybının sinaptik çinko dengesinde bozulmaya yol açarak hafıza ve bilişsel fonksiyonları olumsuz yönde etkileyebileceği bildirilmiştir (Whitfield ve ark 2014). ZnT3'ün yetişkin hipokampal nörogenezinin korunmasında merkezi bir işlevi olduğu ve çinko takviyesinin hipokampal nörogenez üzerinde yararlı bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Choi ve ark 2020). Aynı çalışmada çinko ve ZnT3'ün yaralanma sonrası sinir hücrelerinin korunması ve onarımını geliştirmek için tedavide kullanılabileceği fikri de önerilmiştir. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada elde ettiğimiz bulgular hem STZ hem de STZ-ZnDef gruplarında, hipokampal ZnT3 gen ekspresyonunda önemli baskılanmalar olduğunu göstermektedir. Buna karşın çalışmamızda çinko desteği STZ ile azalan hipokampal ZnT3 gen ekspresyonunu tersine çevirdi. Çalışmamızın bu bulgusu, 5 mg/kg/gün dozunda çinko desteğinin Alzheimer hastalığında azalan ZnT3 gen ekspresyonunu artırmak için kullanılabileceğini düşündürmektedir.

4.2.5. SIRT1 Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması

Sirtuinler, yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıklarla ilişkili pek çok biyolojik süreci düzenler (Herskovits ve Guarente 2014). Son yıllarda, bu proteinlerden biri olan SIRT1'in Alzheimer hastalığındaki (AH) rolü özellikle belirgin hale gelmiştir. Artan kanıtlar, SIRT1'in AD'de mitokondriyal disfonksiyonu, nöroinflamasyonu ve nörodejenerasyonu önleyebileceğini göstermektedir (Rizzi ve Roriz-Cruz 2018). SIRT1'den yoksun fareler, farklı bellek formlarında eksikliklerle birlikte bilişsel işlev bozukluğu sergiler (Michán ve ark 2010). SIRT1'den yoksun fareler ayrıca bazal iletimde değişiklik olmaksızın sinaptik plastisite eksiklikleri gösterdi (Michán ve ark 2010). SIRT1'in Aβ peptit birikimini önleyerek AD'ye karşı koruma sağlayabileceğini gösteren kanıtlar vardır (Wang ve ark 2010). Bu nedenle, SIRT1 aktivasyonu, AD'nin önlenmesinde umut verici bir hedeftir. Mevcut çalışma, icv-STZ uygulanan sıçanlarda hipokampal SIRT1 gen ekspresyonunun önemli

ölçüde baskılandığını ve çinko takviyesinin azaltılmış SIRT1 ekspresyonunu hafiflettiğini, çinkonun SIRT1'in bir aktivatörü olabileceğini düşündürmektedir.

4.2.6. BDNF Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması.

BDNF, beyin dokusunda en çok dağılım gösteren ve kapsamlı olarak incelenen nörotrofinlerden biridir (Colucci-D'Amato ve ark 2020). Alzheimer hastalarının ölüm sonrası beyin doku örneklerinde BDNF mRNA ve protein seviyelerinin azaldığı bulunmuştur (Tanila 2017). Azalmış beyin BDNF seviyelerine ilişkin bulgular, serum BDNF seviyelerindeki buna karşılık gelen düşüşün Alzheimer için bir biyobelirteç olarak hizmet edebileceği düşüncesini gündeme getirmiştir. (Yasutake ve ark 2006). Çinko birbirinden bağımsız mekanizmalar ile BDNF fonksiyonunu etkiler etkiler (Sensi ve ark 2011). Çinko, metalloproteinaz aktivasyonu yoluyla, pro-BDNF'nin BDNF dönüşümünü destekler (Yoo ve ark 2016). Çinko ayrıca, metalloproteinazlardan bağımsız olarak BDNF sinyalini modüle eder (Frazzini ve ark 2018). Son olarak, çinko BDNF'den bağımsız olarak TrkB reseptörünü uyarabilir (Huang ve ark 2008).

Çalışmamızda, STZ ve STZ-ZnDef gruplarında elde ettiğimiz azalmış hipokampal BDNF gen ekspresyonu bulguları, Alzheimer hastalarında BDNF düzeylerinin azaldığını bildiren yukarıdaki raporlarla uyumludur. Yine mevcut çalışmanın vurgulanması gereken bir başka sonucu, çinko desteğinin deneysel Alzheimer modelinde hipokampal BDNF gen ekspresyonunda artışa yol açmasıdır. Elde ettiğimiz bu bulgu çinkonun BDNF sinyalini güçlendirici etkisi ile uyumludur ve çinko desteğinin nöroprotektif etkilerini gösterir.

4.2.7. miR-30 Gen Ekspresyon Bulguları

miR-30a, BDNF ekspresyonunun negatif düzenleyicisi olarak önerilmiştir (Darcq ve ark 2015). Ancak, çalışmamızda STZ ile tedavi edilen hayvanlarda miR-30a düzeylerinin azaldığını bulduk. Çinko eksikliği daha fazla azalmaya neden oldu ve çinko takviyesi miR-30a ekspresyonunu Sham hayvanlarının seviyesinin üzerine çıkardı. miR-30a ve BDNF gen ekspresyonu arasındaki korelasyon

homeostatik bir yanıt olabilir, ancak miR-30a regülasyonunu anlamak için daha fazla yayına ihtiyaç vardır.

4.2.8. Osteokalsin Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması

Osteokalsinin, bellek fonksiyonunun yanı sıra, yetişkin nörogenezi, depresyon ve anksiyetenin anahtar düzenleyicisi olduğu öne sürülmüştür (Lu ve ark 2021). Sun ve ark (2021) dorsal dentat granül hücrelerinin dış tabakasında osteokalsin eksprese eden bir hücre altkümesi tanımlamışlardır. Aynı zamanda, osteokalsin eksprese eden nöronların anksiyeteyi baskıladığını ve yetişkin nörogeneziniteşvik ettiğini gösterdiler. Osteokalsinin bu görevlerine BDNF'in aracılık etmesi olasıdır (Kosmidis ve ark 2018). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada en yüksek osteokalsin gen ekspresyon düzeyleri STZ-ZnSup, en düşük osteokalsin gen ekspresyon değerleri ise STZ ve STZ-ZnDef gruplarında elde edildi. Mevcut çalışmanın belki de en ilginç bulguları hipokampal osteokalsin gen ekspresyon düzeyleridir. Hipokampal osteokalsin ekspresyonu ile icv-STZ enjeksiyonu ve çinko arasındaki ilişki, beynin intrinsik savunma mekanizmalarının fonksiyonunu yansıtıyor olabilir.

4.2.9. Nogo-A Faktör Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması

Nogo-A, memelilerde yaralanma sonrası aksonal rejenerasyonu inhibe ederek fonksiyonel geri dönüşü engelleyen bir proteindir (Xu ve ark 2015). Nogo-A'nın Alzheimer hastalığındaki fizyopatolojik işlevinde son yıllarda hızlı ilerleme kaydedilmiştir. Son araştırmalar, Nogo-A reseptörüne bağlanma yoluyla, Nogo-A'nın Alzheimer hastalığı patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Xu ve ark 2015). Özellikle Nogo-A reseptörlerinin, Alzheimer hastalığının başlıca nedeni olduğu düşünülen Aβ oluşumunu modüle ettiği anlaşılmıştır. Gerçekleştirilen bir çalışmada; normal insan yaşlanmasında ve Alzheimer hastalığında hipokampal Nogo-A'nın gen ekspresyonu ifadesini ayrıntılı olarak analiz edilmiştir (Gil ve ark 2006). Elde edilen sonuçlar Nogo-A'nın yaşlı hipokampal oluşumdaki oligodendrositler ve nöronlar tarafından ekspresyonun gerçekleştiğini göstermektedir (Gil ve ark 2006). Aynı çalışmada, Nogo-A'nın AH'li hipokampal nöronlar tarafından

gerçekleştirilen aşırı ekspresyonunun Aβ ile ilişkili olduğu da rapor edilmektedir. Çalışmamızdaki en yüksek Nogo-A gen ekspresyon düzeyleri STZ-ZnDef grubunda elde edildi. STZ grubuna ait Nogo-A gen ekspresyon değerleri STZ-ZnDef grubundan düşük, diğer grupların tamamından daha yüksekti. Elde ettiğimiz bu bulgu AH'li hipokampal nöronlar tarafından Nogo-A'nın aşırı ekspresyonunu bildiren Gil ve ark (2006)'ının raporuyla paralellik arz eder. Mevcut çalışmanın Nogo-A bulgularıyla ilgili en çarpıcı sonuç, hipokampal Nogo-A ekspresyonu ile çinko arasında zıt ilişkidir. STZ-ZnDef grubunda Nogo-A ekspresyonu, STZ grubuna oranla daha yüksek düzeylerde gerçekleşmiştir. Çinko desteği, Nogo-A ekspresyonunu Sham gruplarına yaklaştırarak, hem STZ hem de STZ-ZnDef gruplarının altına indirmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz hipokampal Nogo-A ekspresyonu ile çinko arasındaki zıt ilişki konuyla ilişkili ilk bulgudur.

