

# ALZHEİMER HASTALIĞINDA DENEYSEL HAYVAN MODELLERİ

Hatice Kübra Elçioğlu<sup>1</sup>, Gizem Yılmaz<sup>2</sup>, Birkan İlhan<sup>3</sup>, Mehmet Akif Karan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, İstanbul

<sup>2</sup>Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, İstanbul

<sup>3</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Geriatri Bilim Dalı, İstanbul

## ÖZET

Alzheimer hastalığı (AH); yaşla ilişkili, progresif kognitif zedelenme ile karakterize bir hastalıktır. AH'de beyinde, ekstraselüler amiloid plakların birikimi, intraselüler nörofibriler yumaklar (NFY) ve sinir kaybı gözlemlenir. İnsanlarda AH'nin pre-klinik basamaktaki nöropatojisinin ortaya çıkarılması kolay değildir. Transgenik hayvan modelleri ile pre-klinik basamakta AH'ye neden olan mekanizmaların anlaşılması ve potansiyel yeni terapötik araçların geliştirilmesi amaçlanmıştır. McGill-R-Thy1-APP sıçan modeli, taşıdığı tek transgen ile AH benzeri amiloid patolojisinin benzerini oluşturma özelliği olan yegane modeldir. A $\beta$ , AH'nin başlangıcı ve ilerlemedeki en olası faktör olarak bilinmektedir. A $\beta$  bağımlı sıçan modelinde, artmış A $\beta$  düzeyi ve kognitif azalma arasında ciddi bir paralellik olduğu görülmektedir. AH gelişiminde bilinen riskli genler

otozomal dominant mutasyonları içeren amiloid prekürsör protein (APP), presenilin-1 (PS-1), presenilin-2 (PS-2) genleri olarak tanımlanmaktadır. Tau patolojisine sahip transgenik sıçan modelinde, beyinde Tau artışında mutant APP/PS1 geninde aşırı ekspresyonun rol oynadığı gösterilmiştir. AH'de kullanılan transgenik hayvan modellerine alternatif olarak, A $\beta$  enjeksiyonu yapılan hayvan modelleri de geliştirilmiştir. Bu modelde, sıçanların hipokampusundaki CA3 bölgesine A $\beta$ 1-42 enjekte edildikten sonra davranışsal cevaplarda sürekli bir azalmanın olduğu gözlemlenmiştir. Klinik olarak hastalık teşhis edildikten sonra beyin ilerleyici ve geri dönüşümsüz olarak hasarlanmaktadır, halen bunu düzelteren bir tedavi de mevcut değildir.

**Anahtar kelimeler:** Amiloid beta, Alzheimer hastalığı, nörofibriler yumak, Tau, transgenik hayvan modelleri. Nobel Med 2018; 14(1): 5-13

## EXPERIMENTAL ANIMAL MODELS FOR ALZHEIMER DISEASE

### ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) which is an age related disorder is characterized by progressive cognitive decline. Accumulation of extracellular amyloid plaques, intracellular neurofibrillary tangles and neuronal loss is observed in AD brain. Exploring the neuropathology of AD in human pre-clinical stages is not easy. Mechanisms which causes AD in preclinical stage and potential new therapeutic targets are understood by transgenic animal models. McGill-R-Thy1-APP rat model is the only model to reproduce AD-like amyloid pathology with a single transgene. A $\beta$  has been the most cited probable causative factor in the onset and progression of AD. In A $\beta$ -based rodent models, there

is a significant correlation between increased A $\beta$  levels and cognitive decline. Risk genes in the development of AD are amyloid precursor protein (APP), presenilin-1 (PS-1), presenilin-2 (PS-2) which contain autosomal dominant mutations. In rat models of Tau pathology, transgenic rats which overexpress mutant APP/PS1 display increased Tau alterations in the brain. Injection of A $\beta$  into rat brain is an alternative AD animal model to the use of transgenic animals. In this model, after A $\beta$ 1-42 is injected into the CA3 region of hippocampus, progressive decline in behavioral responses are observed. Despite the large variety of therapeutic approaches, AD remains incurable. Because, in clinical diagnosis stage, the brain has suffered irreversible and extensive damage.

