

İletişim / Correspondence:

¹Dr. Öğr. Gör. / Lecturer
Yeditepe Üniversitesi,
basak.aru@yeditepe.edu.tr
ORCID: 0000-0002-2987-0523

²Acıbadem Üniversitesi,
ahmet.develioğlu@live.aciba
dem.edu.tr

³Yeditepe Üniversitesi,
gizembgurel@gmail.com
ORCID: 0000-0002-4073-3343

⁴Prof. Dr. / Prof.
Yeditepe Üniversitesi,
gulderen.ydemirel@yeditepe.
edu.tr
ORCID: 0000-0001-5775-491X

Geliş Tarihi: 07.12.2022

Kabul Tarihi: 03.04.2023

Received Date: 07.12.2022

Accepted Date: 03.04.2023

Anahtar Kelimeler:

Alzheimer hastalığı, deneysel
hayvan modelleri, hücre
kültürü

Keywords:

Alzheimer's disease,
experimental animal models,
cell culture

DOI:

10.54537/tusebdergisi.
1213712

Alzheimer Hastalığı'nda In Vivo ve In Vitro Modeller

Başak Aru¹, Ahmet Develioğlu², Gizem Gürel³,
Gülderen Yanıkkaya Demirel⁴

Özet

Alzheimer Hastalığı (AH), amiloid beta plaklarının ve hücre içinde hiperfosforile mikrotübül ilişkili proteinin birikimi sonucu meydana gelen nörofibriler yumaklar ile karakterize olan geri dönüşsüz bir nörodejeneratif hastalıktır. AH patolojisinin anlaşılması ve yeni terapötik yöntemlerin geliştirilmesinde deneysel AH modelleri kritik önem taşırlar. Ancak çalışmalar, temel araştırmalar sonucu elde edilen verilerin klinik çalışmalarda oldukça düşük oranda başarı gösterdiğini ifade etmektedir. Dolayısıyla literatürde bulunan modellerin güçlü ve zayıf yanlarının değerlendirilmesinin ve çalışmaların hastalığın farklı yönlerini kapsayıcı modellerle gerçekleştirilmesinin potansiyel tedavilerin başarılarını artıracakları öngörülmektedir. Bu makalede, farklı in vivo ve in vitro AH modellerinin patolojik ve moleküler özellikleri ele alınmış ve bu bağlamda geleneksel olarak kullanımda olan transgenik hayvan modelleri ile kanser hücrelerinin nöral farklılaşmalarına dayalı yöntemlere ek olarak güncel hücre kültürü çalışmalarının odak noktaları olan indüklenebilir kök hücre kökenli organoid yapıları ve nöral öncül hücre kaynaklı AH modelleri karşılaştırılmıştır.

In Vivo and In Vitro Models in Alzheimer's Disease

Abstract

Alzheimer's Disease (AD) is an irreversible neurodegenerative disease characterized by neurofibrillary tangles resulting from the accumulation of amyloid beta plaques and hyper-phosphorylated microtubule-associated protein in the cell. Experimental models of AD are critical to understanding AD pathology and the development of new therapeutic modalities. However, studies indicate that the data obtained from basic research contribute to clinical studies with very low success rate. Therefore, it is predicted that evaluating the strengths and weaknesses of the models in the literature and carrying out studies with models that cover different aspects of the disease will increase the success of potential treatments. In this review article, pathological and molecular features of different in vivo and in vitro AD models are discussed. In this context, in addition to traditionally used transgenic animal models and methods based on neural differentiation of cancer cells, induced stem cell-derived organoid structures and neural progenitor cell-derived AD models, which are the focus of current cell culture studies, were compared.

1. Alzheimer Hastalığına Genel Bakış

Yirminci yüzyıl başında gelişmiş ülkelerde ortalama 47 yıl olan insan ömrü, 21. yüzyıl başında 77,8 yıla yükselmiştir, ancak biyolojik yaşlanma tüm organizmaların geri dönüşsüz ve kaçınılmaz kaderidir (Ramalingam, Kim, Lee ve Lee, 2018). İnsan ömrünün uzamasının sonucunda prematüre ölümlerin oranında meydana gelen azalmaya karşılık nörodejeneratif hastalıkların da dahil olduğu yaşlanma ilişkili kronik hastalıklarda artış görülmektedir. Biyolojik sistemlerde yaşlanma oldukça karmaşık bir süreçtir ve beyin yapısı ile fonksiyonlarında belirgin farklılıklara yol açar. Yaşla ilişkili nörodejeneratif hastalıklar gittikçe büyüyen sosyoekonomik bir problemdir ve tüm dünyada yaşam kalitesinde azalmaya yol açmaktadır (Hou ve diğ., 2019; Karadakovan, 2005).

Demans, bilişsel yeteneklerin bireyin günlük hayatın gereksinimlerini yerine getirmesine engel olacak derecede zayıflamasını ifade eden genel bir terimdir (Kumar, Sidhu, Goyal ve Tsao, 2022). AH, demansın en yaygın sebebidir ve 65 yaş üzeri bireylerde tüm demans vakalarının en az 2/3'ünden sorumludur. Hastalık Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) tüm yetişkinler arasında en yaygın altıncı, 65 yaş üzeri bireylerde en yaygın beşinci ölüm nedenidir. Bu durum AH'yi yaşa bağlı en yaygın nörolojik hastalıklardan biri konumuna getirmektedir (Wong, 2020). Hastalık, geri dönüşsüz olup normal yaşlılık süresince hafıza kaybı ve bilişsel bozuklukların izlendiği progresif nöronal dejenerasyona yol açar (Ramalingam ve diğ., 2018). Hastalığın erken evrelerinde hafif bilişsel bozukluklar görülmekle birlikte hastalığın ilerlemesi sonucu hafıza kaybına ek olarak diğer bilişsel becerilerde de bozulmalar izlenmektedir. Geç evrelerde hastaların kişiliklerinde değişimler görülmektedir ve hastaların vücut fonksiyonlarını yerine getiremedikleri bilinmektedir (Association, 2021). Günümüzde yalnızca ABD'de 65 yaş ve üstü 6,2 milyon birey AH tanısı taşımaktadır. Hastalığın gelişimini yavaşlatan veya hastalığı tedavi eden bir

gelişme olmadığı senaryoda bu sayının 2060 yılına kadar 13,8 milyona ulaşması beklenmektedir. Yine 2021 yılında Türkiye İstatistik Kurumu tarafından yayımlanan raporda ise ülkemizde AH sebebiyle hayatını kaybeden bireylerin sayısının 2015 yılında 12 bin 59 iken 2019 yılında 13 bin 498'e yükseldiği belirtilmiştir (TÜİK, 2021).

Hastalık hastanın yaşına göre erken başlangıçlı AH ve geç başlangıçlı AH olmak üzere iki alt tipe ayrılır. Erken başlangıçlı AH, tüm vakaların yaklaşık %1 ila %6'sını oluşturur. Bu bireylerde hastalığın başlangıç yaşı 30 ila 60-65 yaş arasında değişir. AH'nin en yaygın şekli olan geç başlangıçlı AH, 60-65 yaşından sonra tanı koyulan vakaları kapsar. Pozitif aile öyküsü olan kişilerde hem erken başlangıçlı AH hem de geç başlangıçlı AH izlenebilir. Erken başlangıçlı AH vakalarının yaklaşık %60'ının ailelerinde birden fazla AH vakası vardır; ailesel erken başlangıçlı AH vakalarının ise %13'ü otozomal baskın geçiş gösterir ve en az üç nesli etkiler (Bekris, Yu, Bird ve Tsuang, 2010). Günümüzde AH gelişimine katkı sağladığı bilinen çok sayıda gen mevcuttur. Ancak ailesel AH, kalıtsal (yüksek penetrasyonlu, otozomal baskın) bir AH alt grubunu tanımakla birlikte tüm AH vakalarının %1'inden daha azını meydana getirirken hastaların %90'dan fazlasının geç başlangıçlı AH gözlenen sporadik vakalar olduğu belirtilmektedir (Bertram ve Tanzi, 2004; Selkoe ve Hardy, 2016). Dahası, farklı çalışmalar tarafından yalnızca apolipoprotein E (APOE) geni sporadik geç başlangıçlı AH için risk faktörü olarak ifade edilmekle birlikte riskli aleli ($\epsilon 4$) taşıyan pek çok bireyin 90'lı yaşlara dek yaşıyor oluşu, farklı genetik ve/veya çevresel risk faktörlerinin varlığına işaret etmektedir.

AH senil plakları meydana getiren çözünemeyen β amiloid peptit ($A\beta$) birikimi ve hiper-fosforile tübülün ilişkili birim (tau) yumaklarının (neurofibrillary tangles - NFT) yapıları ile karakterizedir. Hastalığın patolojik belirteçlerinin hem ailesel hem de sporadik formlarında ortak olması nedeniyle bu mutasyonlara yönelik araştırmalar, tüm AH

formlarında hastalığın temel mekanizmalarının aydınlatılabilmesi açısından önem taşımaktadır (Arber ve diğ., 2020). Hastalık ilişkili patolojik değişimler, hastalığın temel belirtisi olan hafıza kaybından yıllar önce başlar ve nöronal yitim, tanı anında geri çevrilemez düzeye ulaşmış olur. Bu nedenle daha etkili tedavilerin geliştirilebilmesi için AH'nin patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması gereklidir (Li, Bao ve Wang, 2016).

2. Alzheimer Hastalığının Gelişimine Dair Hipotezler

Alzheimer Hastalığı kompleks, multifaktöriyel bir hastalıktır ve elde edilmiş veriler hastalığın insanlara özgü olduğunu belirtmektedir. Hastalar arasında tanının koyulduğu yaş ile hastalığın ilerleyiş hızı yüksek derecede varyasyon göstermektedir. Hastalığa yol açan çeşitli çevresel ve genetik faktörler bilinmekle beraber bu risk faktörleri arasındaki ilişkiler ile hastalık etiyojisine katkılarının aydınlatılmasına yönelik araştırmalar devam etmektedir (Drummond ve Wisniewski, 2017).

2.1. Amiloid Hipotezi

Amiloid kaskadı hipotezi veya A β hipotezi olarak da bilinen amiloid hipotezi, AH'nin patogenezinde en bilinen mekanizmadır (Kametani ve Hasegawa, 2018). Amiloid öncül proteini (APP), amiloidojenik yolakta β -bölgesi APP bölünme enzimi (BACE) ve γ -sekretaz enzimleri tarafından parçalanarak 695 amino asitlik bir membran proteinidir. APP'nin değişken bölgelerindeki γ -sekretaz aracılı bölünmeler sonucunda, beyinde en yaygın formları olan iki farklı uzunluktaki peptit A β 40 ve A β 42 oluşur (Ricciarelli ve Fedele, 2017). Amiloid hipotezine göre yaş veya patolojik koşullar, APP'den β - ve γ -sekretaz tarafından üretilen A β 'nin yıkımını azaltarak A β peptitlerinin (A β 40 ve A β 42) birikmesi ile sonuçlanır (Breijyeh ve Karaman, 2020). A β 42/A β 40 artışı, nörotoksite ve tau patolojisine neden olan A β amiloid fibrillerinin oluşumu sonucu nöronal hücre ölümü ve

nörodejenerasyona yol açar (Breijyeh ve Karaman, 2020).

2.2. Tau-ilişkili Hipotez

Tau, esas olarak aksonca zengin nöronlarda bulunan, bir iskele proteini (Du, Wang ve Geng, 2018; Li ve Götz, 2017) olarak görev yapan ve tübülün grup stabilitesini düzenleyen (Kametani ve Hasegawa, 2018), mikrotübül ile ilişkili bir proteindir. Patolojik koşullarda tau birikimi aksonal iletime engel olarak nörodejenerasyon ile sonuçlanır (Du, Wang ve Geng, 2018). Translasyon sonrası süreçte tau; fosforilasyon, arginin monometilasyonu, lizin asetilasyonu, lizin monometilasyonu, lizin dimetilasyonu ve lizin übikitinasyonu dahil olmak üzere birçok modifikasyona uğrar (Morris ve diğ., 2015). Tau'nun hiper-fosforilasyonu, NFT'lerin ana bileşeni olan eşleştirilmiş sarmal filamentlerin (paired helix filaments - PHF) oluşumuna yol açar (Harris, 2012). Tau patolojisi Braak evrelemesi ile değerlendirilir: NFT'ler transentorhinal bölgede başlar (evre I ve II), limbik bölgeye ilerler (evre III ve IV) ve neokortikal bölgelere (evre V ve IV) yayılır. Tau patolojisinin yayılımı, bilişsel ve klinik semptomlarla korelasyon gösterir (Kametani ve Hasegawa, 2018).

2.3. Kolinerjik Hipotez

Asetilkolin (ACh) korteks, bazal ganglionlar ve bazal ön beyin boyunca aktif olan bir nörotransmitterdir ve hem merkezi hem de periferel sinir sisteminde görevlidir (Ferreira-Vieira, Guimaraes, Silva ve Ribeiro, 2016; Hampel ve diğ., 2018; Mesulam, 2013). Kolinerjik hipoteze göre, AH'de kolinerjik fonksiyondaki bozulma, özellikle neokorteks ve hipokampus gibi öğrenme, hafıza, davranış ve duygusal reaksiyonlarla ilgili beyin alanlarında çok önemlidir (Mesulam, 2013).