4.3. Western Blot Bulgularının Tartışılması

4.3.1. PSD95 Protein Ekspresyon Bulgularının Tartışılması

icv-STZ enjeksiyonunun hipokampüste PSD95 seviyesinde azalmayla sonuçlandığı daha önce rapor edilmiştir (Xu ve ark 2014). Transgenik AH fareler üzerinde gerçekleştirilen çalışmada elektroakupunktur aracılığıyla ekspresyonu artan PSD95'in Aβ oluşumunu önleyebileceği, öğrenme ve hafıza fonksiyonlarında iyileştirici etkiye sahip olabileceği rapor edilmiştir (Yang ve ark 2020). PSD95 protein ekspresyonunun artırılmasını sağlayan stratejilerin Alzheimer hastalığının geriletilmesinde önemli olabileceği söylenebilir (Chen ve ark 2016, Dore ve ark 2021). Major depresif bozukluğa sahip intihar vakalarının beyin dokularında yapılan ölçümlerde ZnT3 ve PSD95 protein ekspresyonunda ile major depresif bozukluğa sahip olmayan 8 kadavranın beyin dokularıyla mukayese edildiğinde önemli bir azalma görülmüştür (Rafalo-Ulinska ve ark 2016). Buradan yola çıkarak ZnT3 ve PSD95 protein ekspresyonu arasında önemli bir ilişkinin olabileceği düşünülebilir. Fare hipokampusundaki çinko eksikliğinin PSD95 ile birlikte BDNF protein ekspresyonunda azalmayla sonuçlandığı rapor edilmiştir (Yang ve ark 2013).

Mevcut çalışmada icv-STZ enjeksiyonu PSD95 seviyesinde Sham gruplarına kıyasla anlamlı bir düşüşe neden oldu. Diyetsel çinko eksikliği protein seviyesinde icv-STZ grubuna oranla anlamlı bir değişikliğe yol açmadı. Elde ettiğimiz bu bulgular Alzheimer hastalığında PSD95 protein ekspresyonunun azaldığını bildiren raporlarla tutarlıdır. Çalışmamızda çinko desteği STZ grubunda PSD95 protein ekspresyonunu Sham kontrol gruplarıyla aynı düzeylere getirdi. Elde ettiğimiz bu bulgu 4 hafta süreli çinko desteğinin sAH modelinde hipokampal PSD95 seviyesini artırdığını göstermesi yönüyle önemlidir.

4.3.2.GLUT4 Protein Ekspresyon Bulgularının Tartışılması

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada, GLUT4 protein ekspresyon seviyelerinde, mRNA seviyelerinin aksine gruplar arasında herhangi bir farklılık saptanmadı. Literatür taramamızda GLUT4'ün protein ve mRNA seviyelerinin birbirine paralel gittiği görülmüştür (Dela ve ark 1994, Holmes ve Dohm 2004). Mevcut verilerimiz bu sonucu açıklamakta başarısız olmuştur. Ancak, çinko takviyesinin GLUT4'ün membrana translokasyonunu artırdığını gösteren çalışmalar vardır (Pearson-Leary ve ark 2018). Biz deneysel şartlarımız ile ancak total GLUT4 miktarını belirleyebildik. Dolayısıyla mRNA ve protein seviyeleri arasındaki tutarsızlığa rağmen, çinko yine de insulin mimetic etki gösteriyor olabilir.

4.3.3. SIRT1 Protein Ekspresyon Bulgularının Tartışılması

Elektroakupunktur tedavisinin Alzheimer hastalığına sahip farelerin hipokampusunda azalan SIRT1 protein ekspresyonunu artırarak beyin metabolizmasını düzenleyebileceği gösterilmiştir (Dong ve ark 2015). icv-STZ enjeksiyonu ile beyin insülin direnci oluşturulan sıçan modelinde azalan SIRT1'in resveratrol desteğiyle protein ekspresyonunda artış meydana gelmiştir (Du ve ark 2014). Sıçan Alzheimer modelinde azalan hipokampal SIRT1 protein ekspresyonu Dihidromyricetin tedavisiyle artırılmıştır (Sun ve ark 2019). Yukarıdaki raporların bulguları açık bir şekilde sıçan Alzheimer modelinde azalan hipokampal SIRT1 protein ekspresyonuna vurgu yapmaktadırlar. Bizim çalışmamızda icv-STZ enjeksiyonu SIRT1 seviyesinde Sham gruplarına kıyasla anlamlı bir düşüşe neden

oldu. Diyetsel çinko eksikliği ise SIRT1 protein seviyesinde icv-STZ grubundan farklı bir değişikliğe yol açmadı. Çalışmamızda çinko desteği Alzheimer modelinde azalan SIRT1 protein ekspresyonunu normal düzeylere getirdi. Bu bulgu şu yönüyle önemlidir. Yaptığımız med-line taramalarda hipokampusta SIRT1 protein ekspresyonu ve çinko ilişkisini konu alan bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmamızda Alzheimer modelinde çinko desteğiyle elde ettiğimiz artmış SIRT1 protein ekspresyonunun bu konudaki ilk bulgu olduğunu söyleyebiliriz.

4.3.4. p-GSK3β Protein Ekspresyon Bulgularının Tartışılması

GSK3β, Alzheimer patofizyolojisinde önemli bir oyuncu olarak kabul edilir, çünkü bu kinazın düzensizliği, hastalığın tau fosforilasyonu, Aβ üretimi, hafıza, nörogenez ve sinaptik fonksiyon dahil olmak üzere tüm ana ayırt edici özelliklerini etkiler. Serebral korteks, hipokampus ve septal çekirdekler başta olmak üzere merkezi sinir sisteminde GSK3-β yoğun olarak bulunur ve ekspresyon düzeyleri yaşlanmayla birlikte artar (Lee ve ark. 2006). Bu nedenle Alzheimer hastalarının beyin dokusunda yüksek miktarda bulunan GSK3-β bu hastalığın patogenezindeki olaylara katkıda bulunur (Lauretti ve ark 2020). Çinko ile GSK3-β ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada çinkonun, özellikle uzun süreli tedavide (4-8 saat) fosforile GSK-3β'ı indükleyebileceği gösterilmiştir (An ve ark 2005). Alzheimer hastalarında merkezi sinir sisteminde GSK3-β aşırı ekspresyonu ve aşırı aktivitesinin ilk keşfinden bu yana, bu kinazın rolü tau ve Aβ patofizyolojisi ile bağlantılı olarak kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (Lauretti ve ark 2020). Güçlü kanıtlar, GSK3-β'nın artan aktivitesinin tau hiperfosforilasyonunu ve Aβ oluşumunu indükleyebileceğine işaret etmiştir (An ve ark 2005). Çok sayıda çalışma çinko takviyesinin GSK3β hiperaktivitesinin önüne geçebileceğini göstermiştir (Ilouz ve ark 2002, Chanoit ve ark 2008, Iitsuka ve ark 2013, Sun ve ark 2014, Wu ve ark 2016).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada Total GSK3β seviyelerinde gruplar arasında herhangi bir farklılık saptanmadı. Buna karşın icv-STZ enjeksiyonu p-GSK3β seviyesinde Sham gruplarına kıyasla anlamlı bir düşüşe neden oldu. Diyetsel çinko

eksikliği STZ grubuna oranla protein seviyesinde bir değişikliğe yol açmazken, çinko desteğiyle p-GSK3β ekspresyonu normal düzeylere döndü. Mevcut çalışmada vurgulanması gereken en önemli bulgu Alzheimer modelinde azalan p-GSK3β seviyelerinin çinko desteğiyle kontrol değerlerine ulaşmasıdır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın bulguları bir bütün olarak düşünüldüğünde;

1. Çalışmada icv-STZ sıçanlarında çinko takviyesi ile tamamen düzeltilebilen bellek eksiklikleri tespit edildi.

2. Western blot analiziyle elde edilen bulgular, icv-STZ uygulamasının hipokampal PSD95, SIRT1, p-GSK3β'yi önemli ölçüde azalttığını ve çinko takviyesinin normal protein seviyelerini geri kazandırdığını gösterdi. Ancak, çinko eksikliği mevcut çalışma dizaynında protein seviyeleri üzerine bir etki göstermedi.

3. BDNF, PSD95, SIRT1, GLUT4, IR ve ZnT3, OST ve reseptörü mRNA seviyeleri ve miR-30a icv-STZ uygulamasıyla baskılanırken, çinko desteği azalan parametreleri normal düzeylere getirdi. Nogo-A gen mRNA seviyesi AH'de artış gösterirken Zn takviyesi ile bu artışın önüne geçildi.

4. Hipokampal osteokalsin gen ekspresyonunun çinko takviyesi ile artış göstermesi, çinkonun beynin intrinsik savunma mekanizmalarını aktive edebileceğini düşündürmektedir. Bu bulgu, daha sonraki çalışmalar için ayrıca yeni hedef ve stretejiler tayin etmektedir.