**Keywords:** Alzheimer, amyloid  $\beta$ , neurofibrillary tangles, Tau, transgenic animal models. Nobel Med 2018; 14(1): 5-13

## GİRİŞ

### 1. Alzheimer Hastalığı Patogenezi

Bilim dünyasında Alzheimer Hastalığı (AH) ve sonuçlarının daha iyi anlaşılmasına başlaması hastalığın tedavisi ile ilgili çalışmaları artırmıştır. AH patogenezi, konusunda çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen bu konudaki araştırmalar halen devam etmektedir. Amiloid beta (A $\beta$ ) peptid, nörofibriler yumaklar (NFY) ve hiperfosforile Tau proteini hastalığın en önemli patolojik bulguları olarak kabul edilmektedir. Ayrıca inflamasyon, oksidatif hasar, glutamat eksitotoksitesi, insülin direnci, kolinerjik kayıp ve sinaps-nöron kaybı gibi faktörlerin de bu nörodejenerasyona katkıda bulunduğu düşünülmektedir.<sup>1</sup> AH'de beyinde, NFY'nin içinde hiperfosforile Tau ve senil plakların içinde A $\beta$  peptid olmak üzere bölgesel olarak biriken karakteristik anormal protein agregatları ve ayrıca progresif beyin atrofi mevcuttur. AH ile ilgili yapılan son çalışmalarda, çok sayıda faktörün hastalık riskini ve ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir. AH'de inflamasyona bağlı olarak oluşan proinflamatuvar sitokinlerden tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-1 (özellikle IL-1 $\beta$ ) ve IL-6'nın BOS'ta artışı bildirilmiştir. Artmış TNF- $\alpha$ 'nın endotelial ve mikrovasküler disfonksiyonda rol aldığı ve bu durumun amiloid plak oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir.<sup>2</sup>

AH'nin erken evresindeki kognitif bozulma ile insülin rezistansı arasındaki ilişki A $\beta$ 'nin artmasına bağlıdır. İnsülin, pankreasın beta hücrelerinden salgılanarak periferde glukoz homeostazının sürdürülmesini sağlamaktadır. Ayrıca insülinin,

beyinde metabolizma ve bilişsel fonksiyonlar üzerinde önemli rolünün olduğu bilinmektedir.<sup>3</sup> İnsülin, MEK-ERK yoluyla aracılığı ile A $\beta$  üretimini etkilemektedir. Böylelikle beyindeki net birikimin APP, SORLA, AMPK ve ApoE tarafından iyice entegre olmuş biçimde düzenlendiği görülmektedir. Örneğin; ApoE, A $\beta$ 'nin parçalanması ve bağlanması direkt olarak düzenlerken, beyindeki insülin sinyalini ve glukozu da azaltmaktadır.<sup>4</sup>

Hipokampusta, ERK kaskadının, uzun dönemli potensiyalizasyon (LTP) ve hafıza güçlendirmenin uyarılması ve sürdürülmesi için gerekli olduğu gösterilmiştir. Çünkü ERK kaskadı, CaMKII, PKA ve PKC içeren çok sayıda sinyal kaskadının birbirine yaklaşmasını sağlamakta ve hücre homeostazını içeren çok sayıda reseptör ve ikincil mesajcılar tarafından aktive edilmektedir.<sup>4</sup>

Beta amiloid birikimine bağlı olarak, hücreler arası iletişim bozulmakta, hücre ölümü artmakta ve sonuçta doku (ya da organ) işlev göremez hale gelmektedir. A $\beta$ 'lerin içinde A $\beta$ 40 ve A $\beta$ 42 en yaygın görülen formdur ve A $\beta$ 42'nin A $\beta$ 40'a oranının önemli olduğu düşünülmektedir. Bu oran AH'nin başlangıcı için önemli bir kriter olmamakla birlikte total amiloid yükünde bireyler arası varyasyonlara neden olabilmektedir. Her iki form da toksik olmasına rağmen A $\beta$ 42 çözünmez ve amiloid plaklarda birikir, erken dendritik ve sinaptik hasara dolayısıyla da nöronal sitotoksite nedeniyle beyinde nörodejenerasyona yol açar.<sup>5</sup> Hatta A $\beta$ 40'ın, A $\beta$ 42 oligomerizasyonunu inhibe ettiği de gösterilmiştir. Bu nedenle, amiloid kaskad hipotezine göre A $\beta$ 42 seviyesinin artmasının AH başlangıcı ile daha fazla

paralellik gösterdiği öngörülmektedir. Tg2576 farelerinde, A $\beta$ 42'nin A $\beta$ 40'a oranının Morris Water Maze (MWM, hafıza-öğrenme testi) veya Novel Object Recognition (NOR, yeni obje tanıma testi) testleri ile ilişkisi incelendiğinde mekânsal işlevlerdeki ve hafızadaki problemler ile A $\beta$  oranları arasında doğrusal bir ilişki olduğu gösterilmiştir.<sup>6</sup> Bununla birlikte, bazı yazarlar amiloid kaskad hipotezinde sorunlar olduğunu vurgulamakta ve A $\beta$ 42'nin AH'nin başlangıcına neden olan bir faktör olmadığını iddia etmektedir.<sup>7</sup>