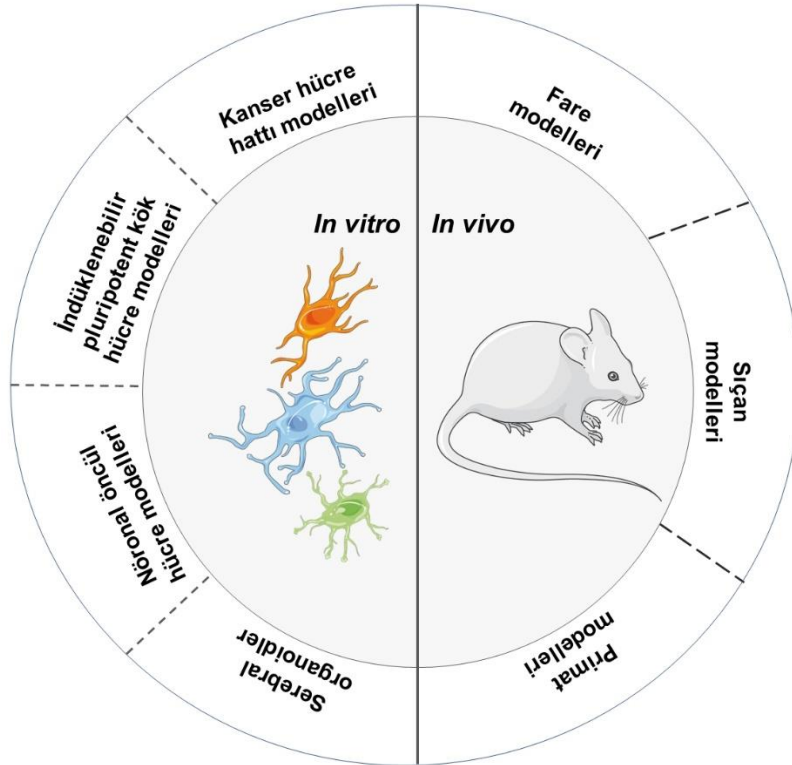
Alzheimer Hastalığında en belirgin klinik bulgu, nöronlar arasında elektriksel uyarıların iletilmesinden sorumlu bir nörotransmitter olan ACh seviyelerinin, asetilkolinesteraz enzimi (AChE) tarafından hızlı hidrolizi nedeniyle azalmasıyla

ortaya çıkan beyin atrofisidir (Anand ve Singh, 2013). AH'de kolinerjik nöronların dejenerasyonunun bilişsel işlevlerde ve hafıza kaybında değişikliklere yol açtığı ifade edilmektedir (Ferreira-Vieira ve diğ., 2016).

3. Deneysel Alzheimer Hastalığı Modelleri

Deneysel AH modelleri, hastalığın patolojisinin aydınlatılması ve yeni geliştirilen tedavilerin klinik öncesi çalışmalarının gerçekleştirilmesi aşamalarında yüksek önem taşımaktadır. Günümüzde amiloid plak ve NFT yapılarını oluşturmaları amacıyla geliştirilen transgenik fare modelleri, kullanımda olan en yaygın modeller olup 1995 yılında geliştirilen ilk AH fare modelinden bu yana, her biri hastalığın farklı özelliklerini yansıtan çok sayıda farklı transgenik

soy üretilmiştir (Games ve diğ., 1995). Ancak bu klinik öncesi modellerin kullanıldığı çalışmalara dayalı klinik çalışmaların yüksek oranda başarısız olmaları (~%99,6) kullanımda olan modellerin geçerliliklerinin sorgulanmasına yol açmıştır (Cummings, Morstorf ve Zhong, 2014; Schneider ve diğ., 2014). Araştırmacılar gelişen hücre kültürü yöntemleri ile insan dokularından elde edilen indüklenabilir pluripotent kök hücrelerin ya da nöral öncül hücrelerin kullanıldığı deneysel modellerin türler arası farklılıkların yol açtığı tutarsız sonuçları engelleyebileceğini ifade etmektedir. Zira bu hücrelerin kullanımları, yetişkin insan hücresi tabanlı deneysel modellerin geliştirilmesi önündeki temel engel olan post-mortem beyin dokularına olan ihtiyacı ortadan kaldırmaktadır (Yang, Li, He, Cheng ve Le, 2016). Günümüzde kullanımda olan in vitro ve in vivo AH modelleri Şekil 1'de özetlenmiştir.



Şekil 1. Literatürde mevcut in vitro ve in vivo AH modellerine genel bakış. AH: Alzheimer Hastalığı

3.1. In Vivo Modeller

İnsanlarda özellikle presemptomatik seviyede AH ilişkili patolojik değişimlerin simüle

edilmesinde hayvan modelleri sıklıkla kullanılır (Li ve diğ., 2016). Çalışmalarda bakımları ve manipülasyonlarının kolaylığı sebebiyle fareler sıklıkla tercih edilir. İlk ve en yaygın tercih edilen

fare AH modelleri, insan APP transgenini ifade etmek üzere üretilmiştir ve erken çalışmalar bu farelerde A β birikimi ile davranışsal özellikleri yansıttıklarını, ancak senil plaklara sahip olmadıklarını göstermiştir. Bu durum, bilişsel

bozuklukların plak formasyonundan bağımsız, A β fibril formasyonu ile ilişkili olduğunu gösterir niteliktedir. Günümüzde yaygın olarak kullanılan in vivo AH modellerinin avantajları ve dezavantajları bu bölümde detaylandırılmaktadır.

Tablo 1. In vivo AH modellerinin avantaj ve dezavantajları

Model organizma	Avantajlar	Dezavantajlar
<i>C. Elegans</i>	<ul style="list-style-type: none"> Çoğalma ve gelişmeleri diğer <i>in vivo</i> modellere nazaran oldukça hızlıdır. Genetik manipülasyon uygulamaları oldukça kolaydır. Organizma canlı görüntüleme için uygundur. Pek çok hücrel sinyal yolağı insanlar ile homoloji göstermektedir. Kullanımları önünde etik engeller bulunmaz. 	<ul style="list-style-type: none"> AH patolojisinden sorumlu genlerin ortologları genellikle hastalık gelişiminde yüksek önem taşıyan bölgelere sahip değildir. İnsan APP, Aβ ve/veya Tau transgenlerini ifade etmedikleri sürece çalışmalarda kullanılamaz. Modellerin ilaç tarama çalışmaları için kullanımları uygun olsa da elde edilen sonuçların omurgalı hayvan modelleri ile doğrulanması önerilir.
Meyve sineği (<i>Drosophila melanogaster</i>)	<ul style="list-style-type: none"> Çoğalma ve gelişmeleri diğer <i>in vivo</i> modellere nazaran oldukça hızlıdır. Genetik manipülasyon uygulamaları oldukça kolaydır. Organizma canlı görüntüleme için uygundur. Pek çok hücrel sinyal yolağı insanlar ile homoloji göstermektedir. Kullanımları önünde etik engeller bulunmaz. 	<ul style="list-style-type: none"> AH patolojisinden sorumlu genlerin ortologları genellikle hastalık gelişiminde yüksek önem taşıyan bölgelere sahip değildir. İnsan APP, Aβ ve/veya tau transgenlerini ifade etmedikleri sürece çalışmalarda kullanılamaz. Modellerin ilaç tarama çalışmaları için kullanımları uygun olsa da elde edilen sonuçların omurgalı hayvan modelleri ile doğrulanması önerilir.
Zebra balığı (<i>Danio rerio</i> - Zebrafish)	<ul style="list-style-type: none"> Çoğalma ve gelişmeleri diğer <i>in vivo</i> modellere nazaran oldukça hızlıdır. Genetik manipülasyon uygulamaları oldukça kolaydır. Pek çok hücrel sinyal yolağı insanlar ile homoloji göstermektedir. Organizma canlı görüntüleme için uygundur. Kullanımları önünde etik engeller bulunmaz. Omurgalı canlılar oldukları için merkezi sinir sistemine yönelik modellemelerde <i>C. elegans</i> ve zebra balığı modellerine göre avantajlıdır. 	<ul style="list-style-type: none"> Özellikle ilaç tarama çalışmalarında ilacın solungaçlar ve deri yolu ile emilimi, balığın tüm vücudu su ile temas halinde olduğundan rastlantısalıdır. Modellerin ilaç tarama çalışmaları için kullanımları uygun olsa da elde edilen sonuçların omurgalı hayvan modelleri ile doğrulanması önerilir.
Fare	<ul style="list-style-type: none"> Literatürde çok yaygın olarak kullanılmakta olup çok sayıda farklı fare AH modeli mevcuttur. 	<ul style="list-style-type: none"> Canlı görüntüleme için uygun değildir. Tau patolojisi nadirdir.

	<ul style="list-style-type: none"> Davranış testlerin uygulanabilmesi, AH modellerinde plak oluşumu öncesinde meydana gelen kognitif değişimlerin analizine olanak tanır. Yaşlı hayvanlar, AH araştırmalarında kullanım potansiyeli taşır. 	<ul style="list-style-type: none"> Sıçan ve primatlara kıyasla davranış biçimleri sınırlıdır. AH olgularında izlenen inflamasyon, fare modellerinde henüz karakterize edilememiştir.
Sıçan	<ul style="list-style-type: none"> Yaşlı hayvanlar, AH araştırmalarında kullanım potansiyeli taşır. Farelere nazaran fizyolojik, morfolojik ve genetik özellikler bakımından insanlara daha yakındır. Davranış testlerin uygulanabilmesi, AH modellerinde plak oluşumu öncesinde meydana gelen kognitif değişimlerin analizine olanak tanır. Bu bağlamda davranış fenotipleri, farelere kıyasla kompleks davranışsal testlere imkan tanır. 	<ul style="list-style-type: none"> Canlı görüntüleme için uygun değildir. Literatürde görece daha az model tanımlı olması sebebiyle daha kapsamlı karakterizasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır.
Primat	<ul style="list-style-type: none"> Yaşlı hayvanlar, AH araştırmalarında kullanım potansiyeli taşır. Primat aβ proteini, insan ile %100 sekans homolojisine sahiptir. Metabolizma ve bağışıklık sistemleri kemirgenlere nazaran insanlara daha benzerdir. 	<ul style="list-style-type: none"> Canlı görüntüleme için uygun değildir. Tau patolojisi nadirdir. Yaygın kullanımları önünde etik ve mali engeller mevcuttur.

Aβ: Amiloid beta, APP: amiloid prekürsör protein, *C. elegans*: *Caenorhabditis elegans*

3.1.1. Fare Modelleri

Transgenik farelerde yapılan çalışmalar, amiloid plakların dinamik özelliklerini ve hastalık gelişiminde etkili, beyindeki çeşitli yapıtaşları ile etkileşecek ve plak oluşturacak Aβ agregatlarının meydana gelişinde rol oynayan Aβ peptidini aydınlatmaya yardımcı olmaktadır (LaFerla ve Green, 2012). Fare AH modelleri, literatürde en sık kullanılan in vivo modeller olup günümüzde 200'e yakın transgenik AH fare soyu mevcuttur. Transgenik AH fare modellerinde amiloid plak oluşumu insanlarda olduğu gibi yaşa bağlı olarak gelişmektedir ancak süreç insanlara kıyasla daha hızlıdır. Çoğu transgenik AH modelinde amiloid plakların oluşumu öncesinde bilişsel problemler ve hafıza bozuklukları izlenmektedir. Bu gözlemler bilişsel sorunlara aracılık edebilecek

patolojik Aβ türlerinin araştırılmasını sağlamış, bu doğrultuda araştırmalar plak yapısının öncüllerine ve Aβ birikiminin toksisitesine odaklanmıştır. İnsanlardaki gibi transgenik AH fare modellerinde de bilişsel bozulmalar direkt olarak Aβ plak yükü ile korelasyon göstermemektedir. Ancak fare modellerinin aksine insanlarda, beyinde yüksek miktarda Aβ birikimi göstermeden bilişsel bozulmalar izlenmez (LaFerla ve Green, 2012).

İnsanlarda AH'nin bir diğer ayırt edici özelliği NFT birikimidir. Amiloid kaskadı hipotezi, tau hiper-fosforilasyonunun Aβ birikiminin bir sonucu olarak meydana geldiğini ifade eder fakat yüksek seviyede APP ifadesine sahip transgenik farelerle yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, bu konuda çelişkili sonuçlar vermiştir, zira APP

transgenik hayvanlarda tau hiper-fosforilasyonu izlense de nadiren NFT oluşumu ve nöronal kayıp görülür. Bu durumun sebepleri arasında insan A β birikiminin NFT oluşumuna yol açmak için yeterli olmaması; kemirgenlerde tau proteininin yapı ve dizi itibarıyla agregat oluşumuna meyilli olmaması; insanlarda 10 yıllara varan bir süreçte gelişen bu yapıların farelerin görece kısa ömürleri süresince oluşmaması ya da tüm bu nedenlerin kümülatif etkisi sayılabilir (LaFerla ve Green, 2012).