5. Hipokampal Nogo-A gen ekspresyonuna yönelik bulgular, STZ enjeksiyonu ile beyinde fonksiyonel iyileşmeyi baskılayabilecek faktörlerin aktive olduğunu ileri sürmüştür. Çinko takviyesi, bu maladaptasyonun yatıştırılmasını sağlamıştır.

6. Verilerimiz çinko takviyesinin bilişsel eksiklikleri iyileştirdiğini ve sıçanlarda icv-STZ ile indüklenen sAH'de, hipokampüste sinaptik plastisite ve insülin sinyalizasyonunun temel moleküler hedeflerindeki bozulmayı önleyerek nöroprotektif etkilere sahip olduğunu göstermektedir.

7. Çalışmamızın en büyük limitasyonu, katıldığı çok geniş fizyolojik fonksiyonlardan dolayı çinkonun hangi hücresel mekanizmaları kullanarak STZ ile indüklenen bozukluklara karşı çıktığını belirleyebilecek bir dizayna sahip

olmamasıdır. Örneğin, çinko desteği doğrudan veya dolaylı olarak GSK3β fosforilasyonundan sorumlu olabilir.

8. Bundan sonra yapılacak benzer çalışmalarda, icv-STZ ile indüklenen daha uzun süreli Alzheimer modelinin yanı sıra, çinkonun farklı dozlarının uygulamada kullanılması kritik bilgilere ulaşmamızı sağlayabilir. Ek olarak, fare ve sıçan Aβ peptidlerinin, insandakinin aksine Zn ile oligomerize olmadığı göz önüne alınarak, sonraki çalışmalarda Zn'nin terapötik etkilerinin yanı sıra, Aβ etkileşimleri ile olası zararlı etkileri araştırılmalıdır.

6. KAYNAKLAR

Ackland ML, Michalczyk AA, 2016. Zinc and infant nutrition. Arch. Biochem. Biophys., 611, 51-7.

Adlard PA, Parncutt JM, Finkelstein DI, Bush AI, 2010. Cognitive loss in zinc transporter-3 knock-out mice: a phenocopy for the synaptic and memory deficits of Alzheimer's disease? J. Neurosci., 30, 5, 1631-6.

Aleman A, Torres-Alemán I, 2009. Circulating insulin-like growth factor I and cognitive function: neuromodulation throughout the lifespan. Prog. Neurobiol., 89, 3, 256-65.

Amidfar M, de Oliveira J, Kucharska E, Budni J, Kim Y-K, 2020. The role of CREB and BDNF in neurobiology and treatment of Alzheimer's disease. Life Sci., 257, 118020.

An WL, Bjorkdahl C, Liu R, Cowburn RF, Winblad B, Pei JJ, 2005. Mechanism of zinc−induced phosphorylation of p70 S6 kinase and glycogen synthase kinase 3β in SH−SY5Y neuroblastoma cells. J. Neurochem., 92, 5, 1104-15.

Anderson KL, Frazier HN, Maimaiti S, Bakshi VV, Majeed ZR, Brewer LD, Porter NM, Lin A-L, Thibault O, 2017. Impact of single or repeated dose intranasal zinc-free insulin in young and aged F344 rats on cognition, signaling, and brain metabolism. Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences, 72, 2, 189-97.

Araki Y, Zeng M, Zhang M, Huganir RL, 2015. Rapid dispersion of SynGAP from synaptic spines triggers AMPA receptor insertion and spine enlargement during LTP. Neuron, 85, 1, 173-89.

Arnold SE, Arvanitakis Z, Macauley-Rambach SL, Koenig AM, Wang H-Y, Ahima RS, Craft S, Gandy S, Buettner C, Stoeckel LE, 2018. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. Nature Reviews Neurology, 14, 3, 168-81.

Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT, 1992. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. Neurology, 42, 3, 631-.

Asok A, Leroy F, Rayman JB, Kandel ERJTin, 2018. Molecular mechanisms of the memory trace.

Assaf S, Chung S-H, 1984. Release of endogenous Zn 2+ from brain tissue during activity. Nature, 308, 5961, 734-6.

Baki L, Shioi J, Wen P, Shao Z, Schwarzman A, Gama−Sosa M, Neve R, Robakis NK, 2004. PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK−3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations. The EMBO journal, 23, 13, 2586-96.

Barco A, Patterson S, Alarcon JM, Gromova P, Mata-Roig M, Morozov A, Kandel ER, 2005. Gene expression profiling of facilitated L-LTP in VP16-CREB mice reveals that BDNF is critical for the maintenance of LTP and its synaptic capture. Neuron, 48, 1, 123-37.

Barros RP, Machado UF, Warner M, Gustafsson J-Å, 2006. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ERβ and ERα. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103, 5, 1605-8.

Beyer N, Coulson DT, Heggarty S, Ravid R, Hellemans J, Irvine GB, Johnston JA, 2012. Zinc transporter mRNA levels in Alzheimer's disease postmortem brain. J. Alzheimers Dis., 29, 4, 863-73.

Bierer LM, Hof PR, Purohit DP, Carlin L, Schmeidler J, Davis KL, Perl DP, 1995. Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. Arch. Neurol., 52, 1, 81-8.

Biessels G, Kappelle L, 2005. Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? Biochem. Soc. Trans., 33, 5, 1041-4.

Bjorklund NL, Reese LC, Sadagoparamanujam V, Ghirardi V, Woltjer RL, Taglialatela G, 2012. Absence of amyloid β oligomers at the postsynapse and regulated synaptic Zn 2+ in cognitively intact aged individuals with Alzheimer’s disease neuropathology. Mol. Neurodegener., 7, 1, 1-13.

Blakemore LJ, Trombley PQ, 2017. Zinc as a neuromodulator in the central nervous system with a focus on the olfactory bulb. Front. Cell. Neurosci., 11, 297.

Bonaventura P, Benedetti G, Albarède F, Miossec P, 2015. Zinc and its role in immunity and inflammation. Autoimmunity reviews, 14, 4, 277-85.

Bosch M, Castro J, Saneyoshi T, Matsuno H, Sur M, Hayashi Y, 2014. Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. Neuron, 82, 2, 444-59.

Bosch M, Hayashi Y, 2012. Structural plasticity of dendritic spines. Curr. Opin. Neurobiol., 22, 3, 383-8.

Braak H, Braak E, 1995. Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. Neurobiol. Aging, 16, 3, 271-8.

Braak H, Del Tredici K, 2011. The pathological process underlying Alzheimer’s disease in individuals under thirty. Acta Neuropathol., 121, 2, 171-81.

Bradley CA, Peineau S, Taghibiglou C, Nicolas CS, Whitcomb DJ, Bortolotto ZA, Kaang B-K, Cho K, Wang Y-T, Collingridge GL, 2012. A pivotal role of GSK-3 in synaptic plasticity. Front. Mol. Neurosci., 5, 13.

Brewer GJ, Kaur S, 2013. Zinc deficiency and zinc therapy efficacy with reduction of serum free copper in Alzheimer’s disease. International Journal of Alzheimer’s Disease, 2013.

Brion LP, Heyne R, Lair CS, 2021. Role of zinc in neonatal growth and brain growth: review and scoping review. Pediatr. Res., 89, 7, 1627-40.

Bush AI, 2013. The metal theory of Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis., 33, s1, S277-S81.

Chanoit G, Lee S, Xi J, Zhu M, McIntosh RA, Mueller RA, Norfleet EA, Xu Z, 2008. Exogenous zinc protects cardiac cells from reperfusion injury by targeting mitochondrial permeability transition pore through inactivation of glycogen synthase kinase-3β. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 295, 3, H1227-H33.

Chatterjee S, Peters SA, Woodward M, Arango SM, Batty GD, Beckett N, Beiser A, Borenstein AR, Crane PK, Haan M, (2016). Type 2 diabetes as a risk factor for dementia in women compared with men: a pooled analysis of 2.3 million people comprising more than 100,000 cases of dementia, Am Diabetes Assoc.

Chen C, Zhou M, Ge Y, Wang X, 2020. SIRT1 and aging related signaling pathways. Mech. Ageing Dev., 187, 111215.

Chen DY, Stern SA, Garcia-Osta A, Saunier-Rebori B, Pollonini G, Bambah-Mukku D, Blitzer RD, Alberini CM, 2011. A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. Nature, 469, 7331, 491-7.

Chen YJ, Zheng HY, Huang XX, Han SX, Zhang DS, Ni JZ, He XY, 2016. Neuroprotective effects of icariin on brain metabolism, mitochondrial functions, and cognition in triple−transgenic Alzheimer's disease mice. CNS Neurosci. Ther., 22, 1, 63-73.

Choi BY, Hong DK, Jeong JH, Lee BE, Koh JY, Suh SW, 2020. Zinc transporter 3 modulates cell proliferation and neuronal differentiation in the adult hippocampus. Stem Cells, 38, 8, 994-1006.