## 2. Alzheimer Hastalığı Risk Faktörleri

AH vakaları 'erken başlangıçlı' veya 'sporadik geç başlangıçlı' olarak sınıflandırılır, vakaların %95'inden fazlası sporadik geç başlangıçlı AH'dir. Erken başlangıçlı AH (ailesel), bazen 30 yaşından önce semptomları gözükmeyle birlikte, genellikle kalıtsal olarak otozomal dominant gen mutasyonu yüzünden 65 yaşından önce hastalığın geliştiği bireyler olarak tanımlanmaktadır. AH gelişiminde bilinen riskli genler otozomal dominant mutasyonları içeren APP, presenilin-1 (PS-1), presenilin-2 (PS-2) genleri olarak tanımlanmaktadır. Geç başlangıçlı AH gelişme riskinin, genetik ve çevresel risk faktörleri arasındaki etkileşim nedeniyle arttığı düşünülmektedir. APOE- $\epsilon$ 4'ün geç başlangıçlı AH için çok ciddi bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir.  $\epsilon$ 4 alelinden 2 tanesini taşıyan bireylerin, sadece 1 tanesini taşıyan bireylerden daha yüksek riske sahip olduğu ve her iki grubun da sadece  $\epsilon$ 2 veya  $\epsilon$ 3 formlarını taşıyan bireylerden daha fazla risk taşıdığı gösterilmiştir. Risk artmasındaki esas neden bilinmemesine rağmen, APOE'nin A $\beta$ 'nin proteolitik olarak atılımını artırdığı düşünülmektedir.  $\epsilon$ 4 varyantının,  $\epsilon$ 2 ve  $\epsilon$ 3 isoformlarına göre A $\beta$  atılımında daha az etkili olduğu gösterilmiştir. APOE- $\epsilon$ 4 taşıyıcısı olmak AH gelişmesi için gerekli olmamakla birlikte; APOE- $\epsilon$ 4 yokluğu da tam olarak koruyucu bir faktör değildir. Bu faktörlere ilaveten A $\beta$  yükünün geç başlangıçlı AH şüphesinde önemli bir etkisinin olduğu düşünülmektedir.<sup>4</sup>

## 3. Alzheimer Hastalığında Deneysel Modeller ve Avantajları

Transgenik hayvan kendi genomunda transgen olarak adlandırılan yabancı DNA parçası taşıyan hayvan olarak tanımlanır. Transgenik hayvanların üretiminde en yaygın olarak kullanılan yöntem pronükleer DNA mikroenjeksiyondur. Bu teknoloji sayesinde, doğal yetiştirme yöntemlerinden farklı olarak, pronükleer DNA mikroenjeksiyon yöntemi ile türler arasında (türden türe) da gen transferi olayı gerçekleştirilebilmektedir. Örneğin; insan genleri,

ekspresyon davranışlarının çalışılabilmesi amacıyla hayvan modellerinin üretilmesi için rodent genomu içerisine entegre edilebilmektedir.<sup>8</sup>

1990'ların ortalarında ilk transgenik farelerde AH modellerinin oluşturulması, AH'nin moleküler mekanizmasının anlaşılması açısından önemli bir keşif olarak görülmektedir. APP, presenilin-1 (PS1) ve presenilin-2 (PS2) genlerindeki mutasyonların belirlenmesine dayanılarak, AH'nin ailesel geçişli formları ile çalışılmış ve bu modellerde amiloid birikimi, anormal Tau fosforilasyonu, inflamasyon veya davranışsal bozuklukları içeren AH ile ilgili çeşitli görüşler ortaya çıkmıştır.