Araştırmacılar, insanlarda görülen NFT yapılarını modellemek amacıyla APP mutasyonlarına ek olarak mutant insan tau proteini ifade eden ya da bu patolojiyi yansıtmaması amacıyla nitrik oksit sentaz genine sahip olmayan transgenik fare soyları geliştirmiştir. Bu multigenik AH modelleri insan beyninde görülenlere benzer NFT yapıları geliştirerek A β ile tau arasındaki ilişkinin açıklanmasına yardımcı olmuş, A β ya da tau manipülasyonlarının diğer genlerin ve protein ürünlerinin ifadelerini nasıl etkilediklerini araştırmaya imkân sağlamıştır. A β agregasyonu ile bu agregasyonun sonucu olan tau patolojisi arasındaki bağlantılardan birisi AH'de görülen inflamasyondur, fakat hastalıkta izlenen inflamasyon henüz farelerde tam olarak modellenenmiş değildir. Bunun nedeni insanlar ve hayvan modelleri arasında inflamasyonun doğası ve şiddeti bağlamında önemli farklılıklar bulunmasıdır. Yine de fare modellerinden elde edilen veriler, inflamasyonun A β agregasyonunun, özellikle de fibriler A β 'nın bir sonucu olarak meydana geldiğini, sürecin reaktif oksijen türevlerinin (ROS) oluşumlarına yol açtığını, tüm bunların sonucu olarak kompleman sistem aktivasyonu ve inflamatuvar sitokinlerin salımının tau patolojisine katkı sağladığına işaret etmektedir (LaFerla ve Green, 2012).

Yaşlılıkta hafıza kaybı genellikle tüm in vivo modellerde ortak özelliktir (Li ve diğ., 2016). Bu nedenle yaşlı hayvanlar da potansiyel demans modelleri olarak kullanılabilir. Yaşlılıkta kemirgenlerden insan olmayan primatlara kadar çeşitli hayvanların spontane AH nöropatolojisi geliştirdiği ve ardından hastalarda gözlenenlere benzer bilişsel bozulmalar tespit edildiği belirtilmektedir. Bu hayvan modelleri non-invaziv doğaları ve herhangi bir nörokimyasal manipülasyon gerektirmemeleri nedeniyle hastalığın doğal patofizyolojisini aydınlatma amaçlı kullanılacak değerli araçlardır (Li ve diğ., 2016).

3.1.2. Sıçan modelleri

Fare modellerine kıyasla sayıca daha az da olsa literatürde çeşitli sıçan modelleri de raporlanmıştır (Drummond ve Wisniewski, 2017). Sıçan modellerinin kullanımı farelere nazaran fizyolojik, morfolojik ve genetik özellikler bakımından insanlara daha yakın olmaları, beyinlerinin daha büyük olması nedeniyle beyin omurilik sıvısı (BOS) toplaması, elektrofizyolojik deneyler ve görüntülemenin kolaylığı ve daha kompleks davranışsal testlere imkan tanıyan zengin davranış fenotipleri sebebiyle daha avantajlıdır (Do Carmo ve Cuello, 2013). Transgenik sıçan modellerinin fenotipleri transgenik farelerle oldukça benzerdir; her iki grup da AH patolojisinin izlenmesi üzere ailesel AH mutasyonlarını ifade etmekte olup APP ifadesinin miktarı, bölgeleri ve yayılımı kullanılan promotör tarafından belirlenmektedir (Drummond ve Wisniewski, 2017). Günümüzde kullanımda olan 17 adet sıçan AH modeli vardır ve Tablo 2'de bu modellerin AH ilişkili nöropatolojik özellikleri sunulmuştur.

Tablo 2. Literatürde kullanımda olan sıçan AH modelleri, sahip oldukları mutasyonlar ve nöropatolojileri

Model	Gen	Mutasyon	Modifikasyon	Nöropatoloji
AAV-AD	APP, PSEN1	APP KM670/671NL (Swedish), APP V717I, PSEN1 M146L (A>C)	APP: Virüs PSEN1: Virüs	Amiloid plaklar ve serebral amiloid anjiyopati, enjeksiyondan 30 ay sonra izlenmiştir. Fosforile Tau varlığı, (ön)düğüm benzeri yapıların varlığını düşündürür. Enjeksiyondan 30 ay sonrasında kadar astrogliosis görülmemiştir. (Audrain, Souchet, Alves, Fol, Viode, Haddjeri, Tada, Orefice, Joséphine, Bemelmans, Delzescaux, Déglon, Hantraye, Akwa, Becher, Billard, Potier, Dutar, Cartier ve Braudeau, 2018)
APP21	APP	APP KM670/671NL (Swedish), APP V717F (Indiana)	APP: Transgenik	30 aya kadar plak izlenmemektedir. Dişilerde 19 aya kadar hipokampus ve kortekste nekrotik nöronlar gözlemlenmiştir; 19 aylık erkeklerin kortekslerinde nöron kaybı gözlenmemiştir.(Agca, Fritz, Walker, Levey, Chan, Lah ve Agca, 2008)
APP knock-in (humanized A β)	APP		APP: Knock-In	Bildirilen en büyük yaş olan üç ayda plak, NFT veya nöron kaybı gözlemlenmemiştir. (Tambini, Yao ve D'Adamio, 2019)
APP knock-in (humanized A β) (Leuven)	APP		APP: Knock-In	İki yaşına kadar plak veya NFT oluşumu gözlenmemektedir. (Serneels, T'Syen, Perez-Benito, Theys, Holt ve De Strooper, 2020)
APP knock-in (humanized A β) (Leuven); PSEN1 knock-in (M139T)	APP, PSEN1	PSEN1, M139T	APP: Knock-In PSEN1: Knock-In	İki yaşa kadar plak veya NFT oluşumu gözlenmemektedir. (Serneels ve diğ., 2020)
App knock-in (Icelandic mutasyonu ve humanized A β)	APP	APP A673T (Icelandic)	APP: Knock-In	Bilinmiyor (Tambini, Norris ve D'Adamio, 2020)
APP knock-in (Swedish mutasyonu ve humanized A β)	APP	APP KM670/671NL (Swedish)	APP: Knock-In	Bildirilen en büyük yaş olan 3. ayda plak, NFT veya nöron kaybı gözlenmemiştir. (Tambini ve diğ., 2020; Tambini ve diğ., 2019)
APP NL-G-F Knock-in sıçan	APP	APP KM670/671NL (Swedish), APP E693G (Arctic), APP I716F (Iberian)	APP: Knock-In	Amiloid plaklar, homozigot knock-in'lerde 1 ay gibi erken bir zamanda ortaya çıkmaktadır. 22 aylıkken NFT olmaz, ancak tau fosforilasyonu, agregasyonu ve konformasyonel değişikliklerde artış olur. Astrogliosis, mikrogliosis, sinaps ve nöron kaybı görülür. (Pang, Jiang, Zhang, Yang, Li, Shimozawa, Tambaro, Mayer, Zhang, Li, Wang, Liu, Yang, Chen, Liu, Winblad, Han, Jiang, Wang, Nilsson, Guo ve Lu, 2022)
APP+PS1	APP, PSEN1	APP KM670/671NL (Swedish), APP V717F (Indiana), PSEN1 L166P	APP: Transgenik; PSEN1: Transgenik	19 aylıkken hipokampus ve kortekste amiloid plaklar, serebral amiloid anjiyopati ve nekrotik nöronlar izlenir. (Agca, Klakotskaia, Schachtman, Chan, Lah ve Agca, 2016; Klakotskaia, Agca, Richardson, Stopa, Schachtman ve Agca, 2018)
McGill-R-Thy1-APP	APP	APP KM670/671NL (Swedish), APP V717F (Indiana)	APP: Transgenik	Hemizigotlar: Bir haftaya kadar hipokampus ve kortekste intranöronal A β gözlemlenir, ancak ileri yaşlarda bile plak tespit edilmemiştir.

				Homozigotlar: Bir haftada boyunca hipokampüse ve kortekste intranöronal APP izlenir; hipokampüste 6 ayda başlayan, kortekste 13 ayda başlayan amiloid plaklar gözlemlenir. (Leon ve diğ., 2010)
PSEN1 L435F <i>knock-in</i>	PSEN1, APP	PSEN1 L435F	PSEN1: <i>Knock-In</i> ; APP: <i>Knock-In</i>	15 günlük sıçanlarda hiçbir belirteç gözlenmedi. (Tambini ve D'Adamio, 2020a)
SHR24	MAPT		MAPT: Transgenik	NFT yapıları 9-10 aydan başlayarak korteks, hipokampüse talamus ve beyin sapında birikmektedir. Hipokampus veya kortekste nöron kaybı gözlenmemiştir. (Filipcik, Zilka, Bugos, Kucerak, Koson, Novak ve Novak, 2012; Valachova, Brezovakova, Bugos, Jadhav, Smolek, Novak ve Zilka, 2018)
SHR318	MAPT		MAPT: Transgenik	NFT yapıları ilk olarak 9. ayda ortaya çıkmakta olup özellikle beyin sapı ve omurilikte belirgindir. 10 ila 12 aylık hayvanların beyin sapı ve omuriliğinde aksonal dejenerasyon gözlemlenmektedir. (Hrnkova, Zilka, Minichova, Koson ve Novak, 2007; Zilka, Filipcik, Koson, Fialova, Skrabana, Zilkova, Rolkova, Kontsekova ve Novak, 2006)
SHR72	MAPT		MAPT: Transgenik	Gallyas gümüş boyaması, son aşamadaki (7-8 aylık) hayvanların beyin sapsı ve omuriliklerinde NFT yapıları tespit etmiştir. Bu aşamada kromatolitik nöronlar ve hasarlı aksonlar gözlemlenmektedir. (Koson, Zilka, Kovac, Kovacech, Korenova, Filipcik ve Novak, 2008)
SHRSP/FAD	APP, PSEN1	APP KM670/671NL (Swedish), PSEN1: deltaE9	APP: Transgenik; PSEN1: Transgenik	Amiloid plaklar ve mikrogliozis izlenir. Astrogliozis olasıdır. Nadiren nöronların eşleştirilmiş sarmal filaman tau içerdiği görülmektedir. Demiyelinizasyon izlenir. Azalan kalbindin immünoreaktivitesi ve artan işlenmiş kaspaz seviyeleri nöron kaybını gösterebilir. (Denver, D'Adamo, Hu, Zuo, Zhu, Okuma, Kim, Castro, Jones, Leal, Mekittikul, Ghadishah, Teter, Vinters, Cole ve Frautschy, 2019)
TgF344-AD	APP, PSEN1	APP KM670/671NL (Swedish), PSEN1: deltaE9	APP: Transgenik; PSEN1: Transgenik	6 aya kadar amiloid plaklar, mikrogliozis ve astrogliozis izlenmektedir. 16 ayda NFT yapılar gözlemlenir. 16 aya kadar hipokampus ve kortekste yaklaşık yüzde 40 nöron kaybı izlenir. (Cohen ve diğ., 2013)
Trem2 R47H <i>knock-in</i>	TREM2, APP	TREM2 R47H	TREM2: <i>Knock-In</i> ; APP: <i>Knock-In</i>	Bilinmiyor (Tambini ve D'Adamio, 2020b)

Tüm sıçan modellerde yüksek amiloid plak birikimi gözlemlenmektedir, ancak TgF344-AD sıçanlarda NFT oluşumu da izlendiği raporlanmıştır (Cohen ve diğ., 2013). Yine tüm sıçan AH modellerinde bilişsel bozulmalar izlendiği ifade edilmesine karşılık yalnızca McGill-

R-Thy1-APP sıçanlarda bilişsel bozulmanın derecesi üzerine detaylı araştırma yapılmıştır (Leon ve diğ., 2010). Özet olarak transgenik sıçanlar, AH araştırmalarında transgenik farelere kıyasla çeşitli avantajlar taşımalarına karşılık literatürde daha nadir kullanımları sebebiyle

üzerlerinde daha fazla karakterizasyon çalışması yapılmasına ihtiyaç vardır.

3.1.3. Primat Modelleri

İnsan olmayan primatlar, AH nöropatolojisini en iyi yansıtan modellerdir; hastalığı modellemek için insan olmayan primatları kullanmanın avantajları arasında biyolojik açıdan insana yakınlıkları, kompleks davranışları, görüntüleme çalışmaları ya da BOS toplamaya elverişli büyük beyinleri ve insan A β ile %100 sekans homolojisine sahip doğal A β birikimi yer alır. Karmaşık bilişsel ve sosyal davranışlara sahip olan, temelde görsel ve işitsel duyarlarla iletişim kuran yeni dünya primatları yaygın marmosetler (*Callithrix jacchu*) nörobilim çalışmalarında yaygın olarak kullanımdadırlar. AH modellemesi bağlamında marmosetlerin beyinlerinde yedi yaş civarında A β birikimi izlendiğine dair yayınlar mevcuttur (Geula, Nagykerly ve Wu, 2002; Rodriguez-Callejas, Fuchs ve Perez-Cruz, 2016). Marmosetlerin esaret altında ömürlerinin 10-15 yıl arası olduğu göz önüne alındığında, bu organizmalar yaşla ilişkili hastalıkların araştırılmasında ideal modeller olarak ön plana çıkmaktadırlar. Ek olarak kemirgen modelleri aksine marmosetlerin bağışıklık sistemleri ve metabolik fonksiyonları da insanlarla benzerlik gösterir (t Hart ve Massacesi, 2009; Tardif, Mansfield, Ratnam, Ross ve Ziegler, 2011). Farklı insan dışı primat türleri arasında cinsel olgunluğa hızlı erişmeleri, çoklu doğum yapmaları ve kısa gestasyon süreleri ile marmosetler, genetik modifikasyonlara sahip hayvan modellerinin tasarlanmasında da avantaj taşımaktadır (Tardif ve diğ., 2003).