Chuang Y-C, Chen S-D, Jou S-B, Lin T-K, Chen S-F, Chen N-C, Hsu C-Y, 2019. Sirtuin 1 regulates mitochondrial biogenesis and provides an endogenous neuroprotective mechanism against seizure-induced neuronal cell death in the hippocampus following status epilepticus. Int. J. Mol. Sci., 20, 14, 3588.

Clodfelder-Miller BJ, Zmijewska AA, Johnson GV, Jope RS, 2006. Tau is hyperphosphorylated at multiple sites in mouse brain in vivo after streptozotocin-induced insulin deficiency. Diabetes, 55, 12, 3320-5.

Cole TB, Wenzel HJ, Kafer KE, Schwartzkroin PA, Palmiter RD, 1999. Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene. Proceedings of the national academy of sciences, 96, 4, 1716-21.

Colucci-D’Amato L, Speranza L, Volpicelli F, 2020. Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer. Int. J. Mol. Sci., 21, 20, 7777.

Cope EC, Morris DR, Gower-Winter SD, Brownstein NC, Levenson CW, 2016. Effect of zinc supplementation on neuronal precursor proliferation in the rat hippocampus after traumatic brain injury. Exp. Neurol., 279, 96-103.

Cope EC, Morris DR, Scrimgeour AG, Levenson CW, 2012. Use of zinc as a treatment for traumatic brain injury in the rat: effects on cognitive and behavioral outcomes. Neurorehabil. Neural Repair, 26, 7, 907-13.

Corona C, Masciopinto F, Silvestri E, Del Viscovo A, Lattanzio R, La Sorda R, Ciavardelli D, Goglia F, Piantelli M, Canzoniero LMT, 2010. Dietary zinc supplementation of 3xTg-AD mice increases BDNF levels and prevents cognitive deficits as well as mitochondrial dysfunction. Cell Death Dis., 1, 10, e91-e.

Craven KM, Kochen WR, Hernandez CM, Flinn JM, 2018. Zinc exacerbates tau pathology in a tau mouse model. J. Alzheimers Dis., 64, 2, 617-30.

Damianaki K, Lourenco JM, Braconnier P, Ghobril J-P, Devuyst O, Burnier M, Lenglet S, Augsburger M, Thomas A, Pruijm M, 2020. Renal handling of zinc in chronic kidney disease patients and the role of circulating zinc levels in renal function decline. Nephrology Dialysis Transplantation, 35, 7, 1163-70.

Darcq E, Warnault V, Phamluong K, Besserer GM, Liu F, Ron D, 2015. MicroRNA-30a-5p in the prefrontal cortex controls the transition from moderate to excessive alcohol consumption. Mol. Psychiatry, 20, 10, 1240-50.

Datki Z, Galik-Olah Z, Janosi-Mozes E, Szegedi V, Kalman J, Hunya ÁG, Fulop L, Tamano H, Takeda A, Adlard PA, 2020. Alzheimer risk factors age and female sex induce cortical Aβ aggregation by raising extracellular zinc. Mol. Psychiatry, 25, 11, 2728-41.

de la Torre JC, 2004. Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics. The Lancet Neurology, 3, 3, 184-90.

De Strooper B, Karran E, 2016. The cellular phase of Alzheimer’s disease. Cell, 164, 4, 603-15.

Dehvari N, Hutchinson DS, Nevzorova J, Dallner OS, Sato M, Kocan M, Merlin J, Evans BA, Summers RJ, Bengtsson T, 2012. β2−Adrenoceptors increase translocation of GLUT4 via GPCR kinase sites in the receptor C−terminal tail. Br. J. Pharmacol., 165, 5, 1442-56.

Dela F, Ploug T, Handberg A, Petersen LN, Larsen JJ, Mikines KJ, Galbo H, 1994. Physical training increases muscle GLUT4 protein and mRNA in patients with NIDDM. Diabetes, 43, 7, 862-5.

Deng Y, Xiong Z, Chen P, Wei J, Chen S, Yan Z, 2014. β-Amyloid impairs the regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by glycogen synthase kinase 3. Neurobiol. Aging, 35, 3, 449-59.

Dong W, Guo W, Wang F, Li C, Xie Y, Zheng X, Shi H, 2015. Electroacupuncture upregulates SIRT1-dependent PGC-1α expression in SAMP8 Mice. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research, 21, 3356.

Dore K, Carrico Z, Alfonso S, Marino M, Koymans K, Kessels HW, Malinow R, 2021. PSD-95 protects synapses from β-amyloid. Cell Rep., 35, 9, 109194.

Du L-L, Xie J-Z, Cheng X-S, Li X-H, Kong F-L, Jiang X, Ma Z-W, Wang J-Z, Chen C, Zhou X-W, 2014. Activation of sirtuin 1 attenuates cerebral ventricular streptozotocin-induced tau hyperphosphorylation and cognitive injuries in rat hippocampi. Age, 36, 2, 613-23.

Duarte AI, Moreira PI, Oliveira CR, 2012. Insulin in central nervous system: more than just a peripheral hormone. J. Aging Res., 2012.

El Messari Sd, Aït-Ikhlef A, Ambroise D-H, Penicaud L, Arluison M, 2002. Expression of insulin-responsive glucose transporter GLUT4 mRNA in the rat brain and spinal cord: an in situ hybridization study. J. Chem. Neuroanat., 24, 4, 225-42.

Elias GM, Nicoll RA, 2007. Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins. Trends Cell Biol., 17, 7, 343-52.

Emmetsberger J, Mirrione MM, Zhou C, Fernandez-Monreal M, Siddiq MM, Ji K, Tsirka SE, 2010. Tissue plasminogen activator alters intracellular sequestration of zinc through interaction with the transporter ZIP4. J. Neurosci., 30, 19, 6538-47.

Enache D, Pereira JB, Jelic V, Winblad B, Nilsson P, Aarsland D, Bereczki E, 2020. Increased cerebrospinal fluid concentration of ZnT3 is associated with cognitive impairment in Alzheimer’s disease. J. Alzheimers Dis., Preprint, 1-13.

Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guénette S, 2003. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid β-protein, and the β-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100, 7, 4162-7.

Frazzini V, Granzotto A, Bomba M, Massetti N, Castelli V, d'Aurora M, Punzi M, Iorio M, Mosca A, Pizzi SD, 2018. The pharmacological perturbation of brain zinc impairs BDNF-related signaling and the cognitive performances of young mice. Sci. Rep., 8, 1, 1-12.

Frederickson C, Giblin L, Krężel A, McAdoo D, Muelle R, Zeng Y, Balaji R, Masalha R, Thompson R, Fierke C, 2006. Concentrations of extracellular free zinc (pZn) e in the central nervous system during simple anesthetization, ischemia and reperfusion. Exp. Neurol., 198, 2, 285-93.

Gammoh NZ, Rink L, 2017. Zinc in infection and inflammation. Nutrients, 9, 6, 624.

Gao C, Frausto SF, Guedea AL, Tronson NC, Jovasevic V, Leaderbrand K, Corcoran KA, Guzmán YF, Swanson GT, Radulovic J, 2011. IQGAP1 regulates NR2A signaling, spine density, and cognitive processes. J. Neurosci., 31, 23, 8533-42.

Gao C, Liu Y, Li L, Hölscher C, 2013. New animal models of Alzheimer's disease that display insulin desensitization in the brain. Rev. Neurosci., 24, 6, 607-15.

Giacconi R, Giuli C, Casoli T, Balietti M, Costarelli L, Provinciali M, Basso A, Piacenza F, Postacchini D, Galeazzi R, 2019. Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease influence Zinc and Copper homeostasis. J. Trace Elem. Med. Biol., 55, 58-63.

Gil V, Nicolas O, Mingorance A, Ureña JM, Tang BL, Hirata T, Sáez-Valero J, Ferrer I, Soriano E, del Río JA, 2006. Nogo-A expression in the human hippocampus in normal aging and in Alzheimer disease. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 65, 5, 433-44.

Gold PE, Newman LA, Scavuzzo CJ, Korol DL, 2013. Modulation of multiple memory systems: from neurotransmitters to metabolic substrates. Hippocampus, 23, 11, 1053-65.

González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL, 2014. Homeostasis of metals in the progression of Alzheimer's disease. Biometals, 27, 3, 539-49.

Grabrucker AM, Knight MJ, Proepper C, Bockmann J, Joubert M, Rowan M, Nienhaus GU, Garner CC, Bowie JU, Kreutz MR, 2011. Concerted action of zinc and ProSAP/Shank in synaptogenesis and synapse maturation. The EMBO journal, 30, 3, 569-81.

Grieb P, 2016. Intracerebroventricular streptozotocin injections as a model of Alzheimer's disease: in search of a relevant mechanism. Mol. Neurobiol., 53, 3, 1741-52.

Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, Johnston JA, Ravid R, Dockery P, O'Connor R, O'Neill C, 2005. Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. J. Neurochem., 93, 1, 105-17.

Grillo CA, Woodruff JL, Macht VA, Reagan LP, 2019. Insulin resistance and hippocampal dysfunction: Disentangling peripheral and brain causes from consequences. Exp. Neurol., 318, 71-7.