Transgenik fare modelleri, "Amiloid Hipotezi" olarak adlandırılan sava önemli bir katkı sağlamıştır. Transgenik modelleri kullanmak, güvenilir biomarkerleri bulabilmek ve asemptomatik basamakta tanı koymak açısından çok yararlıdır. AH patofizyolojisinin anlaşılmasında transgenik fare modellerinin çok önemli bir katkısının olduğu görülmektedir. AH'de immunoterapinin başarısız olması, daha yeni modellerin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.<sup>9</sup>

Eski çalışmalarda, teknik sebeplerin yetersizliği yüzünden gen transferi için fareler tercih edilirdi. Sıçanların farelerle karşılaştırıldığında, tek hücreli bir embriyo, az görünebilen pronükleus ve daha esnek bir plasma ve pronükleus membranına sahip oldukları görülmektedir. Bu durum pronükleusta gen enjeksiyonu yapılmasını zorlaştırmaktadır. Ayrıca enjeksiyondan sonra embriyonun düşük yaşama şansı, daha zorlu ve zaman harcayan bir yöntem olan sıçanlarda gen transferi yapılmasına yol açmıştır. Buna ek olarak, son zamanlara kadar canlı sıçanların embriyonik kök hücrelerini elde etmek zor olduğu gibi, gen yerleştirmeyi (knock in) veya mutasyonların çıkarılmasını (knock out) sağlayan güçlü cihazlar mevcut değildi.<sup>10</sup>

Tüm bu sorunlara rağmen, sıçanların çok fazla avantajlarının olduğu; fizyolojik, genetik ve morfolojik özellikleri bakımından insanlara daha fazla benzedikleri görülmektedir. Dokularının ve özellikle beyin boyutlarının daha iri olması, ilaçların intratekal uygulanmasını, serebrospinal sıvıdan çoklu örnek alınmasını kolaylaştırmaktadır. AH modeli için uygunluğu ise, insanlarda olduğu gibi sıçanların da Tau'nun 6 isoformunu içermesinden kaynaklanmaktadır. Ama Tau izoformlarının 4R/3R oranı sıçanlarda 9:1 iken, insanlarda 1:1'dir. Buna ek olarak, sıçan ve insanların apoE aminoasit dizilişleri arasında bir benzerlik olduğu görülmektedir.<sup>11</sup>

Sıçanların diğer önemli avantajları, davranışsal özelliklerinin iyi karakterize edilmiş olmasının yanı sıra farelere nazaran daha iyi ve daha hassas hareket koordinasyonuna sahip olması ve daha kompleks davranış örnekleri sergilemeleridir. Farelerin aksine, sıçanların da insanlar gibi, doğum sonrası beyin gelişimlerinin devam etmesi ve çok sayıda sinaptik aralığın olması bu davranışsal farklılığın nedeni olarak görülmektedir. Sonuç olarak AH'de kullanılan sıçan modelleri, daha karmaşık davranışsal özelliklerin belirlenmesini sağlamıştır. Bu da, patolojinin kognitif sonuçlar üzerinde etkisinin daha hassas olarak değerlendirilmesine olanak sağlamıştır.<sup>9</sup>

Sıçanların santral sinir sisteminin, insanlara daha fazla benzemesine rağmen, yine de sıçanlardan elde edilen sonuçların insana uyarlanması ciddi bir sorundur. Transgenik modellerin, ailesel AH'de ortaya çıkan patolojiye daha yakın modeller olduğu görülmektedir. Ama, minimum genetik invaziv özelliğe sahip modeller (McGill-R-Thy1-APP gibi), insanlarda seyrek görülen AH patolojisine en yakın benzerliğin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Bu modellerin belirli sınırlamaları olmasına rağmen, transgenik sıçan modellerinin, yeni tedavilerin araştırılması ve onaylanmasında ve erken pre-klinik patolojinin potansiyel biomarker sinyallerinin araştırılmasında önemli bir katkısının olacağı öngörülmektedir. Bununla birlikte, in-vivo elektrofizyoloji, görüntüleme, proteomik, epigenetik ve optogenetik çalışmaların da gelecekte çok önemli avantajlarının olabileceği düşünülmektedir.<sup>9</sup>

### 3.1. Transgenik Hayvan Modelleri

#### 3.1.1. Alzheimer Hastalığında Transgenik Sıçan Modelleri

2000'li yılların başlarından itibaren, genetiği değiştirilmiş sıçan modelleri oluşturulmaya başlanmıştır. Bu sıçanlar, erken başlangıçlı ailesel AH ile ilgili insan genlerinin (mutasyon geçirmiş APP ve PS1 geni gibi) bulunması ile ortaya çıkmıştır. Bu modeller, çeşitli faktörlerden kaynaklanan fenotip heterojenitesinin ortaya çıkmasını sağlamıştır. İlk olarak, bu transgenlerin ekspresyonu farklı nöronal promotörler (başlatıcılar) tarafından kontrol edilmiştir. Ayrıca, genetik özelliklerin, bir hastalığın gelişimi üzerinde önemli etkisi olması nedeniyle; bu modeller hem aynı soydan hem de farklı soydan genetik geçmişi olan sıçanlar arasından üretilmiştir. Çünkü genetik özelliklerin, bir hastalığın gelişimi üzerinde büyük bir etkisinin olduğu bugün çok iyi bilinmektedir. Ekspresyon zorluğunda görülen farklılıklar, döllenmiş yumurtaya transgenin geçişinde

kullanılan metodlardan kaynaklanmaktadır. Tekli, çift veya üçlü transgenlerin aktarılması ile fenotipte görülen farklılıklar açıklanabilmektedir.<sup>9</sup>