Eski dünya primatları (rhesus maymunları (*Macaca mulatta*), babunlar (*Papio spp.*), sinomolgus maymunları (*Macaca fascicularis*), vervet maymunları (*Chlorocebus pygerythrus*)) arasında rhesus maymunları, AH araştırmalarında görece yaygın kullanılan türdür (Drummond ve Wisniewski, 2017). İnsanlarda olduğu gibi rhesus maymunlarında da beyin A β seviyeleri yaşla birlikte artış gösterir ve korteksteki seviyeleri

insan AH bulgularına yakındır. 25 yaş üzeri rhesus maymunlarında plaklar sıklıkla gözlemlenir ve dağılımları insanla benzerdir. Ancak insan ve rhesus maymunu tau protein sekansları arasındaki yüksek benzerliğe karşılık bu maymunlarda tau patolojisine rastlanmamaktadır; babunlarda ise yaşa bağlı olarak hipokampüste tau birikimi izlenir ancak beyin diğer bölgelerinde amiloid plak birikimi gerçekleşse dahi NFT oluşumu görülmez. Daha nadir olmakla beraber AH ilişkili nöropati araştırmalarında vervetlerin kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Vervetlerin ömürleri esaret altında ortalama 30 yıl olup yaşa bağlı olarak A β birikimi, gliosis ve nöronal distrofi gösterirler. A β birikimi ortalama 15 yaş civarında gözlemlenmekte olup NFT oluşumu izlenmez (Drummond ve Wisniewski, 2017).

3.1.4. Diğer In vivo Alzheimer Hastalığı Modelleri

Bir model organizma olarak nematod *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), ilk kez programlanmış hücre ölüm mekanizmalarına yönelik çalışmalarda kullanılmış olup günümüze dek gen ifadesinin düzenlenmesi, metabolizma, hücre farklılaşması, embriyogenez, yaşlanma ve stres sinyal yolları dahil olmak üzere çok sayıda biyolojik sürecin aydınlatılmasında bu organizmadan yararlanılmıştır (Brenner, 1974). *C. elegans*, memeli genleri ile yüksek sekans homolojisine sahip olması ve genetik manipülasyonlara yatkınlığı sebebiyle insan hastalıklarının araştırılması için değerli bir model organizma olarak kabul görmektedir; bu bağlamda hem RNA interferans (RNA interference - RNAi) hem de clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 teknolojileri, *C. elegans* hastalık modellerinin oluşturulmasında başarıyla kullanılmış ve dahası bu organizma, tüm nöron ve bağlantılarının (konnektom) haritalandığı ilk model olmuştur (Cook ve diğ., 2019; Corsi, 2006; Dickinson, Ward, Reiner ve Goldstein, 2013; Fire ve diğ., 1998). AH modellemesinde kullanılan ilk *C. elegans* model

çalışması 1995 yılında yayınlanmış olup A β 42 peptitinin vücut duvarı hücrelerinde birikim gösterdiğini ve yaşa bağlı olarak felce yol açtığını ifade etmektedir (Link, 1995). Ancak ilerleyen dönemlerde bazı modellerde ifadesi izlenen bu proteinin tam uzunlukta A β 42 peptiti değil, peptitin kesilmiş bir formu olduğu tespit edilmiş ve A β 42 peptitinin doğru kesimini sağlamak üzere orijinal A β peptitinin modifiye edildiği *C. elegans* modelleri (geliştirilmiştir McColl ve diğ., 2009; McColl ve diğ., 2012). AH'de tau patolojisinin araştırılmasına yönelik ilk çalışmalarda ise frontotemporal demansın (FTD) ailesel bir formu olan FTDP-17'de izlenen mutasyonların genetik manipülasyon yolu ile ifadesine dayanan *C. elegans* modelleri kullanılmıştır (Kraemer ve diğ., 2003). Bu çalışmalarda elektron mikroskopisi ile yapılan analizler, tau birikiminden etkilenen nöronların sergiledikleri nörodejeneratif bulguların meyve sineği *Drosophila melanogaster* (*D. Melanogaster*) ve fare tau modelleri ile benzerliğine işaret etmiştir (Lewis ve diğ., 2000; Wittmann ve diğ., 2001). Bir diğer *C. elegans* tau modeli, organizmanın tüm nöronlarında proteinin psödo hiper-fosforile olmasına yol açacak mutasyon taşıyıcı (PHP; 10 Ser/Thr rezidüleri Glu ile değiştirilmiştir) bir model olup psödo hiper-fosforile taunun motor nöronların gelişiminde defektlere yol açtığı raporlanmıştır (Brandt, Gergou, Wacker, Fath ve Hutter, 2009).

Alzheimer Hastalığı araştırmalarında kullanılan bir diğer model organizma, meyve sineği olup araştırmacılar bu organizmaların insanlarda çeşitli hastalıklara yol açmakta olan genlerin neredeyse %70'inin ortologlarına sahip olduğunu ifade etmektedir (Fortini, Skupski, Boguski ve Hariharan, 2000). Meyve sineği çalışmalarının etik onay gerektirmemesi, organizmanın üretiminin ve genetik manipülasyonlarının kolaylığı, genomunun iyi tanımlanmış olması ve *C. elegans* da dahil olmak üzere diğer omurgasız modellere kıyasla görece kompleks bir canlı olması sebebiyle AH de dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalıklarda meyve sineği modellerinin kullanımının çok sayıda avantajı bulunmaktadır

(Prüßing, Voigt ve Schulz, 2013). AH özelinde, meyve sineği APP ortologu dAPP1 genine ve γ -sekretaz kompleksinin tüm bileşenlerine sahiptir; buna karşılık organizmanın zayıf β -sekretaz aktivitesi ve dAPP1'in A β peptitlerine denk gelen bölgesinde anlamlı bir homoloji bulunmaması nedeniyle sinekte endojen A β üretimi izlenmez (Carmine-Simmen ve diğ., 2009; Luo, Tully ve White, 1992; Yagi, Tomita, Nakamura ve Suzuki, 2000). Genetik manipülasyonlar ile β -sekretaz aktivitesinin artırılması, dAPP1'in işlenerek insan A β peptidine denk bir ürün vermesini sağlayabilir ve bu fragment birikerek yaşa bağlı davranışsal bozulmalara ve nörodejenerasyona yol açabilir (Carmine-Simmen ve diğ., 2009). Endojen A β üretiminin yanı sıra insan A β 42 indüklü toksisite ve nörodejenerasyonun çalışılması için farklı transgenik sinekler de üretilmiştir. Yapılan bir çalışmada insan APP, insan β -sekretaz ve mutant meyve sineği γ -sekretaz presenilin ifade eden üçlü transgenik sinekler kullanılmış ve bu sineklerin yaş bağımlı olarak nörodejeneratif fenotip gösterdiği belirtilmiştir (Greeve ve diğ., 2004; Ye ve Fortini, 1999). Tau patolojisi bağlamında ise yabanıl tip ya da mutant insan tau proteinlerinin meyve sineği sinir sisteminde ifadelerinin beyinde vakuolizasyona ve patolojik fosforilasyona yol açmasına karşın filamentöz yapıda birikimlere neden olmadığı raporlanmıştır (Wittmann ve diğ., 2001). Ancak fenotipik bulgular, tau ifadesinin artırılması ya da çeşitli mutant tau izoformlarının ifadelerinin sağlanması ile ağırlaştırılabilir (Wittmann ve diğ., 2001).

Alzheimer Hastalığı araştırmalarında kullanılan bir diğer model zebra balığıdır (Danio rerio). *C. elegans* ve meyve sineği modellerinde olduğu gibi zebra balıkları da hızlı çoğalır; bir dişi bir batında 200-250 yavru üretebilir, döllenmenin 24 saat sonrasında tüm vücut yapısı oluşur ve 96 saatte kalp, karaciğer ile böbrek gibi iç organlar gelişir (Shenoy, Banerjee, Upadhyay, Bagwe-Parab ve Kaur, 2022). Larvanın şeffaf yapısı, gelişimin in vivo izlenmesini olanaklı kılar. Bu balıklar farklı genleri ifade etmeleri için genetik olarak manipüle edilebilirler ve embriyoları aday ilaç

taramalarında kullanıma uygundur. Zebra balıkları omurgalı olmaları sebebiyle *C. elegans* ve meyve sineği modellerine kıyasla evrimsel olarak insanlara çok daha yakındır ve larvalar döllenme sonrası beş güne kadar yasal düzenlemelerden muaftır. Yapısal bağlamda zebra balıklarının beyinleri memeli beyin yapısına benzerlik göstermektedir; ancak memeli beyinde bulunan hipokampus, amigdala, substantia nigra gibi bazı bölgeler balıklarda bulunmaz, fakat balık beyinde bu görevleri üstlenebilecek benzer bölgeler bulunmaktadır (Guo, 2009; Schmidt, Strähle ve Scholpp, 2013).

3.1.5. In Vivo Alzheimer Hastalığı Modellerinin Kısıtlamaları

Kullanımda olan pek çok farklı hayvan modeline karşılık AH tedavisini hedefleyen klinik deneylerin başarıları görece düşüktür; araştırmacılar bunun nedeninin insan AH patolojisini sınırlı seviyede yansıtabilen hayvan modellerinden elde edilen başarılı sonuçların kliniğe erken dönemde yansıtılmasından kaynaklandığını ifade etmektedir (Drummond ve Wisniewski, 2017). Ayrıca insan AH olgularında transgenik hayvanların oluşturulmasında kullanılan AH mutasyonlarının beraber izlenmesi oldukça nadirdir (Li ve diğ., 2016). Hayvan modellerinin AH araştırmalarında kullanımlarının diğer kısıtlamaları arasında transgenik ya da yaşlı hayvanların hastalık patolojisini geliştirme süreçleri, kompleks in vivo koşulların hedef dokuya erişimi kısıtlaması, biyolojik değişimlerin eşzamanlı değerlendirilmesinin olanaksızlığı ve özellikle primatlarla yapılan çalışmaların etik sınırlandırılması bulunmaktadır (Trinchese ve diğ., 2004).

In vivo AH modellerinden elde edilen sonuçların AH patogenezini yansıtmaya başarısı

tartışmalı bir konu olup farklı modellerin her birinin güçlü ve zayıf yönlerinin daha iyi anlaşılması ve potansiyel terapileri değerlendirmek üzere çok sayıda farklı modelin kullanılması, klinik öncesi çalışmalardan hastalara terapi çevirisinin başarısını artırmaya yardımcı olacaktır (Li ve diğ., 2016). Farklı hayvan türlerinin kullanıldığı çalışmalarda modelin insan dışı bir tür olmasına bağlı olarak yanıltıcı sonuçlar elde edilebilir. Bu durum, AH çalışmalarında insan dokularının kullanımı ile önlenemez. Ancak bu noktada temel sorun, yetişkin insan hücrelerinden geliştirilecek deneysel modellerin üretilmesi için uygun post-mortem beyin dokusuna ulaşımın güçlüğüdür (Drummond ve Wisniewski, 2017).

3.2. In Vitro Modeller

In vivo hayvan modellerinin aksine, in vitro AH modelleri, hastalık süresince meydana gelen patolojik değişiklikleri aydınlatmak ve nöronların potansiyel tedavilere yanıtlarını incelemek için hızlı bir seçenektir. Literatürde bulunan öncül in vitro AH çalışmaları, insan ya da kemirgen kökenli kanser hücre hatlarının nöronlara farklılaştırılmasını takiben kültür ortamına oligomerik A β 42 ilavesine dayalıdır. Hücre kültürü yöntemlerinde izlenen gelişmeler sayesinde güncel çalışmalar, genetik manipülasyonlar ile ailesel AH mutasyonlarını ifade eden nöral öncül hücre hatlarının ve AH risk alellerini taşıyan bireylerden alınan indüklenebilir kök hücrelerden farklılaştırılan hücresel modellerin kullanımlarına odaklanmaktadır (Raska ve diğ., 2021; Yagi ve diğ., 2012). Günümüzde kullanımda olan farklı in vitro AH modeli yaklaşımları Tablo 3'te özetlenmektedir.