Grünblatt E, Salkovic−Petrisic M, Osmanovic J, Riederer P, Hoyer S, 2007. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. J. Neurochem., 101, 3, 757-70.

Guerinot ML, 2000. The ZIP family of metal transporters. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1465, 1-2, 190-8.

Harchegani AB, Dahan H, Tahmasbpour E, Shahriary A, 2018. Effects of zinc deficiency on impaired spermatogenesis and male infertility: the role of oxidative stress, inflammation and apoptosis. Human Fertility.

Hardy JA, Higgins GA, 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. Science, 256, 5054, 184-6.

Harward SC, Hedrick NG, Hall CE, Parra-Bueno P, Milner TA, Pan E, Laviv T, Hempstead BL, Yasuda R, McNamara JO, 2016. Autocrine BDNF–TrkB signalling within a single dendritic spine. Nature, 538, 7623, 99.

Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM, 2015. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. The Lancet Neurology, 14, 4, 388-405.

Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B, 2015. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. Nature Reviews Neuroscience, 16, 6, 358-72.

Herring BE, Nicoll RA, 2016. Long-term potentiation: from CaMKII to AMPA receptor trafficking. Annu. Rev. Physiol., 78, 351-65.

Herskovits AZ, Guarente L, 2014. SIRT1 in neurodevelopment and brain senescence. Neuron, 81, 3, 471-83.

Holmes B, Dohm GL, 2004. Regulation of GLUT4 gene expression during exercise. Med. Sci. Sports Exerc., 36, 7, 1202-6.

Hooper C, Killick R, Lovestone S, 2008. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. J. Neurochem., 104, 6, 1433-9.

Hoyer S, 1998. Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. J. Neural Transm., 105, 4, 415-22.

Huang C-C, Lee C-C, Hsu K-S, 2010. The role of insulin receptor signaling in synaptic plasticity and cognitive function. Chang Gung Med. J., 33, 2, 115-25.

Huang YZ, Pan E, Xiong Z-Q, McNamara JO, 2008. Zinc-mediated transactivation of TrkB potentiates the hippocampal mossy fiber-CA3 pyramid synapse. Neuron, 57, 4, 546-58.

Hwang JJ, Park M-H, Choi S-Y, Koh J-Y, 2005. Activation of the Trk signaling pathway by extracellular zinc: role of metalloproteinases. J. Biol. Chem., 280, 12, 11995-2001.

Iitsuka N, Hie M, Tsukamoto I, 2013. Zinc supplementation inhibits the increase in osteoclastogenesis and decrease in osteoblastogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats. Eur. J. Pharmacol., 714, 1-3, 41-7.

Ilouz R, Kaidanovich O, Gurwitz D, Eldar-Finkelman H, 2002. Inhibition of glycogen synthase kinase-3β by bivalent zinc ions: insight into the insulin-mimetic action of zinc. Biochem. Biophys. Res. Commun., 295, 1, 102-6.

Jarosz M, Olbert M, Wyszogrodzka G, Młyniec K, Librowski T, 2017. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF-κB signaling. Inflammopharmacology, 25, 1, 11-24.

Jaworski T, Banach-Kasper E, Gralec K, 2019. GSK-3β at the intersection of neuronal plasticity and neurodegeneration. Neural Plast., 2019.

Jedrychowski MP, Gartner CA, Gygi SP, Zhou L, Herz J, Kandror KV, Pilch PF, 2010. Proteomic analysis of GLUT4 storage vesicles reveals LRP1 to be an important vesicle component and target of insulin signaling. J. Biol. Chem., 285, 1, 104-14.

Julien C, Tremblay C, Emond V, Lebbadi M, Salem Jr N, Bennett DA, Calon F, 2009. Sirtuin 1 reduction parallels the accumulation of tau in Alzheimer disease. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 68, 1, 48-58.

Kay AR, 2003. Evidence for chelatable zinc in the extracellular space of the hippocampus, but little evidence for synaptic release of Zn. J. Neurosci., 23, 17, 6847-55.

Keller SR, 2004. Role of the insulin-regulated aminopeptidase IRAP in insulin action and diabetes. Biol. Pharm. Bull., 27, 6, 761-4.

Khan UA, Liu L, Provenzano FA, Berman DE, Profaci CP, Sloan R, Mayeux R, Duff KE, Small SA, 2014. Molecular drivers and cortical spread of lateral entorhinal cortex dysfunction in preclinical Alzheimer's disease. Nat. Neurosci., 17, 2, 304-11.

Kishi K, Hayashi H, Wang L, Kamohara S, Tamaoka K, Shimizu T, Ushikubi F, Narumiya S, Ebina Y, 1996. Gq-coupled receptors transmit the signal for GLUT4 translocation via an insulin-independent pathway. J. Biol. Chem., 271, 43, 26561-8.

Kogan S, Sood A, Garnick M, 2017. Zinc and Wound Healing: A Review of Zinc Physiology and Clinical Applications. Wounds: a compendium of clinical research and practice, 29, 4, 102-6.

Kosmidis S, Polyzos A, Harvey L, Youssef M, Denny CA, Dranovsky A, Kandel ER, 2018. RbAp48 protein is a critical component of GPR158/OCN signaling and ameliorates age-related memory loss. Cell Rep., 25, 4, 959-73. e6.

Kumar V, Kumar A, Singh K, Avasthi K, Kim J-J, 2021. Neurobiology of zinc and its role in neurogenesis. Eur. J. Nutr., 1-10.

Lattanzio F, Carboni L, Carretta D, Candeletti S, Romualdi P, 2016. Treatment with the neurotoxic Aβ (25–35) peptide modulates the expression of neuroprotective factors Pin1, Sirtuin 1, and brain-

derived neurotrophic factor in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Exp. Toxicol. Pathol., 68, 5, 271-6.

Lattanzio F, Carboni L, Carretta D, Rimondini R, Candeletti S, Romualdi P, 2014. Human apolipoprotein E4 modulates the expression of Pin1, Sirtuin 1, and Presenilin 1 in brain regions of targeted replacement apoE mice. Neuroscience, 256, 360-9.

Lauretti E, Dincer O, Praticò D, 2020. Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1867, 5, 118664.

Lee J-Y, Cole TB, Palmiter RD, Suh SW, Koh J-Y, 2002. Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99, 11, 7705-10.

Lee S, Tong M, Hang S, Deochand C, de la Monte S, 2013. CSF and brain indices of insulin resistance, oxidative stress and neuro-inflammation in early versus late Alzheimer's disease. Journal of Alzheimer's disease & Parkinsonism, 3, 128.

Lee SJ, Chung YH, Joo KM, Lim HC, Jeon GS, Kim D, Lee WB, Kim YS, Cha CI, 2006. Age-related changes in glycogen synthase kinase 3β (GSK3β) immunoreactivity in the central nervous system of rats. Neurosci. Lett., 409, 2, 134-9.

Lee SR, 2018. Critical role of zinc as either an antioxidant or a prooxidant in cellular systems. Oxid. Med. Cell. Longev., 2018.

Leloup C, Arluison M, Kassis N, Lepetit N, Cartier N, Ferré P, Pénicaud L, 1996. Discrete brain areas express the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. Molecular Brain Research, 38, 1, 45-53.

Leloup C, Magnan C, Benani A, Bonnet E, Alquier T, Offer G, Carriere A, Périquet A, Fernandez Y, Ktorza A, 2006. Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. Diabetes, 55, 7, 2084-90.

Leroy K, Boutajangout A, Authelet M, Woodgett JR, Anderton BH, Brion J-P, 2002. The active form of glycogen synthase kinase-3β is associated with granulovacuolar degeneration in neurons in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol., 103, 2, 91-9.

Leroy K, Brion J-P, 1999. Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3β in rat brain. J. Chem. Neuroanat., 16, 4, 279-93.

Leroy K, Menu R, Conreur J, Dayanandan R, Lovestone S, Anderton B, Brion JP, 2000. The function of the microtubule-associated protein tau is variably modulated by graded changes in glycogen synthase kinase-3β activity. FEBS Lett., 465, 1, 34-8.

Leroy K, Yilmaz Z, Brion JP, 2007. Increased level of active GSK−3β in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. Neuropathol. Appl. Neurobiol., 33, 1, 43-55.

Li D-D, Zhang W, Wang Z-Y, Zhao P, 2017. Serum copper, zinc, and iron levels in patients with Alzheimer's disease: a meta-analysis of case-control studies. Front. Aging Neurosci., 9, 300.

Li Y, Xu J, Xu P, Song S, Liu P, Chi T, Ji X, Jin G, Qiu S, Hou Y, 2016. Xanthoceras sorbifolia extracts ameliorate dendritic spine deficiency and cognitive decline via upregulation of BDNF expression in a rat model of Alzheimer's disease. Neurosci. Lett., 629, 208-14.

Liuzzi JP, Blanchard RK, Cousins RJ, 2001. Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. The Journal of nutrition, 131, 1, 46-52.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. Methods, 25, 4, 402-8.

Livingstone C, 2015. Zinc: physiology, deficiency, and parenteral nutrition. Nutr. Clin. Pract., 30, 3, 371-82.