#### 3.1.2. Virüs Aracılı Sıçan Modelleri

Virüs aracılı gen transfer teknolojisinin avantajı, yetişkin (olgun) sıçan hipokampusundaki Swedish mutasyonu taşıyan insan APP695 geninin ekspresyonuna olanak sağlamasıdır. Bu modelde, enjeksiyondan sonra 12 aya kadar süren öğrenme eksikliğini ve A $\beta$ 42 immun reaksiyonunu uyarmaktadır. Ama bu enjeksiyon, A $\beta$  plaklarının birikimine ve sinir kaybına neden olmamaktadır.<sup>9</sup>

#### 3.1.3. Tau Patolojisinin Sıçan Modelleri

Genetiği değiştirilmiş çeşitli sıçan modelleri, insan Tau proteininin mutasyon geçirmiş formlarının açıklanmasında kullanılmıştır. Mutasyon geçirmiş Tau proteini, nörofibriler bozulmanın gelişmesine neden olmaktadır. Çünkü, sıçanlar da insanlar gibi, 6 tane Tau isoformu taşımaktadırlar. Bu durum, Tau patolojisi sıçan modellerinin oluşturulmasını sağlamıştır. Nöronlarda bulunan kesik, mutasyona uğramamış insan Tau proteininin aşırı ekspresyonu, hem Tau'nun hiperfosforilasyonuna hem de AH'de olduğu gibi nörofibriler bozulmanın gelişmesine neden olmaktadır. Davranış analizleri ile hem ilerleyen kognitif azalma hem de sensorimotor (duyu-motor) ve refleks cevabındaki bozukluklar aydınlatılmaktadır. Bu bozuklukların; NFY ve olgun Tau kompleksinin sürekli birikimi ve beyin sapı ile omurilikteki aşırı aksonal hasar ile doğru orantılı olduğu kanıtlanmıştır. Korteks ve hipokampusta aşırı fosforillenmiş Tau gözlemlenmesine rağmen, beyinde nöron kaybının olmadığı görülmektedir. Ayrıca bu bozulmaların, yaşam süresinin kısalmasına neden olduğu bulunmuştur.<sup>12</sup>

İlk sıçan modeli, korteksteki NFY oluşumunun ve kesilmiş, mutasyon geçirmemiş insan Tau proteininin (3 tekrarlı alanı kapsayan) anlaşılmasını sağlamıştır. Bu sıçanlarda 9 aya kadar, ilerleyici nörofibriler bozulma görülürken, şaşırtıcı olarak kortekste, yumağın aşırı biriktiği bölgede veya insan Tau proteini ekspresyonunun en fazla görüldüğü bölgede, nöron ölümü görülmemiştir. Ama, bu sıçanların yaşam süreleri kısalmıştır. Gelecek yıllarda daha fazla Tau gen transferi modellerinin çalışılması hedeflenmektedir.<sup>9</sup>

#### 3.1.3. Amiloid Beta Tarafından Uyarılan Tau Patolojisinin in Vivo Modelleri

Farklı hayvanlarda geliştirilen AH modelleri, A $\beta$  tarafından uyarılan Tau patolojisini özetlemektedir.

Mutant APP veya mutant APP/PS1'i eksprese eden fakat Tau'nun aşırı eksprese olmadığı; NFY ve bir miktar Tau agregasyonu olan fareler incelenmiştir. Bu farelerde A $\beta$  yükü aracılığı ile endojen fare Tau'su üzerinde hiperfosforilasyonu da kapsayan önemli değişikliklerin uyarıldığı görülmüştür.