Tablo 3. In vitro AH modellerinin avantaj ve dezavantajları

Model	Avantajlar	Dezavantajlar
Kanser hücre hatları kökenli modeller	Düşük maliyetlidir. Kanser hücrelerinin kültürleri, iPSC ve NPC'lere kıyasla oldukça kolay ve iyi tanımlıdır. Hem insan, hem de kemirgen kökenli farklı hücre hatları için nöral farklılaştırma protokolleri mevcuttur. Kullanımları önünde etik engeller bulunmaz. Moleküler değişimler eşzamanlı olarak mikroskopi ile takip edilebilir.	Kemirgen kökenli hücreler insan AH patolojisini yansıtmakta yetersiz kalabilir. Nöroblastom hücreleri süspansiyon ve adheren popülasyonlardan oluşmakta olup kültür içinde popülasyonların biri diğerine baskınlık sağlayabilir. Kanser hücrelerinden geliştirilen modeller sağlıklı olgun nöronlardan yapısal farklılıklar göstermektedir.
İndüklenebilir pluripotent kök hücre modelleri	AH ilişkili mutasyonları taşıyan bireylerden alınan hücrelerden elde edilen iPSC'ler sayesinde genetik manipülasyonlara ihtiyaç duyulmaz. Kanser ya da NPC kökenli AH modellerinin aksine kültür ortamına farklı kişilerden alınan primer hücreler veya hücre hatları eklenmesine gerek duyulmaz, bir kişiden elde edilen iPSC'ler beyinde bulunan tüm hücre tiplerine farklılaşma kapasitesi taşır. Bireye özgü tedavi yöntemlerinin değerlendirilmesine uygundur. Moleküler değişimler eşzamanlı olarak mikroskopi ile takip edilebilir.	iPSC kültürlerinin geliştirilmeleri ve devamlılıklarının sağlanmasına yönelik standardize protokollerin eksik eksiktir. Yeniden programlama, donör hücrelerde mevcut olan epigenetik modifikasyonların korunmalarının önüne geçemez. Farklı bireylerden elde edilen iPSC hatları arasında yüksek fenotipik varyasyonlar görülmektedir. iPSC elde ve karakterizasyonları, özellikle kanser hücre hatları ve NPC kökenli kök hücrelere nazaran daha maliyetlidir.
Serebral organoidler	iPSC kökenli serebral organoidler bireye özgü tedavi yöntemlerinin değerlendirilmesine uygundur. AH ilişkili mutasyonları taşıyan bireylerden alınan hücrelerden elde edilen iPSC kökenli organoidlerde genetik manipülasyonlara ihtiyaç duyulmamaktadır. Beyin dokusunu simüle ederek bağışıklık sistemi hücreleri de dahil olmak üzere çok sayıda farklı hücre arasındaki etkileşimin incelenmesine olanak tanır. Moleküler değişimler eşzamanlı olarak mikroskopi ile takip edilebilir.	Stabil kültür ortamında yetersiz oksijen ve besin difüzyonu sonucu nekrotik bölge oluşumu, sonuçları olumsuz etkilemektedir. Vasküler yapıya sahip beyin organoidleri ile yapılmış çalışmalar oldukça sınırlı olup bu modellere kan hücreleri henüz entegre edilmemiştir. Serebral organoidlerin kültürleri, görece yüksek maliyetlidir ve yüksek seviyede etkinlik gerektirir.
Nöronal öncül hücre modelleri	Genetik yöntemlerle AH ilişkili genleri ifade etmek üzere modifiye edilen NPC'ler, nöronlara farklılaştırılana dek AH ilişkili proteinleri düşük seviyede ifade ederler. Dolayısıyla bu NPC'ler olgun nöronlara farklılaştırılmadıkça kolaylıkla çoğaltılabilirler. Kültür ortamında ekstrasellüler matriks kullanımı, aβ difüzyonunun önüne geçerken NFT oluşumunu gelişimini kılar. Ticari NPC hatlarının kültürleri, deneysel serebral organoid modellerine göre görece daha kolay ve düşük maliyetli olup etik onay gerektirmez. Moleküler değişimler eşzamanlı olarak mikroskopi ile takip edilebilir.	NPC'ler mikrogliyalara farklılaşmamaktadır. NPC'lerden beynin farklı bölgelerinde bulunan farklı tiplerde nöronların farklılaştırılmalarına yönelik detaylı protokoller mevcut değildir. Ekstrasellüler matriks yokluğunda NPC AH modelleri, NFT yapılarını oluşturamaz ve aβ'nın besiyerine diffüze olması sebebiyle amiloid birikimleri yüksek toksisite gösteremez. Ticari NPC hatları, bireye özgü tedavilerin değerlendirilmelerinde kullanıma uygun değildir.

Aβ: Amiloid beta, iPSC: indüklenebilir pluripotent kök hücre, NPC: nöral progenitör hücre, NFT: nörofibriler yumak

3.2.1. Kanser Hücre Hatları Kökenli Modeller

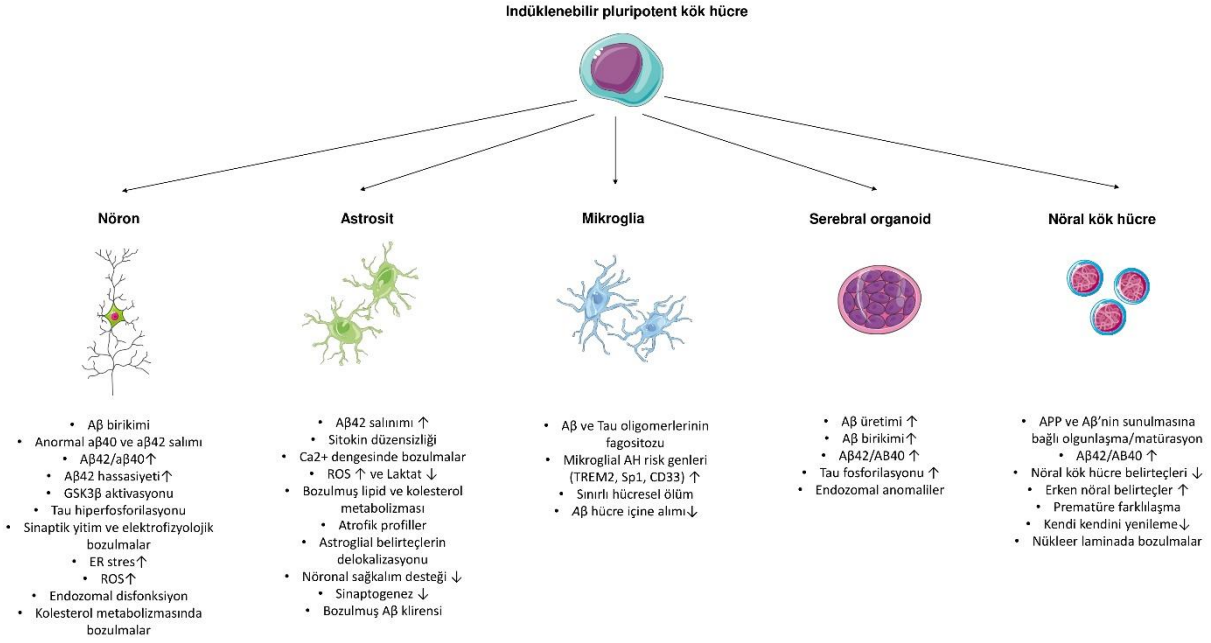
İnsan nöroblastoma hücre hatları 20 yılı aşkın süredir hücresel AH modellemesinde kullanılmaktadır. Bu hücreler retinoik asit, forbol esterler ve beyin kökenli nörotrofik faktör gibi nörotropinler gibi farklı ajanlarla inkübasyon sonucu nöronal hücre tiplerine dönüşebilirler. Literatürde SH-SY5Y hücre hattı, sıklıkla olgun nöron benzeri hücreler oluşturmada kullanılmıştır (Shibley, Mangold ve Szpara, 2016). Bu hücre hattının retinoik asitle muameleyi takiben hücrelerin bir ekstrasellüler matriks üzerinde kültürlenmesi ve besiyerine nörotrofik faktör, nöregülün $\beta 1$, nöron büyüme faktörü, vitamin D3 eklenmesi ile yetişkin nöronları meydana getirdiği raporlanmıştır. Bu hücreler ayrıca yetişkin tau izoformlarını ifade etmeleri nedeniyle özellikle AH modeli olarak kullanıma uygun oldukları ifade edilmiştir (Agholme, Lindström, Kågedal, Marcusson ve Hallbeck, 2010). AH modellemesinde kullanılan bir diğer hücre hattı sıçan feokromasitoma hücre hattı PC12'dir (Liu ve diğ., 2021; Meng, Zhang, Ai, Wu ve Peng, 2021; Tong ve diğ., 2018; Yu, Li ve Mu, 2020; Zeng, Xu ve Zheng, 2017). SH-SY5Y hücre hattında olduğu gibi PC12 hücrelerinde de sinir büyüme faktörü uygulaması ile nöronal farklılaşma sağlanabilir (Sierra-Fonseca ve diğ., 2014).

3.2.2. İndüklenebilir Pluripotent Kök Hücre Modelleri

2007 yılında tanımlanmalarından bu yana indüklenebilir pluripotent kök hücrelerin

(inducible pluripotent stem cells - iPSC) beyin hücreleri de dahil olmak üzere farklı somatik hücrelere farklılaştırılmalarına yönelik çok sayıda protokol tanımlanmıştır (Penney, Ralvenius ve Tsai, 2020). Ailesel AH mutasyonlarına sahip bireylerden alınan fibroblastlar, kan hücreleri ya da idrar epitel hücrelerinin olgun beyin hücrelerine farklılaştırılması, in vitro AH modellerinin oluşturulmasında güncel bir yöntemdir (Drummond ve Wisniewski, 2017).

Ailesel ve sporadik AH hastalarından alınan donör hücrelerle iPSC hücre hatları karakterize etmiş olup bu hücrelerin farklılaşmanın erken aşamalarından itibaren aynı yaşta, ancak demans izlenmeyen bireylerden elde edilen iPSC'lere nazaran yüksek seviyede A β 42 üretimine sahip oldukları görülmüştür (Israel ve diğ., 2012; Muratore ve diğ., 2014; Penney ve diğ., 2020; Yagi ve diğ., 2011). Bazı hücre hatlarında yüksek glukojen sentaz kinaz 3- β aktivitesi gibi ek AH-ilişkili patolojiler de izlenmiştir (Israel ve diğ., 2012). Ayrıca tek bir öncül hücrenin beyni meydana getiren tüm hücre tiplerinin farklılaştırılabilme potansiyeli sayesinde hücreler arası etkileşimleri yansıtabilecek modeller üretilmesi de mümkündür, ancak bu hücre tiplerinin elde edilmeleri için protokollerin oluşturulmalarına yönelik çalışmalar devam etmektedir (Penney ve diğ., 2020). Bu hücrelerden farklılaştırılan hücre tipleri ve oluşturulan AH modellerinde izlenen karakteristik özellikler, Şekil 2'de sunulmuştur.



Şekil 2. İndüklenebilir pluripotent kök hücrelerden elde edilen olgun sinir sistemi hücreleri ve AH modellerinde görülen karakteristik özellikleri. Aβ: Amiloid beta, APP: Amiloid öncül proteini, ER: Endoplazmik retikulum, GSK3β: Glikojen sentaz kinaz-3 beta, ROS: Reaktif oksijen türevi.

In vitro AH modellemesinde hasta kökenli iPSC kullanımının en büyük avantajı, hastalık patolojilerinin yansıtılması için genetik manipülasyon da ya kültür ortamına Aβ eklemesi gibi müdahalelere ihtiyaç duyulmamasıdır (Penney ve diğ., 2020). Bu nedenle her ne kadar dezavantajları olsa da iPSC modellerinin AH patomekanizmalarının aydınlatılmalarına olan katkıları göz ardı edilemez. Ek olarak bu hücreler ile bireye özgü modellerin oluşturulmasının gelecekte kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarında kullanım potansiyeli bulunmaktadır (Penney ve diğ., 2020).

3.2.3. Serebral Organoidler

İki boyutlu (2D) kültürlerde oluşturulan AH modelleri, hastalığın mekanizmaların aydınlatılmasına önemli katkılar sağlamış olsa da hastalıkta farklı hücre tipleri ile bağışıklık sistemi hücreleri arasındaki etkileşimin incelenmesi, farklı nöronal popülasyonların değerlendirilmeleri ve NFT ile senil plakların karmaşık doku benzeri ortamda oluşumlarının analizlerin gerçekleştirilebilmeleri için serebral dokunun

simülasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır (Barak ve diğ., 2022). Hastalık üzerine gerçekleştirilen çalışmalar da bu doğrultuda insan multipotent kök hücrelerinden elde edilen üç boyutlu (3D) serebral organoidlerin geliştirilmesi sonucu farklı bir boyut kazanmıştır. Serebral organoidler insan fetal beyin gelişimini yansıtan iPSC kökenli 3D hücresel agregatlarıdır (Kelava ve Lancaster, 2016a; Lancaster ve diğ., 2013). Bu yapıların modellenen organda yer alması beklenen belirli fonksiyonlara sahip hücrelerin tamamını içermeye kapasiteleri, organoidleri beyin araştırmaları konusunda ilgi çekici hedefler haline getirmektedir (Barak ve diğ., 2022).

Serebral organoidlerin geliştirilmesinde öncü protokoller, kök hücrelerin intrinsik birleşme ve nöronal diziye farklılaşma yeteneklerine dayalıdır; bu yöntem ile organoid içinde beyin farklı bölgelerinin bulunduğu 3D tam beyin organoidleri oluşturulabilir (Lancaster ve diğ., 2013). Güncel modellerde ise kültür ortamına beyin bölgesine özgü büyüme ve farklılaşma faktörleri ile belirli hücresel inhibitörlerin eklemesi yoluyla belirli beyin bölgelerinin

organoidlerinin geliştirilmesi hedeflenmektedir. Bu nedenle farklı beyin bölgelerine özgü serebral organoidler hücresel bileşimi, yapısal özellikleri ve moleküler süreçleri simüle etme kapasiteleri ile modellenen beyin bölgesini yansıtmakta daha başarılıdır (Qian, Song ve Ming, 2019). 3D serebral organoidlerin geliştirilmelerine yönelik protokollerin iyileştirilmeleri, hücre kültürü ortamında AH de dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalıklara yönelik araştırmalara önemli katkı sağlamıştır: günümüzde serebral organoidler in vitro insan hücre kültürü sistemleri ile hayvan modelleri arasındaki boşluğu doldurmaktadır (Qian ve diğ., 2019).