Loef M, von Stillfried N, Walach H, 2012. Zinc diet and Alzheimer's disease: a systematic review. Nutr. Neurosci., 15, 5, 2-12.

Lu B, Zhang T, Yang F, 2021. "Bone" in the Brain? Osteocalcin-Expressing Neurons in Adult Hippocampus Promote Neurogenesis and Suppress Anxiety. Biol. Psychiatry, 89, 6, 539-40.

M de la Monte S, 2012. Brain insulin resistance and deficiency as therapeutic targets in Alzheimer's disease. Current Alzheimer Research, 9, 1, 35-66.

Maares M, Haase H, 2016. Zinc and immunity: An essential interrelation. Arch. Biochem. Biophys., 611, 58-65.

MacDonald RS, 2000. The role of zinc in growth and cell proliferation. The Journal of nutrition, 130, 5, 1500S-8S.

Mango D, Saidi A, Cisale GY, Feligioni M, Corbo M, Nisticò R, 2019. Targeting synaptic plasticity in experimental models of Alzheimer's disease. Front. Pharmacol., 10, 778.

Mantyh PW, Ghilardi JR, Rogers S, DeMaster E, Allen CJ, Stimson ER, Maggio JE, 1993. Aluminum, iron, and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of β−amyloid peptide. J. Neurochem., 61, 3, 1171-4.

Maret W, 2019. The redox biology of redox-inert zinc ions. Free Radic. Biol. Med., 134, 311-26.

Maret W, Sandstead HH, 2006. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. J. Trace Elem. Med. Biol., 20, 1, 3-18.

MARKS JL, PORTE JR D, STAHL WL, BASKIN DG, 1990. Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. Endocrinology, 127, 6, 3234-6.

Martin SA, DeMuth TM, Miller KN, Pugh TD, Polewski MA, Colman RJ, Eliceiri KW, Beasley TM, Johnson SC, Anderson RM, 2016. Regional metabolic heterogeneity of the hippocampus is nonuniformly impacted by age and caloric restriction. Aging Cell, 15, 1, 100-10.

McAllister BB, Dyck RH, 2017. Zinc transporter 3 (ZnT3) and vesicular zinc in central nervous system function. Neurosci. Biobehav. Rev., 80, 329-50.

McNay EC, Gold PE, 2001. Age-related differences in hippocampal extracellular fluid glucose concentration during behavioral testing and following systemic glucose administration. The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences, 56, 2, B66-B71.

McNay EC, Ong CT, McCrimmon RJ, Cresswell J, Bogan JS, Sherwin RS, 2010. Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. Neurobiol. Learn. Mem., 93, 4, 546-53.

McNay EC, Pearson-Leary J, 2020. GluT4: A central player in hippocampal memory and brain insulin resistance. Exp. Neurol., 323, 113076.

Mehri N, Haddadi R, Ganji M, Shahidi S, Asl SS, Azandariani MT, Ranjbar A, 2020. Effects of vitamin D in an animal model of Alzheimer's disease: behavioral assessment with biochemical investigation of Hippocampus and serum. Metab. Brain Dis., 35, 2, 263-74.

Michán S, Li Y, Chou MM-H, Parrella E, Ge H, Long JM, Allard JS, Lewis K, Miller M, Xu W, 2010. SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. J. Neurosci., 30, 29, 9695-707.

Mocchegiani E, Muzzioli M, 2000. Therapeutic application of zinc in human immunodeficiency virus against opportunistic infections. The Journal of nutrition, 130, 5, 1424S-31S.

Mocchegiani E, Romeo J, Malavolta M, Costarelli L, Giacconi R, Diaz L-E, Marcos A, 2013. Zinc: dietary intake and impact of supplementation on immune function in elderly. Age, 35, 3, 839-60.

Mosconi L, Sorbi S, De Leon MJ, Li Y, Nacmias B, Myoung PS, Tsui W, Ginestroni A, Bessi V, Fayyazz M, 2006. Hypometabolism exceeds atrophy in presymptomatic early-onset familial Alzheimer's disease. J. Nucl. Med., 47, 11, 1778-86.

Muhamed PK, Vadstrup S, 2014. Zinc is the most important trace element. Ugeskr. Laeger, 176, 5.

Myers S, D Shastri M, Adulcikas J, Singh Sohal S, Norouzi S, 2017. Zinc and gastrointestinal disorders: a role for the zinc transporters Zips and ZnTs. Curr. Pharm. Des., 23, 16, 2328-32.

Nakashima AS, Butt RH, Dyck RH, 2011. Alterations in protein and gene expression within the barrel cortices of ZnT3 knockout mice: experience-independent and dependent changes. Neurochem. Int., 59, 6, 860-70.

Nassar SZ, Badae NM, Issa YA, 2020. Effect of amylin on memory and central insulin resistance in a rat model of Alzheimer's disease. Arch. Physiol. Biochem., 126, 4, 326-34.

Neely CL, Lippi SL, Lanzirotti A, Flinn JM, 2019. Localization of free and bound metal species through X-Ray synchrotron fluorescence microscopy in the rodent brain and their relation to behavior. Brain sciences, 9, 4, 74.

Newman LA, Korol DL, Gold PE, 2011. Lactate produced by glycogenolysis in astrocytes regulates memory processing. PLoS One, 6, 12, e28427.

Nogueiras R, Habegger KM, Chaudhary N, Finan B, Banks AS, Dietrich MO, Horvath TL, Sinclair DA, Pfluger PT, Tschöp MH, 2012. Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. Physiol. Rev.

Novak V, Milberg W, Hao Y, Munshi M, Novak P, Galica A, Manor B, Roberson P, Craft S, Abduljalil A, 2014. Enhancement of vasoreactivity and cognition by intranasal insulin in type 2 diabetes. Diabetes Care, 37, 3, 751-9.

Nozaki C, Vergnano AM, Filliol D, Ouagazzal A-M, Le Goff A, Carvalho S, Reiss D, Gaveriaux-Ruff C, Neyton J, Paoletti P, 2011. Zinc alleviates pain through high-affinity binding to the NMDA receptor NR2A subunit. Nat. Neurosci., 14, 8, 1017-22.

O'Gorman J, Chiao P, Bussière T, von Rosenstiel P, Tian Y, Zhu Y, von Hehn C, Gheuens S, Skordos L, Chen T, 2017. Clinical Development of Aducanumab, an Anti-Aβ Human Monoclonal Antibody Being Investigated for the Treatment of Early Alzheimer's Disease. The journal of prevention of Alzheimer's disease, 4, 4, 255-63.

Odeh M, 1992. The role of zinc in acquired immunodeficiency syndrome. J. Intern. Med., 231, 5, 463-9.

Ogawa Y, Kawamura T, Shimada S, 2016. Zinc and skin biology. Arch. Biochem. Biophys., 611, 113-9.

Ojuka EO, Goyaram V, Smith JA, 2012. The role of CaMKII in regulating GLUT4 expression in skeletal muscle. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 303, 3, E322-E31.

Palmiter RD, Cole TB, Quaife CJ, Findley SD, 1996. ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93, 25, 14934-9.

Palmiter RD, Findley SD, 1995. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. The EMBO journal, 14, 4, 639-49.

Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung W-H, Hempstead BL, Lu B, 2004. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. Science, 306, 5695, 487-91.

Panja D, Bramham CR, 2014. BDNF mechanisms in late LTP formation: a synthesis and breakdown. Neuropharmacology, 76, 664-76.

Panza F, Lozupone M, Logroscino G, Imbimbo BP, 2019. A critical appraisal of amyloid-β-targeting therapies for Alzheimer disease. Nature Reviews Neurology, 15, 2, 73-88.

Paoletti P, Ascher P, Neyton J, 1997. High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1–NR2A receptors. J. Neurosci., 17, 15, 5711-25.

Patterson SL, Pittenger C, Morozov A, Martin KC, Scanlin H, Drake C, Kandel ER, 2001. Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. Neuron, 32, 1, 123-40.

Pearson-Leary J, Jahagirdar V, Sage J, McNay E, 2018. Insulin modulates hippocampally-mediated spatial working memory via glucose transporter-4. Behav. Brain Res., 338, 32-9.

Pearson-Leary J, McNay EC, 2012. Intrahippocampal administration of amyloid-β 1-42 oligomers acutely impairs spatial working memory, insulin signaling, and hippocampal metabolism. J. Alzheimers Dis., 30, 2, 413-22.

Peineau S, Taghibiglou C, Bradley C, Wong TP, Liu L, Lu J, Lo E, Wu D, Saule E, Bouschet T, 2007. LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3β. Neuron, 53, 5, 703-17.

Pfutzenreuter G, Nieradka K, Pincerati MR, da Silva IS, 2020. Intracerebroventricular streptozotocin induces behavioral impairments and increases short–term C3 gene expression in the hippocampus of Wistar rats. Acta Neurobiol Exp, 80, 160-71.

Phillips C, 2017. Brain-derived neurotrophic factor, depression, and physical activity: making the neuroplastic connection. Neural Plast., 2017.

Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM, Anderson L, Andreadis A, Wiederholt WC, Raskind M, Schellenberg GD, 1998. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. Ann. Neurol., 43, 6, 815-25.

Prakash A, Bharti K, Majeed ABA, 2015. Zinc: indications in brain disorders. Fundam. Clin. Pharmacol., 29, 2, 131-49.

Prasad AS, 2009. Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care, 12, 6, 646-52.

Qi Z, Liu KJ, 2019. The interaction of zinc and the blood-brain barrier under physiological and ischemic conditions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 364, 114-9.

Rafalo-Ulinska A, Piotrowska J, Kryczyk A, Opoka W, Sowa-Kucma M, Misztak P, Rajkowska G, Stockmeier CA, Datka W, Nowak G, 2016. Zinc transporters protein level in postmortem brain of depressed subjects and suicide victims. J. Psychiatr. Res., 83, 220-9.

Rajasekar N, Nath C, Hanif K, Shukla R, 2017. Intranasal insulin administration ameliorates streptozotocin (ICV)-induced insulin receptor dysfunction, neuroinflammation, amyloidogenesis, and memory impairment in rats. Mol. Neurobiol., 54, 8, 6507-22.

Rhea EM, Banks WA, 2019. Role of the blood-brain barrier in central nervous system insulin resistance. Front. Neurosci., 13, 521.

Rivera EJ, Goldin A, Fulmer N, Tavares R, Wands JR, de la Monte SM, 2005. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. J. Alzheimers Dis., 8, 3, 247-68.

Rizzi L, Roriz-Cruz M, 2018. Sirtuin 1 and Alzheimer's disease: an up-to-date review. Neuropeptides, 71, 54-60.

Salcedo I, Tweedie D, Li Y, Greig NH, 2012. Neuroprotective and neurotrophic actions of glucagon−like peptide−1: an emerging opportunity to treat neurodegenerative and cerebrovascular disorders. Br. J. Pharmacol., 166, 5, 1586-99.

Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Hoyer S, Riederer P, 2013. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer’s disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer’s research. J. Neural Transm., 120, 1, 233-52.

Salkovic-Petrisic M, Osmanovic-Barilar J, Brückner MK, Hoyer S, Arendt T, Riederer P, 2011. Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer’s disease: a long-term follow up study. J. Neural Transm., 118, 5, 765-72.

Savioz A, Leuba G, Vallet PG, 2014. A framework to understand the variations of PSD-95 expression in brain aging and in Alzheimer's disease. Ageing research reviews, 18, 86-94.

Schrag M, Mueller C, Oyoyo U, Smith MA, Kirsch WM, 2011. Iron, zinc and copper in the Alzheimer's disease brain: a quantitative meta-analysis. Some insight on the influence of citation bias on scientific opinion. Prog. Neurobiol., 94, 3, 296-306.

Schrick C, Fischer A, Srivastava DP, Tronson NC, Penzes P, Radulovic J, 2007. N-cadherin regulates cytoskeletally associated IQGAP1/ERK signaling and memory formation. Neuron, 55, 5, 786-98.

Selkoe DJ, Hardy J, 2016. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. EMBO Mol. Med., 8, 6, 595-608.

Sensi SL, Granzotto A, Siotto M, Squitti R, 2018. Copper and zinc dysregulation in Alzheimer’s disease. Trends Pharmacol. Sci., 39, 12, 1049-63.

Sensi SL, Paoletti P, Koh J-Y, Aizenman E, Bush AI, Hershfinkel M, 2011. The neurophysiology and pathology of brain zinc. J. Neurosci., 31, 45, 16076-85.

Sensi SL, Yin HZ, Weiss JH, 2000. AMPA/kainate receptor−triggered Zn2+ entry into cortical neurons induces mitochondrial Zn2+ uptake and persistent mitochondrial dysfunction. Eur. J. Neurosci., 12, 10, 3813-8.

Shiiki T, Ohtsuki S, Kurihara A, Naganuma H, Nishimura K, Tachikawa M, Hosoya K-i, Terasaki T, 2004. Brain insulin impairs amyloid-β (1-40) clearance from the brain. J. Neurosci., 24, 43, 9632-7.

Sindreu C, Palmiter RD, Storm DR, 2011. Zinc transporter ZnT-3 regulates presynaptic Erk1/2 signaling and hippocampus-dependent memory. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108, 8, 3366-70.

Singla N, Dhawan D, 2014. Zinc modulates aluminium-induced oxidative stress and cellular injury in rat brain. Metallomics, 6, 10, 1941-50.

Singla N, Dhawan D, 2017. Zinc improves cognitive and neuronal dysfunction during aluminium-induced neurodegeneration. Mol. Neurobiol., 54, 1, 406-22.

Skrajnowska D, Bobrowska-Korczak B, 2019. Role of zinc in immune system and anti-cancer defense mechanisms. Nutrients, 11, 10, 2273.

Solfrizzi V, Panza F, Frisardi V, Seripa D, Logroscino G, Imbimbo BP, Pilotto A, 2011. Diet and Alzheimer's disease risk factors or prevention: the current evidence. Expert Rev. Neurother., 11, 5, 677-708.

Song MK, Bischoff DS, Song AM, Uyemura K, Yamaguchi DT, 2017. Metabolic relationship between diabetes and Alzheimer's disease affected by Cyclo (His-Pro) plus zinc treatment. BBA clinical, 7, 41-54.

Steen E, Terry BM, J Rivera E, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, Xu XJ, Wands JR, de la Monte SM, 2005. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease–is this type 3 diabetes? J. Alzheimers Dis., 7, 1, 63-80.

Stefanidou M, Maravelias C, Dona A, Spiliopoulou C, 2006. Zinc: a multipurpose trace element. Arch. Toxicol., 80, 1, 1.

Sun D, Milibari L, Pan J-X, Ren X, Yao L-L, Zhao Y, Shen C, Chen W-B, Tang F-L, Lee D, 2021. Critical roles of embryonic born dorsal dentate granule neurons for activity-dependent increases in BDNF, adult hippocampal neurogenesis, and antianxiety-like behaviors. Biol. Psychiatry, 89, 6, 600-14.

Sun P, Yin J-B, Liu L-H, Guo J, Wang S-H, Qu C-H, Wang C-X, 2019. Protective role of Dihydromyricetin in Alzheimer's disease rat model associated with activating AMPK/SIRT1 signaling pathway. Biosci. Rep., 39, 1, BSR20180902.

Sun W, Miao X, Zhou S, Zhang L, Epstein PN, Mellen N, Zheng Y, Fu Y, Wang Y, Cai L, 2014. Zinc rescue of Akt2 gene deletion-linked murine cardiac dysfunction and pathological changes is metallothionein-dependent. J. Mol. Cell. Cardiol., 74, 88-97.

Suwa M, Yamamoto K, Nakano H, Sasaki H, Radak Z, Kumagai S, 2010. Brain-derived neurotrophic factor treatment increases the skeletal muscle glucose transporter 4 protein expression in mice. Physiol. Res., 59, 4, 619-23.

Takeda A, 2011. Zinc signaling in the hippocampus and its relation to pathogenesis of depression. Mol. Neurobiol., 44, 2, 166-74.

Takeda A, Fuke S, Ando M, Oku N, 2009. Positive modulation of long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses by low micromolar concentrations of zinc. Neuroscience, 158, 2, 585-91.

Talbot K, Wang H-Y, Kazi H, Han L-Y, Bakshi KP, Stucky A, Fuino RL, Kawaguchi KR, Samoyedny AJ, Wilson RS, 2012. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. The Journal of clinical investigation, 122, 4, 1316-38.

Tang BL, 2016. Sirt1 and the mitochondria. Mol. Cells, 39, 2, 87.

Tanila H, 2017. The role of BDNF in Alzheimer's disease.

Thambisetty M, Metter EJ, Yang A, Dolan H, Marano C, Zonderman AB, Troncoso JC, Zhou Y, Wong DF, Ferrucci L, 2013. Glucose intolerance, insulin resistance, and pathological features of Alzheimer disease in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. JAMA neurology, 70, 9, 1167-72.

Tiscione D, Gallelli L, Tamanini I, Luciani LG, Verze P, Palmieri A, Mirone V, Bartoletti R, Malossini G, Cai T, 2017. Daidzein plus isolase associated with zinc improves clinical symptoms and quality of life in patients with LUTS due to benign prostatic hyperplasia: Results from a phase I-II study. Archivio Italiano di Urologia e Andrologia, 89, 1, 12-6.

Toledo JB, Zetterberg H, Van Harten AC, Glodzik L, Martinez-Lage P, Bocchio-Chiavetto L, Rami L, Hansson O, Sperling R, Engelborghs S, 2015. Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarker in cognitively normal subjects. Brain, 138, 9, 2701-15.

Tong M, Dong M, de la Monte SM, 2009. Brain insulin-like growth factor and neurotrophin resistance in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies: potential role of manganese neurotoxicity. J. Alzheimers Dis., 16, 3, 585-99.