Bununla birlikte, yüksek plak yükü olan modellerin, yaşlı plakların etrafını saran hiperfosforile olmuş patolojik tau'yu içeren distrofik nöritlerin varlığında rol oynadığı belirtilmektedir. NFY oluşumundaki eksikliğin, endojen fare Tau proteininin NFY oluşturmak için yatkınlığının düşük olması ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Mutant APP/PS1 geninde aşırı ekspresyon görülen transgenik sıçanların beyinde Tau artışı gösterilmiştir. Bu Tau değişiklikleri ilk olarak, p-Tau'ya karşı antikör oluşumu, adapte olabilecek şekilde değiştirilmiş Tau, aşırı ekspresyondan bağımsız Tau, wild-type (tipik) Tau'nun genetik geçmişi olarak belirtilmiştir. Fare modelleri ile olan farklılığının, fare ve sıçan Tau proteininin farklı özelliklere sahip olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. Özellikle farklı isoformlarının farklı seviyelerde ekspresyonunun olması bu farklılığı açıklamaktadır.<sup>13</sup>

### 3.1.4. İnsülin Direnci ve Alzheimer Hastalığı Arasındaki İlişkili Kapsayan Hayvan Modelleri

AH'nin teşhis ve evrelemesi, hastalığın biomarker profili ile ilişkisini çalışmak için yeniden düzenlenmektedir. Klinik evrelerinin düzenlenmesi ile mekanik olarak tasarlanmış hayvan modellerinde orta derecede kognitif bozulmanın olduğu gösterilmiş ve bu modellerin AH'nin klinik öncesi basamağını temsil ettiği gerçeği ortaya çıkarılmıştır.<sup>4</sup>

AH genetik fare modelleri hastalığın insandaki tüm spektrumunu tamamen yansıtamamasına rağmen; hastalığın patolojisinin anlaşılmasında ve hastalığın mekanizması üzerinde çalışılmasında, potansiyel tedavi stratejilerinin test edilmesinde oldukça önemlidir. Ailesel AH'na sebep olduğu bilinen gen mutasyonları, geç başlangıçlı AH'de gözlemlenene benzer bir patoloji ortaya çıkarmaktadır. Bu modellerin çoğu, ailesel AH ile ilgili mutasyonları içeren insan transgenlerini açıklamaktadır. Çok sayıda AH transgenik fare modelleri bulunmaktadır. Bu modellerin, anormal bir sürecin oluşmasına zemin hazırladığı ve A $\beta$ 'nin (Tg2576, PDAPP, presenilin conditional KO/APP, PS1/APP, CRND8, PGDF-APPSW) ve NFY oluşumu için mutant Tau'nun birikmesine neden olduğu görülmektedir. Bu modellerin tamamı; korku durumunu, Morris water maze'yi içeren davranışsal paradigmalardaki çeşitlilikleri ve yaşa bağımlı kognitif azalmayı ortaya

çıkarmaktadır. Bu davranışlar düzenli hipokampal fonksiyonun varlığını gerektirmektedir. AH'nin yeni tanımlanmış prelinik basamağını içeren erken evresinden hipokampusun sorumlu olduğu öngörülmektedir.<sup>4</sup>

Nöroinflamasyon ve insülin direnci ile birlikte bozulmuş mitokondrial fonksiyon ve kolesterol metabolizması; obezite, tip-2 diyabet, metabolik sendrom, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi çeşitli kronik hastalıklarda yaygın olarak görülmektedir. Bu homeostatik süreçteki ciddi bozulma, AH'nin teşhisinde ayırıcı bir özellik olarak görülmektedir. AH'de kullanılan Tg2576 fare modeli; hastalığın başlarında görülen hipokampal bozukluk ve kognitif azalmanın bu sürece nasıl bir katkısının olduğunun anlaşılmasını sağlamaktadır. Mevcut çalışmalar, AH ve insülin rezistansı için alternatif modellerin çeşitli örneklerini içerirken, bu konudaki en kapsamlı çalışmanın Tg2576 fare modeli ile elde edildiği belirtilmiştir. Bu model kognitif eksikliğin altında yatan mekanizmayı incelemek için uygun bir model olarak görülmektedir. Tg2576 fareler, ailesel Swedish mutasyonunu içeren insan APP695 genini eksprese etmekte ve bu durum da 2 aya kadar A $\beta$ 'nin artışına neden olmaktadır. A $\beta$ 'nin yaşa bağımlı birikiminin ortaya çıkması ile 12 aya kadar plak oluşumuna neden olduğu görülmektedir. 5-6. aylarda ortaya çıkan hipokampal sinaptik ve kognitif bozulma ile ilişkili olan AH'den, A $\beta$ 'nin çözünebilir oligomerik formunun birikiminin sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Tg2576 fareler, NFY oluşturmasına rağmen 5 ay sonunda oligomerik Tau'nun birikimine neden olmaktadır. Ayrıca son çalışmalarda toksik türlerin ortaya çıktığı ve bununla birlikte kognitif azalmanın görüldüğü belirtilmiştir. Tg2576'nın nörodejenerasyonda rol oynadığı henüz açıkça gösterilememekle birlikte Tg2576 hipokampusunda sinir ve hacim kaybının olduğu bildirilmiştir. Bu durumun da AH'nin başlangıç ve prelinik basamağındaki kognitif bozulma ile orantılı olduğu düşünülmektedir. Tg2576 farelerde, hipokampal ERK'de, tanıma hafızasında ve ERK'e bağımlı bölümsel, ilişkili, boyutsal (episodic, associative, and spatial) öğrenme ve hafızada eksiklikler oluşmakta ve kognitif bozukluktaki tüm bu bağlantılar insanda AH'nin başlangıcı olarak tanımlanmaktadır. Tg2576 ve ilgili modeller de, AH'nin klinik öncesinden orta derecede kognitif bozulmaya patolojik olarak geçişini ortaya koymaktadır. Bu modellerin avantajı, hastalığın biomarkerlerini önceden belirleyip önlem almak ve terapötik müdahaleleri kolayca takip edebilmektir.<sup>4</sup>