3.2.4. Nöronal Öncül Hücre Modelleri

Günümüzde iPSC AH modelleri üzerine yapılan çalışmalar ağırlıklı olarak bu hücrelerden farklılaştırılan olgun nöronlarla ilişkili olsalar da literatürde AH kökenli nöral öncül hücrelerin (neural progenitor cells - NPC) fenotip, davranış ve moleküler özelliklerine odaklanan sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. 2012 yılında yayımlanan ilk çalışmada Koch ve diğerleri, insan embriyonik kök hücrelerinden farklılaştırılan NPC'lerde lentiviral transdüksiyon ile ailesel AH mutasyonu PSEN1 (L166P, D385N) etkisini incelemiş ve APP ile A β salımlarının olgunlaşma bağımlı olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmaya göre kendini yenileme kapasitesine sahip NPC'lerde APP ve A β ifade seviyesi düşük olup her iki protein de farklılaşma süreci sonrasında tespit edilebilir seviyelere ulaşmaktadır (Koch ve diğ., 2012). PSEN1 mutasyonları (A246E VE M146L) taşıyan iki ailenin bireylerinden elde edilen iPSC'lerin kullanıldığı 2014 tarihli bir çalışmada ise PSEN1 mutant NPC'lerin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek A β 42/A β 40 oranlarına sahip oldukları raporlanmıştır (Sproul ve diğ., 2014). Sağlıklı bireylerden veya erken ailesel AH mutasyonlarına (PSEN1 M146L) ya da geç sporadik AH mutasyonuna (APOE4/4) sahip bireylerden elde edilen iPSC'lerin karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada ise NPC belirteçleri PAC6 ve NESTIN ifadelerinde ve NPC büyüme hızları

arasında anlamlı fark tespit edilememiştir; tüm gruplardan elde edilen NPC'lerin karakteristik morfolojileri ile karakteristik belirteçlerini korudukları ve etkin şekilde olgun nöronlara farklılaşabildikleri belirtilmiştir (Jones, Atkinson-Dell, Verkhratsky ve Mohamet, 2017). 2019 yılında yayımlanan bir diğer çalışmada ise araştırmacılar sporadik AH hastalarından elde edilen iPSC'lerde sağlıklı bireylerden elde edilen hücrelere kıyasla nöral farklılaşma ilişkili genlerde anlamlı artış ve düşük kendini yenileme kapasitesi raporlamıştır (Meyer ve diğ., 2019). Bu bulgular, gelişimsel süreçte NPC'lerin baskılanmalarında ya da nöral devrelerin oluşumlarında meydana gelen bozulmaların sporadik AH gelişiminde rol oynama potansiyelini işaret etmekte olup bu durum, her ne kadar genç yetişkinlerde belirgin bilişsel sorunlara yol açmasa da yaşam boyu kronik stres maruziyeti ile birleşince nörodejenerasyona neden olabilir (Meyer ve diğ., 2019).

NPC kökenli olgun nöronlar ilk kez 2014 yılında in vitro AH modellemesinde kullanılmıştır (Choi ve diğ., 2014). Choi ve diğerleri (2014), bir ekstrasellüler matriks iskele üzerinde APP Swedish/London ve Presenilin ekzon 9 delesyon mutasyonlarını taşıyan bir insan NPC modeli geliştirerek hücre kültüründe A β plakları ile NFT yapılarını göstermiştir, bu çalışma ile in vitro ortamda ilk kez NPC kökenli bir AH modeli elde edilmiştir (Choi ve diğ., 2014). Laboratuvarımızda ticari NPC hücre hattı RenCell VM'in viral transdüksiyon yolu ile Swedish/Indiana mutasyonlarına sahip APP ifade eden olgun nöronların ekstrasellüler matriks üzerinde kültürlerinin hem A β 42 protein seviyelerinde hem de A β 42/A β 40 oranlarında anlamlı derecede yükselme saptanmıştır. Park ve diğerleri (2018), insan kök hücrelerinden üretilen nöronlar ve astrositlerin tekerlek şekilli bir mikroakışkan çip merkezinde, üç boyutlu bir matriks üzerinde büyütüldüğü yeni bir üçlü kültür sistemi tasarlamıştır (Park ve diğ., 2018). Çalışmada lentiviral Swedish ve London mutasyonlarına sahip APP vektörü ile transdükte edilen nöronlar ve astrositlerde A β ve p-tau izoformları tespit

edilmiştir. Yine bu çalışmada kültür besiyerinde IFN- γ , TNF α ve nitrik oksit gibi inflamatuvar belirteçlerin bulunduğu tespit edilmiş ve bu inflamatuvar belirteçlerin bazılarının üç boyutlu kültürlerle özgü olduğu ifade edilmiştir (Henstridge ve Spires-Jones, 2018). Ancak bu çalışmada nöron ve astrosit hücreleri (nöral kök hücrelerden olgunlaştırılan nöron ve astrositler) ile mikroglia hücreleri (simian virus 40 - SV40) T antijen ile immortalize bir hücre hattı) kullanılmış olup araştırmacılar, insani iPSC-kökenli ya da primer mikrogliaların kullanımının sonuçların doğrulanmasında önemli olduğunu belirtmektedir (Park ve diğ., 2018).

3.2.5. In vitro Alzheimer Hastalığı Modellerinin Kısıtlamaları

Öncül hücrelere ve iPSC tabanlı yöntemlere kıyasla kanser hücre hatları kökenli modeller, kolay kültürleri ve farklılaştırılmaları üzerine pek çok farklı protokol tanımlı olmaları sebebiyle tercih edilmektedir. Ancak SH-SY5Y hücreleri, nöron benzeri fenotipe sahip olmayan S-tipi (substrat adheren) ve nöritik sürece sahip N-tipi (nöroblastik) hücrelerden meydana gelmektedir ve uzun dönemde S-tipi hücreler kültürde üstünlük sağlayabilirler (Kovalevich, Santerre ve Langford, 2021). Ayrıca hücrelerin nöroblastoma kökenleri sebebiyle sahip oldukları farklılaşma, canlılık, büyüme performansı, genom stabilitesi ve metabolik özellikleri; bu hücreleri gerçek nöronlardan ayırmaktadır (Xicoy, Wieringa ve Martens, 2017). Bu nedenle hastalık modellerinin oluşturulmasında kanser kökenli olmayan, daha stabil nöronal modellerin kullanımı, kullanılan hücre tipine bağlı meydana gelebilecek varyasyonları azaltabilir. PC12 hücre hattı ise kanser kökenli olmasına ek olarak kemirgen türevli olması nedeniyle insan AH nöropatolojisini yansıtmakta yetersiz kalabilir ve kullanıldığı çalışmaların yanıltıcı sonuçlar vermesine yol açabilir (Xie ve diğ. 2022).

İndüklenebilir kök hücrelerin keşifleri, direkt olarak hasta kökenli hücrelerin kullanımları ve bu

hücrelerin teoride tüm hücre tiplerine farklılaştırılabilmesi sebebiyle bu hücreleri hastalıkların modellenmesinde ilgi çekici bir alternatif haline getirmiştir (Kim, 2015). Bu hücreler, çeşitli hastalıklara ait genetik izleri çeşitli manipülasyonlara gerek kalmaksızın taşımaktadır ve elde edilmelerini takiben hem hastalık mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalar için, hem de ilaç araştırma geliştirme çalışmaları için sınırsız kaynak sağlama potansiyelleri bulunmaktadır. Ancak günümüzde hala bu hücrelerin geliştirilmeleri ve kültürlerinin devamlılığının sağlanmasına yönelik standardize protokollerin eksik olması, donör hücrelerde mevcut olan epigenetik modifikasyonların yeniden programlamadan sonra korunma potansiyeli ve bireysel iPSC hatlarında izlenen fenotip varyasyonları, bu hücrelerin kullanımlarını sınırlandıran etmenler arasındadır (Drummond ve Wisniewski, 2017). Diğer bir engel ise AH ile ilişkili fenotipin gelişimi sürecinde hücrelerin yaşlanması olup post-mitotik nöronların kullanıldığı çalışmalarda bu fenotipi elde etmek teknik olarak zor olabilir. Ancak gelecekteki çalışmalarla bu hücre hatlarının daha kapsamlı tanımlanması sayesinde bu sınırlamalardan bazıları muhtemelen aşılanacaktır (Drummond ve Wisniewski, 2017). Hücresel AH modellerinde iPSC'lerden farklı olarak NPC'ler de kullanılmaktadır, ancak bu hücrelerin mikroglialara dönüşmemeleri sebebiyle oluşturulan modellerde mikroglialar ya bulunmamaktadırlar ya da kültür ortamına farklı hücre hatları veya primer mikrogliaların eklenmeleri yolu ile geliştirilen modeller kullanılmaktadır (Park ve diğ., 2018). Bu modellere ilişkin bir diğer dezavantaj ise nöral farklılaşmanın karakterizasyonuna yöneliktir: D'Aiuto ve diğerleri, 2014 yılında yayımlanan çalışmalarında iPSC kökenli NPC'lerden farklılaştırılan olgun nöronların ağırlıklı olarak veziküler glutamat transporter-1 (VGLUT1) pozitif nöronlara farklılaştığını belirtmiştir (D'Aiuto ve diğ., 2014). Donato ve diğerleri (2007), insan ticari NPC hücre hattı RenCell VM'in ağırlıklı olarak dopaminerjik

nöronlara farklılaştırılmasına olanak tanıyan bir protokol yayımlamıştır (Donato ve diğ., 2007). Ancak bu hücreler ile beynin farklı bölgelerinde bulunan farklı tiplerde nöronların oluşturulmalarına yönelik detaylı protokoller açısından eksiklikler mevcuttur.

Serebral organoidlerin başta AH olmak üzere nörodejeneratif hastalıkların modellenmesinde kullanımları önündeki temel engeller hücrelerin heterojenitesi ve vaskülarizasyonun kültür ortamında modellenememesidir (Barak ve diğ., 2022). Kültür ortamında vaskülarizasyonun sağlanamamasının yol açtığı nekrotik bölge oluşumu, geleneksel organoid kullanımını sınırlayan bir diğer etmendir. Nörodejeneratif hastalıkların modellenmesinde vaskülarize insan kortikal organoidlerinin kullanımları güncel bir yaklaşım olup bu yöntemde serebral organoidler, kortikal vasküler yapıyı taklit eden bir perfüzyon sistemi ile bağlantılıdır (Kelava ve Lancaster, 2016b). Bu yapı sıkı bağlantı proteinleri ve besin taşıyıcı proteinleri ifade etmesi ve transendotelial elektrik direncine sahip olması ile klasik kan beyin bariyeri özelliklerini de yansıtmaktadır; ancak yine de bu organoidlerin vasküler yapıları, kan hücrelerinden yoksundur. Yakın gelecekte vaskülarize organoidlerin kan beyin bariyeri geçirgenliği çalışmalarında, merkezi sinir sistemi ve perifer arasındaki ilişkileri incelemeye kullanılacakları öngörülmektedir (Cakir ve diğ., 2019). Literatürde bulunan serebral AH organoidlerinin bir diğer dezavantajı ise çoğu modelin mikroglialardan yoksun oluşudur (Lancaster ve Knoblich, 2014). AH patogeneğinde A β aracılı mikroglia aktivasyonu önemli rol oynamaktadır. Bu hücreler A β maruziyetini takiben çeşitli inflammatuar araçlar salarlar ve aktivasyon ile proliferasyonları AH patolojik sürecinin bir parçasıdır (Zuroff, Daley, Black ve Koronyo-Hamaoui, 2017). Ormel ve diğ. (2018), Lancaster ve Knoblich tarafından oluşturulan öncül modeli geliştirerek organoide mikrogliaları entegre eden ilk araştırmacılar olmuştur (Ormel ve diğ., 2018). Nzou ve diğ. (2018), insan mikrogliaları, mikrovasküler

endotelial hücreleri, periferik sinir hücreleri, astrositler ve oligodendrositleri kullanarak kan beyin bariyerine sahip ve mikrogliaları içeren bir organoid modeli geliştirmiştir (Nzou ve diğ., 2018). Song ve diğ. (2019) ise insan iPSC'lerinden izojenik mikroglia-benzeri hücreler elde ederek bu hücreleri serebral organoidlere entegre etmiştir (Song ve diğ., 2019). Bu öncül çalışmalar, farklılaştırılan hücrelerin eş kültür yöntemi ile organoidlere dahil edilerek daha kapsamlı organoid modellerinin elde edilmesinin mümkün olduğunu ortaya koymaktadır.