Toral-Rios D, Pichardo-Rojas PS, Alonso-Vanegas M, Campos-Peña V, 2020. GSK3β and tau protein in Alzheimer's Disease and epilepsy. Front. Cell. Neurosci., 14, 19.

Ugarte M, Osborne NN, 2014. Recent advances in the understanding of the role of zinc in ocular tissues. Metallomics, 6, 2, 189-200.

Vallee B, 1988. Zinc: biochemistry, physiology, toxicology and clinical pathology. BioFactors (Oxford, England), 1, 1, 31-6.

Vallee BL, Falchuk KH, 1993. The biochemical basis of zinc physiology. Physiol. Rev., 73, 1, 79-118.

van Zundert B, Yoshii A, Constantine-Paton M, 2004. Receptor compartmentalization and trafficking at glutamate synapses: a developmental proposal. Trends Neurosci., 27, 7, 428-37.

Ventriglia M, Brewer GJ, Simonelli I, Mariani S, Siotto M, Bucossi S, Squitti R, 2015. Zinc in Alzheimer's disease: a meta-analysis of serum, plasma, and cerebrospinal fluid studies. J. Alzheimers Dis., 46, 1, 75-87.

Verdile G, Keane KN, Cruzat VF, Medic S, Sabale M, Rowles J, Wijesekara N, Martins RN, Fraser PE, Newsholme P, 2015. Inflammation and oxidative stress: the molecular connectivity between insulin resistance, obesity, and Alzheimer's disease. Mediators Inflamm., 2015.

Wang J, Fivecoat H, Ho L, Pan Y, Ling E, Pasinetti GM, 2010. The role of Sirt1: at the crossroad between promotion of longevity and protection against Alzheimer's disease neuropathology. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 1804, 8, 1690-4.

Wang Y, Mandelkow E, 2016. Tau in physiology and pathology. Nature Reviews Neuroscience, 17, 1, 22-35.

Wang Z-X, Tan L, Wang H-F, Ma J, Liu J, Tan M-S, Sun J-H, Zhu X-C, Jiang T, Yu J-T, 2015. Serum iron, zinc, and copper levels in patients with Alzheimer's disease: a replication study and meta-analyses. J. Alzheimers Dis., 47, 3, 565-81.

Whitfield DR, Francis PT, Ballard C, Williams G, 2018. Associations between ZnT3, tau pathology, agitation, and delusions in dementia. Int. J. Geriatr. Psychiatry, 33, 8, 1146-52.

Whitfield DR, Vallortigara J, Alghamdi A, Howlett D, Hortobagyi T, Johnson M, Attems J, Newhouse S, Ballard C, Thomas AJ, O'Brien JT, Aarsland D, Francis PT, 2014. Assessment of ZnT3 and PSD95 protein levels in Lewy body dementias and Alzheimer's disease: association with cognitive impairment. Neurobiol. Aging, 35, 12, 2836-44.

Whitfield DR, Vallortigara J, Alghamdi A, Howlett D, Hortobágyi T, Johnson M, Attems J, Newhouse S, Ballard C, Thomas AJ, 2014. Assessment of ZnT3 and PSD95 protein levels in Lewy body dementias and Alzheimer's disease: association with cognitive impairment. Neurobiol. Aging, 35, 12, 2836-44.

Wohua Z, Weiming X, 2019. Glutaredoxin 2 (GRX2) deficiency exacerbates high fat diet (HFD)-induced insulin resistance, inflammation and mitochondrial dysfunction in brain injury: A mechanism involving GSK-3β. Biomed. Pharmacother., 118, 108940.

Woodgett JR, 1990. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase−3/factor A. The EMBO journal, 9, 8, 2431-8.

Wu Y, Lu H, Yang H, Li C, Sang Q, Liu X, Liu Y, Wang Y, Sun Z, 2016. Zinc stimulates glucose consumption by modulating the insulin signaling pathway in L6 myotubes: essential roles of Akt–GLUT4, GSK3β and mTOR–S6K1. J. Nutr. Biochem., 34, 126-35.

Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, Van Bronswijk W, Martins R, 2002. Alzheimer's β-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. J. Neurosci., 22, 10, RC221-RC.

Xu Y, Xiao G, Liu L, Lang M, 2019. Zinc transporters in Alzheimer's disease. Mol. Brain, 12, 1, 1-12.

Xu YQ, Sun ZQ, Wang YT, Xiao F, Chen MW, 2015. Function of Nogo−A/Nogo−A receptor in Alzheimer's disease. CNS Neurosci. Ther., 21, 6, 479-85.

Xu Z-P, Li L, Bao J, Wang Z-H, Zeng J, Liu E-J, Li X-G, Huang R-X, Gao D, Li M-Z, 2014. Magnesium protects cognitive functions and synaptic plasticity in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's model. PLoS One, 9, 9, e108645.

Yamazaki Y, Zhao N, Caulfield TR, Liu C-C, Bu G, 2019. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. Nature Reviews Neurology, 15, 9, 501-18.

Yang G, Pei Y-N, Shao S-J, Gao Y-S, Zhang S-J, Hu C, Feng S-N, Xue W-G, 2020. Effects of electroacupuncture at" Baihui" and" Yongquan" on the levels of synaptic plasticity related proteins postsynaptic density-95 and synaptophysin in hippocampus of APP/PS1 mice. Zhen ci yan jiu= Acupuncture research, 45, 4, 310-4.

Yang Y, Jing X-P, Zhang S-P, Gu R-X, Tang F-X, Wang X-L, Xiong Y, Qiu M, Sun X-Y, Ke D, 2013. High dose zinc supplementation induces hippocampal zinc deficiency and memory impairment with inhibition of BDNF signaling. PLoS One, 8, 1, e55384.

Yasutake C, Kuroda K, Yanagawa T, Okamura T, Yoneda H, 2006. Serum BDNF, TNF-α and IL-1β levels in dementia patients. Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci., 256, 7, 402-6.

Yoo MH, Kim T-Y, Yoon YH, Koh J-Y, 2016. Autism phenotypes in ZnT3 null mice: Involvement of zinc dyshomeostasis, MMP-9 activation and BDNF upregulation. Sci. Rep., 6, 1, 1-15.

Zastrow ML, Pecoraro VL, 2014. Designing hydrolytic zinc metalloenzymes. Biochemistry, 53, 6, 957-78.

Zhang L-H, Wang X, Zheng Z-H, Ren H, Stoltenberg M, Danscher G, Huang L, Rong M, Wang Z-Y, 2010. Altered expression and distribution of zinc transporters in APP/PS1 transgenic mouse brain. Neurobiol. Aging, 31, 1, 74-87.

Zhang S-Q, Zhang H-B, Cheng Q, Zhu Y-M, Xia C-H, Zhu Y-H, Zhang Y, 2019. Zinc-enriched yeast improves learning and memory impairments in zinc-deficient rats. Biol. Trace Elem. Res., 189, 1, 180-5.

Zhang Y, Huang N-q, Yan F, Jin H, Zhou S-y, Shi J-s, Jin F, 2018. Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: GSK-3β as a potential link. Behav. Brain Res., 339, 57-65.

Zhao W-Q, Chen H, Quon MJ, Alkon DL, 2004. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. Eur. J. Pharmacol., 490, 1-3, 71-81.

Zhao Z-H, Du K-J, Wang T, Wang J-Y, Cao Z-P, Chen X-M, Song H, Zheng G, Shen X-F, 2021. Maternal Lead Exposure Impairs Offspring Learning and Memory via Decreased GLUT4 Membrane Translocation. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 9, 374.

EK-B: Turnitin Raporu

SIÇANLARDA ICV-STZ İLE İNDÜKLENEN SPORADİK ALZHEİMER-BENZERİ HASTALIKTA ÇİNKO DURUMUNUN SPASYAL BELLEK, HİPOKAMPAL SİNAPTİK PLASTİSİTE VE İNSÜLİN SİNYALİ ÜZERİNE ETKİSİ

Yazar Saltuk Buğra Baltaci

Gönderim Tarihi: 04-Eki-2021 01:23PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1664833103
Dosya adı: SI_ANLARDA_ICV.docx (4.41M)
Kelime sayısı: 11965
Karakter sayısı: 82805

SIÇANLARDA ICV-STZ İLE İNDÜKLENEN SPORADİK ALZHEİMER-BENZERİ HASTALIKTA ÇİNKO DURUMUNUN SPASYAL BELLEK, HİPOKAMPAL SİNAPTİK PLASTİSİTE VE İNSÜLİN SİNYALİ ÜZERİNE ETKİSİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%5	%4	%1	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	burkonturizm.com İnternet Kaynağı	%2
2	9lib.net İnternet Kaynağı	<%1
3	abakus.inonu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
4	www.maxigal.com İnternet Kaynağı	<%1
5	openaccess.inonu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
6	www.acarindex.com İnternet Kaynağı	<%1
7	Emanuele Brai, Noemi Alina Raio, Lavinia Alberi. "Notch1 hallmarks fibrillary depositions in sporadic Alzheimer's disease", Acta Neuropathologica Communications, 2016	<%1