### 3.1.5. Amiloid Beta'ya Bağlı Sıçan Modelleri

A $\beta$ , nörotoksisiteyi direkt olarak uyarmakta ve basal ön beyinde kolinerjik yıkıma neden olmaktadır. Ayrıca, deneysel modellerde, hafıza yeteneklerini bozduğu gözlemlenmiştir.<sup>14</sup> Sıçanlarda deneysel olarak AH'nin uyarılması için sentetik veya doğal olarak salgılanan A $\beta$  peptidlerinin farklı dozları, intraserebroventriküler veya intrahipokampal enjeksiyon yoluyla beyine verilmektedir.

Son zamanlarda transgenik ve knock out sıçanların; *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* gibi diğer transgenik modeller ve viral bir vektör ile yürütülen Alzheimer modelleri kadar iyi geliştirildiği görülmektedir. Ancak, bu modeller arasında fareler en çok kullanılan türlerdir. AH kompleks bir hastalık olduğu için hastalığın birden çok karakteristik özelliğini içeren transgenik modeller oluşturmak oldukça zor olmaktadır. Bu nedenle, transgenik modellerin çoğu, AH'nin major patolojik ayırıcı özelliklerini ortaya çıkarmaktadır.

AH model çalışmalarında esas olarak amiloid depolanması üzerinde odaklanılırken, APP'nin keşfinden sonra ailesel AH mutasyonlarını içeren transgenlerin aşırı ekspresyonuna dayandırılan modeller oluşturulmaya başlanmıştır. AH transgenik modellerin ilki 1995'te ortaya çıkmakla birlikte bu modelle beynin spesifik bölgelerinde ekstraselüler A $\beta$  üretmek için yüksek miktarda mutant APP eksprese edilmiştir. Kısaca, amiloid plakların depolanması ile birçok model geliştirilebilmektedir.<sup>14</sup>

Mutasyonun tipinin modellerdeki plak oluşumunu etkilediği görülmüştür. Örneğin; A $\beta$ 'nin N ucundaki (terminus) mutasyonlar A $\beta$ 40 ve A $\beta$ 42'de artışa neden olurken, C ucundaki mutasyonlar ise A $\beta$ 1-42 oluşumunda artışa neden olmaktadır. Bu modellerin çoğunda transgenik APP, endojen APP'den çok daha yüksek seviyede eksprese olmaktadır. AH'e benzer şekilde transgenik hayvanların çoğunda amiloid yükünün (depolanmasının) yaşa bağlı olarak ortaya çıktığı görülmektedir.<sup>14</sup>

Önceki çalışmalarda, uzun dönem hipokampal A $\beta$  (1-42) enjeksiyonuna maruz kalan sıçanlarda, önemli bir davranışsal bozukluk bildirilmemiştir. Nöronların yaşayabilme yeteneği ölçülememesine rağmen, bozulmuş davranışların olmaması, beynin ilgili bölgelerindeki nöron kaybının minimum düzeyde olduğunu ortaya koymaktadır. Mikroglial ve astroglial aktiviteye ait değişiklikler bu çalışmada belirlenmemiştir. Sonraki çalışmalarda, bozulmuş davranışların oluşumunda bir faktör olan glial cevaplardan dolayı, gecikmiş davranışsal cevaplardaki

bozukluklar anlaşılmıştır. Diğer bir çalışmada ise, kısa uzunlukta peptid (A $\beta$ 25-35) enjeksiyonu alan hayvanların nöron ve mikroglialarında, astrogliyozis ve IL-1B immunreaksiyonunun arttığı bildirilmiştir.<sup>14</sup>