4. Alzheimer Hastalığı Araştırmalarında Uygun Modelin Seçimi

Alzheimer Hastalığı modelleri üzerinde yapılan nöropatolojik ve bilişsel bozulmaların incelenmelerine yönelik araştırmalar, AH'nin insanlara özgü bir hastalık olduğunu ifade etmektedir (Zhou ve diğ., 2015). Bu durum göz önüne alındığında hastalığın tedavisini hedefleyen klinik araştırmaların yaklaşık %99.6'sının başarısız olma nedeninin in vivo modellerden elde edilen başarılı sonuçların erken dönemde kliniğe yansıtılması olduğu ileri sürülmüştür (Cummings, 2018). AH çalışmalarında hayvan modellerinin kullanımının kuşkusuz en büyük avantajı, yeni terapötik girişimlerin başarılarının değerlendirilmesinde in vitro ortamda yapılması mümkün olmayan bilişsel analizlerin gerçekleştirilmelerine olanak tanımlarınıdır (Drummond ve Wisniewski, 2017). AH araştırmalarında en yaygın kullanılan modeller ikili, üçlü ve beşli transgenik fare modelleri olup hastalığın biyolojisinin araştırılması amacıyla farklı gen knock-in ve knock-out modelleri oluşturulmuştur; bu modellerin pek çoğunda amiloidojenik süreçlerin insan AH olgularına benzer şekilde kortikal plak oluşumuna yol açtığı belirtilmiştir (Cummings, 2018). Fakat bu transgenik hayvanlarda tau birikimi ya da nöron ölümü izlenmez ve inflammatuar değişimler çok düşük seviyelerdedir. Ayrıca meydana gelen

bilişsel değişimler insan AH olguları kadar ağır seyretmez. Tüm bu bulgular, amiloid yükünün azaltılmasını amaçlayan terapötik girişimlerin hayvanlarda bilişsel performansta belirgin düzelme sağlarken insanlarda etkisiz kalma sebeplerine ışık tutmaktadır. Fakat in vivo AH çalışmalarının tamamen ekarte edilmesi de doğru değildir, zira bu modeller her ne kadar spesifik yollara uygulanan müdahalelerin yol açtığı değişimlerin aydınlatılmasında önem taşıyorlar da aday tedavilerin hastalar üzerindeki etkilerini yansıtmada yetersiz kalabilirler (Sabbagh, Kinney ve Cummings, 2013).

In vivo modellerden elde edilen sonuçlar ile klinik arasındaki uyumsuzluk, insan odaklı in vitro yöntemlerin gelişimine katkı sağlamıştır (Drummond ve Wisniewski, 2017). Bu yöntemler hala geliştirilme aşamasında olup modellerin detaylı karakterizasyon çalışmalarına gereksinim vardır. Ayrıca her ne kadar hastalık patogenezinin ışık tutma ve hastaya özgü ilaç seçiminde kullanıma potansiyeline sahip olsalar da in vitro AH modellerinin klinik öncesi çalışmalarda in vivo çalışmaların yerini almaları mümkün değildir. Araştırmacılar AH modellemesinde altın standardın insan doku örnekleri olduğunu belirtmekte ve mümkün olan tüm koşullarda insan doku örneklerinin kullanım gerekliliğinin altını çizmektedir. Klinik öncesi çalışmalarda ise yeni geliştirilen ilaç adaylarının AH'nin farklı patolojilerini yansıtan farklı in vivo modeller üzerinde test edilmelerinin, çalışmaların dönüştürücülük potansiyellerine katkı sağlayacağı ifade edilmektedir (Drummond ve Wisniewski, 2017).

Kaynaklar

Agholme, L., Lindström, T., Kågedal, K., Marcusson, J., & Hallbeck, M. (2010). An in vitro model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *J Alzheimers Dis*, 20(4), 1069-1082. doi:10.3233/jad-2010-091363

Anand, P., & Singh, B. (2013). A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res*, 36(4), 375-399. doi:10.1007/s12272-013-0036-3

Arber, C., Toombs, J., Lovejoy, C., Ryan, N. S., Paterson, R. W., Willumsen, N., . . . Wray, S. (2020). Familial Alzheimer's disease patient-derived neurons reveal distinct mutation-specific effects on amyloid beta. *Mol Psychiatry*, 25(11), 2919-2931. doi:10.1038/s41380-019-0410-8

Association, A. s. (2021). 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, 17(3), 327-406. doi:10.1002/alz.12328

Barak, M., Fedorova, V., Pospisilova, V., Raska, J., Vochyanova, S., Sedmik, J., . . . Bohaciakova, D. (2022). Human iPSC-Derived Neural Models for Studying Alzheimer's Disease: from Neural Stem Cells to Cerebral Organoids. *Stem Cell Rev Rep*, 18(2), 792-820. doi:10.1007/s12015-021-10254-3

Bekris, L. M., Yu, C. E., Bird, T. D., & Tsuang, D. W. (2010). Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 23(4), 213-227. doi:10.1177/0891988710383571

Bertram, L., & Tanzi, R. E. (2004). Alzheimer's disease: one disorder, too many genes? *Hum Mol Genet*, 13 Spec No 1, R135-141. doi:10.1093/hmg/ddh077

Brandt, R., Gergou, A., Wacker, I., Fath, T., & Hutter, H. (2009). A *Caenorhabditis elegans* model of tau hyperphosphorylation: induction of developmental defects by transgenic overexpression of Alzheimer's disease-like modified tau. *Neurobiol Aging*, 30(1), 22-33. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.05.011

Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*, 25(24). doi:10.3390/molecules25245789

Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71-94. doi:10.1093/genetics/77.1.71

Cakir, B., Xiang, Y., Tanaka, Y., Kural, M. H., Parent, M., Kang, Y. J., . . . Park, I. H. (2019). Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system. *Nat Methods*, 16(11), 1169-1175. doi:10.1038/s41592-019-0586-5

Carmine-Simmen, K., Proctor, T., Tschäpe, J., Poeck, B., Triphan, T., Strauss, R., & Kretzschmar,

- D. (2009). Neurotoxic effects induced by the *Drosophila* amyloid-beta peptide suggest a conserved toxic function. *Neurobiol Dis*, 33(2), 274-281. doi:10.1016/j.nbd.2008.10.014
- Choi, S. H., Kim, Y. H., Hebisch, M., Sliwinski, C., Lee, S., D'Avanzo, C., . . . Kim, D. Y. (2014). A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature*, 515(7526), 274-278. doi:10.1038/nature13800
- Cohen, R. M., Rezai-Zadeh, K., Weitz, T. M., Rentsendorj, A., Gate, D., Spivak, I., . . . Town, T. (2013). A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric a β , and frank neuronal loss. *J Neurosci*, 33(15), 6245-6256. doi:10.1523/jneurosci.3672-12.2013
- Cook, S. J., Jarrell, T. A., Brittin, C. A., Wang, Y., Bloniarz, A. E., Yakovlev, M. A., . . . Emmons, S. W. (2019). Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes. *Nature*, 571(7763), 63-71. doi:10.1038/s41586-019-1352-7
- Corsi, A. K. (2006). A biochemist's guide to *Caenorhabditis elegans*. *Anal Biochem*, 359(1), 1-17. doi:10.1016/j.ab.2006.07.033
- Cummings, J. (2018). Lessons Learned from Alzheimer Disease: Clinical Trials with Negative Outcomes. *Clin Transl Sci*, 11(2), 147-152. doi:10.1111/cts.12491
- Cummings, J. L., Morstorf, T., & Zhong, K. (2014). Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimers Res Ther*, 6(4), 37. doi:10.1186/alzrt269
- D'Aiuto, L., Zhi, Y., Kumar Das, D., Wilcox, M. R., Johnson, J. W., McClain, L., . . . Nimgaonkar, V. L. (2014). Large-scale generation of human iPSC-derived neural stem cells/early neural progenitor cells and their neuronal differentiation. *Organogenesis*, 10(4), 365-377. doi:10.1080/15476278.2015.1011921
- Dickinson, D. J., Ward, J. D., Reiner, D. J., & Goldstein, B. (2013). Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nat Methods*, 10(10), 1028-1034. doi:10.1038/nmeth.2641
- Do Carmo, S., & Cuello, A. C. (2013). Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Mol Neurodegener*, 8, 37. doi:10.1186/1750-1326-8-37
- Donato, R., Miljan, E. A., Hines, S. J., Aouabdi, S., Pollock, K., Patel, S., . . . Sinden, J. D. (2007). Differential development of neuronal physiological responsiveness in two human neural stem cell lines. *BMC Neurosci*, 8, 36. doi:10.1186/1471-2202-8-36
- Drummond, E., & Wisniewski, T. (2017). Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*, 133(2), 155-175. doi:10.1007/s00401-016-1662-x
- Du, X., Wang, X., & Geng, M. (2018). Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl Neurodegener*, 7, 2. doi:10.1186/s40035-018-0107-y
- Ferreira-Vieira, T. H., Guimaraes, I. M., Silva, F. R., & Ribeiro, F. M. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol*, 14(1), 101-115. doi:10.2174/1570159x13666150716165726
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811. doi:10.1038/35888
- Fortini, M. E., Skupski, M. P., Boguski, M. S., & Hariharan, I. K. (2000). A survey of human disease gene counterparts in the *Drosophila* genome. *J Cell Biol*, 150(2), F23-30. doi:10.1083/jcb.150.2.f23
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., . . . et al. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*, 373(6514), 523-527. doi:10.1038/373523a0
- Geula, C., Nagykeri, N., & Wu, C. K. (2002). Amyloid-beta deposits in the cerebral cortex of the aged common marmoset (*Callithrix jacchus*): incidence and chemical composition. *Acta Neuropathol*, 103(1), 48-58. doi:10.1007/s004010100429
- Greeve, I., Kretzschmar, D., Tschäpe, J. A., Beyn, A., Brellinger, C., Schweizer, M., . . . Reifegerste, R. (2004). Age-dependent neurodegeneration and Alzheimer-amyloid plaque formation in transgenic *Drosophila*. *J Neurosci*, 24(16), 3899-3906. doi:10.1523/jneurosci.0283-04.2004
- Guo, S. (2009). Using zebrafish to assess the impact of drugs on neural development and

- function. *Expert Opin Drug Discov*, 4(7), 715-726. doi:10.1517/17460440902988464
- Hempel, H., Mesulam, M. M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., . . . Khachaturian, Z. S. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*, 141(7), 1917-1933. doi:10.1093/brain/awy132
- Harris, J. R. (2012). *Protein aggregation and fibrillogenesis in cerebral and systemic amyloid disease (Vol. 65)*: Springer Science & Business Media.
- Henstridge, C. M., & Spires-Jones, T. L. (2018). Modeling Alzheimer's disease brains in vitro. *Nat Neurosci*, 21(7), 899-900. doi:10.1038/s41593-018-0177-2
- Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S. G., Croteau, D. L., & Bohr, V. A. (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*, 15(10), 565-581. doi:10.1038/s41582-019-0244-7
- Israel, M. A., Yuan, S. H., Bardy, C., Reyna, S. M., Mu, Y., Herrera, C., . . . Goldstein, L. S. (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*, 482(7384), 216-220. doi:10.1038/nature10821
- Jones, V. C., Atkinson-Dell, R., Verkhratsky, A., & Mohamet, L. (2017). Aberrant iPSC-derived human astrocytes in Alzheimer's disease. *Cell Death Dis*, 8(3), e2696. doi:10.1038/cddis.2017.89
- Kametani, F., & Hasegawa, M. (2018). Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*, 12, 25. doi:10.3389/fnins.2018.00025
- Karadakovan, A. (2005). YAŞLILARDA SAĞLIK SORUNLARI. *Ege Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Dergisi*, 21(2), 169-179.
- Kelava, I., & Lancaster, M. A. (2016a). Dishing out mini-brains: Current progress and future prospects in brain organoid research. *Dev Biol*, 420(2), 199-209. doi:10.1016/j.ydbio.2016.06.037
- Kelava, I., & Lancaster, M. A. (2016b). Stem Cell Models of Human Brain Development. *Cell Stem Cell*, 18(6), 736-748. doi:10.1016/j.stem.2016.05.022
- Kim, C. (2015). iPSC technology--Powerful hand for disease modeling and therapeutic screen. *BMB Rep*, 48(5), 256-265. doi:10.5483/bmbrep.2015.48.5.100
- Koch, P., Tamboli, I. Y., Mertens, J., Wunderlich, P., Ladewig, J., Stüber, K., . . . Walter, J. (2012). Presenilin-1 L166P mutant human pluripotent stem cell-derived neurons exhibit partial loss of γ -secretase activity in endogenous amyloid- β generation. *Am J Pathol*, 180(6), 2404-2416. doi:10.1016/j.ajpath.2012.02.012
- Kovalevich, J., Santerre, M., & Langford, D. (2021). Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Methods Mol Biol*, 2311, 9-23. doi:10.1007/978-1-0716-1437-2_2
- Kraemer, B. C., Zhang, B., Leverenz, J. B., Thomas, J. H., Trojanowski, J. Q., & Schellenberg, G. D. (2003). Neurodegeneration and defective neurotransmission in a *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(17), 9980-9985. doi:10.1073/pnas.1533448100
- Kumar, A., Sidhu, J., Goyal, A., & Tsao, J. W. (2022). Alzheimer Disease. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.
- LaFerla, F. M., & Green, K. N. (2012). Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(11). doi:10.1101/cshperspect.a006320
- Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014). Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, 9(10), 2329-2340. doi:10.1038/nprot.2014.158
- Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C. A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurlles, M. E., . . . Knoblich, J. A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 501(7467), 373-379. doi:10.1038/nature12517
- Leon, W. C., Canneva, F., Partridge, V., Allard, S., Ferretti, M. T., DeWilde, A., . . . Cuello, A. C. (2010). A novel transgenic rat model with a full Alzheimer's-like amyloid pathology displays pre-plaque intracellular amyloid-beta-associated cognitive impairment. *J Alzheimers Dis*, 20(1), 113-126. doi:10.3233/jad-2010-1349
- Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van Slegtenhorst, M., . . . Hutton, M. (2000). Neurofibrillary tangles, amyotrophy and

progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet*, 25(4), 402-405. doi:10.1038/78078

Li, C., & Götz, J. (2017). Tau-based therapies in neurodegeneration: opportunities and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 16(12), 863-883. doi:10.1038/nrd.2017.155

Li, X., Bao, X., & Wang, R. (2016). Experimental models of Alzheimer's disease for deciphering the pathogenesis and therapeutic screening (Review). *Int J Mol Med*, 37(2), 271-283. doi:10.3892/ijmm.2015.2428

Link, C. D. (1995). Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(20), 9368-9372. doi:10.1073/pnas.92.20.9368

Liu, X. H., Ning, F. B., Zhao, D. P., Chang, Y. Y., Wu, H. M., Zhang, W. H., & Yu, A. L. (2021). Role of miR-211 in a PC12 cell model of Alzheimer's disease via regulation of neurogenin 2. *Exp Physiol*, 106(4), 1061-1071. doi:10.1113/ep088953

Luo, L., Tully, T., & White, K. (1992). Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for *Appl* gene. *Neuron*, 9(4), 595-605. doi:10.1016/0896-6273(92)90024-8

McColl, G., Roberts, B. R., Gunn, A. P., Perez, K. A., Tew, D. J., Masters, C. L., . . . Bush, A. I. (2009). The *Caenorhabditis elegans* A beta 1-42 model of Alzheimer disease predominantly expresses A beta 3-42. *J Biol Chem*, 284(34), 22697-22702. doi:10.1074/jbc.C109.028514

McColl, G., Roberts, B. R., Pukala, T. L., Kenche, V. B., Roberts, C. M., Link, C. D., . . . Cherny, R. A. (2012). Utility of an improved model of amyloid-beta (A β ₁₋₄₂) toxicity in *Caenorhabditis elegans* for drug screening for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*, 7, 57. doi:10.1186/1750-1326-7-57

Meng, M., Zhang, L., Ai, D., Wu, H., & Peng, W. (2021). β -Asarone Ameliorates β -Amyloid-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells by Activating P13K/Akt/Nrf2 Signaling Pathway. *Front Pharmacol*, 12, 659955. doi:10.3389/fphar.2021.659955

Mesulam, M. M. (2013). Cholinergic circuitry of the human nucleus basalis and its fate in Alzheimer's disease. *J Comp Neurol*, 521(18), 4124-4144. doi:10.1002/cne.23415

Meyer, K., Feldman, H. M., Lu, T., Drake, D., Lim, E. T., Ling, K. H., . . . Yankner, B. A. (2019). REST and Neural Gene Network Dysregulation in iPSC Models of Alzheimer's Disease. *Cell Rep*, 26(5), 1112-1127.e1119. doi:10.1016/j.celrep.2019.01.023

Morris, M., Knudsen, G. M., Maeda, S., Trinidad, J. C., Ioanoviciu, A., Burlingame, A. L., & Mucke, L. (2015). Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci*, 18(8), 1183-1189. doi:10.1038/nn.4067

Muratore, C. R., Rice, H. C., Srikanth, P., Callahan, D. G., Shin, T., Benjamin, L. N., . . . Young-Pearse, T. L. (2014). The familial Alzheimer's disease APPV717I mutation alters APP processing and Tau expression in iPSC-derived neurons. *Hum Mol Genet*, 23(13), 3523-3536. doi:10.1093/hmg/ddu064

Nzou, G., Wicks, R. T., Wicks, E. E., Seale, S. A., Sane, C. H., Chen, A., . . . Atala, A. J. (2018). Human Cortex Spheroid with a Functional Blood Brain Barrier for High-Throughput Neurotoxicity Screening and Disease Modeling. *Sci Rep*, 8(1), 7413. doi:10.1038/s41598-018-25603-5

Ormel, P. R., Vieira de Sá, R., van Bodegraven, E. J., Karst, H., Harschnitz, O., Sneebouer, M. A. M., . . . Pasterkamp, R. J. (2018). Microglia innately develop within cerebral organoids. *Nat Commun*, 9(1), 4167. doi:10.1038/s41467-018-06684-2

Park, J., Wetzel, I., Marriott, I., Dréau, D., D'Avanzo, C., Kim, D. Y., . . . Cho, H. (2018). A 3D human triculture system modeling neurodegeneration and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*, 21(7), 941-951. doi:10.1038/s41593-018-0175-4

Penney, J., Ralvenius, W. T., & Tsai, L. H. (2020). Modeling Alzheimer's disease with iPSC-derived brain cells. *Mol Psychiatry*, 25(1), 148-167. doi:10.1038/s41380-019-0468-3

Prüßing, K., Voigt, A., & Schulz, J. B. (2013). *Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*, 8, 35. doi:10.1186/1750-1326-8-35

Qian, X., Song, H., & Ming, G. L. (2019). Brain organoids: advances, applications and challenges. *Development*, 146(8). doi:10.1242/dev.166074

- Ramalingam, M., Kim, H., Lee, Y., & Lee, Y. I. (2018). Phytochemical and Pharmacological Role of Liquiritigenin and Isoliquiritigenin From Radix Glycyrrhizae in Human Health and Disease Models. *Front Aging Neurosci*, 10, 348. doi:10.3389/fnagi.2018.00348
- Raska, J., Hribkova, H., Klimova, H., Fedorova, V., Barak, M., Barta, T., . . . Bohaciakova, D. (2021). Generation of six human iPSC lines from patients with a familial Alzheimer's disease (n = 3) and sex- and age-matched healthy controls (n = 3). *Stem Cell Res*, 53, 102379. doi:10.1016/j.scr.2021.102379
- Ricciarelli, R., & Fedele, E. (2017). The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Curr Neuropharmacol*, 15(6), 926-935. doi:10.2174/1570159x15666170116143743
- Rodriguez-Callejas, J. D., Fuchs, E., & Perez-Cruz, C. (2016). Evidence of Tau Hyperphosphorylation and Dystrophic Microglia in the Common Marmoset. *Front Aging Neurosci*, 8, 315. doi:10.3389/fnagi.2016.00315
- Sabbagh, J. J., Kinney, J. W., & Cummings, J. L. (2013). Animal systems in the development of treatments for Alzheimer's disease: challenges, methods, and implications. *Neurobiol Aging*, 34(1), 169-183. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.02.027
- Schmidt, R., Strähle, U., & Scholpp, S. (2013). Neurogenesis in zebrafish - from embryo to adult. *Neural Dev*, 8, 3. doi:10.1186/1749-8104-8-3
- Schneider, L. S., Mangialasche, F., Andreasen, N., Feldman, H., Giacobini, E., Jones, R., . . . Kivipelto, M. (2014). Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: an appraisal from 1984 to 2014. *J Intern Med*, 275(3), 251-283. doi:10.1111/joim.12191
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*, 8(6), 595-608. doi:10.15252/emmm.201606210
- Shenoy, A., Banerjee, M., Upadhya, A., Bagwe-Parab, S., & Kaur, G. (2022). The Brilliance of the Zebrafish Model: Perception on Behavior and Alzheimer's Disease. *Front Behav Neurosci*, 16, 861155. doi:10.3389/fnbeh.2022.861155
- Shiple, M. M., Mangold, C. A., & Szpara, M. L. (2016). Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *J Vis Exp*(108), 53193. doi:10.3791/53193
- Sierra-Fonseca, J. A., Najera, O., Martinez-Jurado, J., Walker, E. M., Varela-Ramirez, A., Khan, A. M., . . . Roychowdhury, S. (2014). Nerve growth factor induces neurite outgrowth of PC12 cells by promoting G β -microtubule interaction. *BMC Neurosci*, 15, 132. doi:10.1186/s12868-014-0132-4
- Song, L., Yuan, X., Jones, Z., Vied, C., Miao, Y., Marzano, M., . . . Li, Y. (2019). Functionalization of Brain Region-specific Spheroids with Isogenic Microglia-like Cells. *Sci Rep*, 9(1), 11055. doi:10.1038/s41598-019-47444-6
- Sproul, A. A., Jacob, S., Pre, D., Kim, S. H., Nestor, M. W., Navarro-Sobrinho, M., . . . Noggle, S. A. (2014). Characterization and molecular profiling of PSEN1 familial Alzheimer's disease iPSC-derived neural progenitors. *PLoS One*, 9(1), e84547. doi:10.1371/journal.pone.0084547
- t Hart, B. A., & Massacesi, L. (2009). Clinical, pathological, and immunologic aspects of the multiple sclerosis model in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *J Neuropathol Exp Neurol*, 68(4), 341-355. doi:10.1097/NEN.0b013e31819f1d24
- Tardif, S. D., Mansfield, K. G., Ratnam, R., Ross, C. N., & Ziegler, T. E. (2011). The marmoset as a model of aging and age-related diseases. *Ilar j*, 52(1), 54-65. doi:10.1093/ilar.52.1.54
- Tardif, S. D., Smucny, D. A., Abbott, D. H., Mansfield, K., Schultz-Darken, N., & Yamamoto, M. E. (2003). Reproduction in captive common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Comp Med*, 53(4), 364-368.
- Tong, Y., Bai, L., Gong, R., Chuan, J., Duan, X., & Zhu, Y. (2018). Shikonin Protects PC12 Cells Against β -amyloid Peptide-Induced Cell Injury Through Antioxidant and Antiapoptotic Activities. *Sci Rep*, 8(1), 26. doi:10.1038/s41598-017-18058-7
- Trinchese, F., Liu, S., Ninan, I., Puzzo, D., Jacob, J. P., & Arancio, O. (2004). Cell cultures from animal models of Alzheimer's disease as a tool for faster screening and testing of drug efficacy. *J Mol Neurosci*, 24(1), 15-21. doi:10.1385/jmn:24:1:015

- TÜİK. (2021). İstatistiklerle Yaşlılar, 2020. Retrieved from <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Istatistiklerle-Yasli-lar-2020-37227>
- Wittmann, C. W., Wszolek, M. F., Shulman, J. M., Salvaterra, P. M., Lewis, J., Hutton, M., & Feany, M. B. (2001). Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science*, 293(5530), 711-714. doi:10.1126/science.1062382
- Wong, W. (2020). Economic burden of Alzheimer disease and managed care considerations. *Am J Manag Care*, 26(8 Suppl), S177-s183. doi:10.37765/ajmc.2020.88482
- Xicoy, H., Wieringa, B., & Martens, G. J. (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener*, 12(1), 10. doi:10.1186/s13024-017-0149-0
- Xie, D., Deng, T., Zhai, Z., Sun, T., & Xu, Y. (2022). The cellular model for Alzheimer's disease research: PC12 cells. *Front Mol Neurosci*, 15, 1016559. doi:10.3389/fnmol.2022.1016559
- Yagi, T., Ito, D., Okada, Y., Akamatsu, W., Nihei, Y., Okano, H., & Suzuki, N. (2012). [Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells]. *Rinsho Shinkeigaku*, 52(11), 1134-1136. doi:10.5692/clinicalneuro.52.1134
- Yagi, T., Ito, D., Okada, Y., Akamatsu, W., Nihei, Y., Yoshizaki, T., . . . Suzuki, N. (2011). Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet*, 20(23), 4530-4539. doi:10.1093/hmg/ddr394
- Yagi, Y., Tomita, S., Nakamura, M., & Suzuki, T. (2000). Overexpression of human amyloid precursor protein in *Drosophila*. *Mol Cell Biol Res Commun*, 4(1), 43-49. doi:10.1006/mcbr.2000.0248
- Yang, J., Li, S., He, X. B., Cheng, C., & Le, W. (2016). Induced pluripotent stem cells in Alzheimer's disease: applications for disease modeling and cell-replacement therapy. *Mol Neurodegener*, 11(1), 39. doi:10.1186/s13024-016-0106-3
- Ye, Y., & Fortini, M. E. (1999). Apoptotic activities of wild-type and Alzheimer's disease-related mutant presenilins in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol*, 146(6), 1351-1364. doi:10.1083/jcb.146.6.1351
- Yu, X., Li, Y., & Mu, X. (2020). Effect of Quercetin on PC12 Alzheimer's Disease Cell Model Induced by A β (25-35) and Its Mechanism Based on Sirtuin1/Nrf2/HO-1 Pathway. *Biomed Res Int*, 2020, 8210578. doi:10.1155/2020/8210578
- Zeng, Z., Xu, J., & Zheng, W. (2017). Artemisinin protects PC12 cells against β -amyloid-induced apoptosis through activation of the ERK1/2 signaling pathway. *Redox Biol*, 12, 625-633. doi:10.1016/j.redox.2017.04.003
- Zhou, H., Hu, S., Matveev, R., Yu, Q., Li, J., Khaitovich, P., . . . Tang, K. (2015). A Chronological Atlas of Natural Selection in the Human Genome during the Past Half-million Years. In: bioRxiv.
- Zuroff, L., Daley, D., Black, K. L., & Koronyo-Hamaoui, M. (2017). Clearance of cerebral A β in Alzheimer's disease: reassessing the role of microglia and monocytes. *Cell Mol Life Sci*, 74(12), 2167-2201. doi:10.1007/s00018-017-2463-7