Bazı çalışmalarda hayvanlarda inflamasyonla uyarılan, nöron hasarı için bir uyarı niteliği taşıyan A $\beta$  enjeksiyonunun etkileri incelenmiştir. Bu çalışmalarda davranışsal cevaplardaki bozukluklara odaklanılmıştır. Hayvan modellerinde peptid enjeksiyonu kullanmanın doğruluğunu yansıtan çok sayıda kriter belirlenmiştir. Bu kriterlerin ilkinde göre, A $\beta$  düşük miktarlarda enjekte edilmelidir. Bu durum, A $\beta$ 'nin çeşidi ile de ilişkilidir. Çünkü in vivo ortamda çözünebilen peptid türleri, agreg olmuş peptidler ile karşılaştırıldığında daha az etkili olabilir. İkinci olarak, peptid enjeksiyonu nöronun yaşayabilmesi için analiz bölgesinden ayrı, beynin iyi tanımlanmış bir bölgesinde yapılmalıdır. Bu prosedür, enjekte edilen peptidin etkisiyle oluşabilecek nöron hasarını en aza indirmek için gereklidir. İğne izi, enjeksiyon sisteminin özel olarak yerleştirilmesi için bir işaret olarak kullanılmaktadır. Üçüncü olarak, peptid enjeksiyonuna verilen cevaptaki gliozis derecesi ölçülmektedir.<sup>15</sup>

### 3.1.5.A) Plaklardan Yoksun Amiloid Patolojisinin Sıçan Modelleri

Eskiden, genetiği değiştirilmiş sıçan modellerinde, intraselüler A $\beta$  birikimi görülürken, yaşlılığın sebep olduğu plak oluşumu gösterilememiştir. Bu durumun, A $\beta$  düzeyinin yeterince artmaması nedeniyle olabileceği düşünülmektedir. Çünkü depolanma sürecinin başlayabilmesi için A $\beta$ 'nin yüksek konsantrasyonda olması gerekmektedir. Kognitif bozukluklar, plak oluşumundan bağımsız olmasına rağmen A $\beta$  oligomerleri ve diğer A $\beta$  türleri ile kognitif dejenerasyon arasında bir paralellik olduğu görülmektedir.<sup>9</sup>

AH'de sıçan modelleri ile yapılan ilk çalışmalar, klasik AH'de görülen patolojik belirtileri oluşturamaması nedeniyle başarısız olmuştur.<sup>9</sup> Bu durumun, APP'nin gen ekspresyonunun orta seviyede olması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak, UKUR25 ve UKUR28 genetiği değiştirilmiş sıçan türünde, önemli derecede intraselüler A $\beta$ 'nin birikimi görülmüştür. Bu modeller, amiloid plak oluşumundan önceki erken fazda, intraselüler A $\beta$ 'nin rolünün olduğu görüşüne önemli bir katkı sağlamıştır. Plak oluşumu olmadan intraselüler A $\beta$  birikiminin, ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK2) aktivasyonunu artırdığı gösterilmiştir. İntraselüler A $\beta$ 'nin, Tau fosforilasyonunu başlatmada rol aldığı görülmüştür. Aynı zamanda, öğrenme ve hafıza oluşumunu

sağlayan sinaptik proteinler, golgi ve lizozomlardaki morfolojik değişikliklerde de intraselüler A $\beta$ 'nin rolü olduğu ve bu nedenle öğrenme bozukluklarına yol açtığı kanıtlanmıştır.<sup>9</sup>

Intraselüler A $\beta$  birikimi, amiloid patolojisinin diğer sıçan modellerinde de gözlemlenmektedir. Bu modele benzer şekilde, Swedish mutasyonu taşıyan APP (TgAPPAswe) sıçanlarda, 18 aya kadar ekstraselüler plak veya NFY gelişimi olmamıştır. Bu sıçanlar, non-transgeniklerle karşılaştırıldığında, 6-12 ay arasında, hipokampusa bağlı görevlerde ve yemek tercihlerinin sosyal yollarla birbirlerine aktarılmasında başarılı bir performans göstermişlerdir. Modeller arasındaki bu çelişki genetik yapılarındaki farklılık ile açıklanabilmektedir. Çünkü TgAPPswe sıçanlar, düşük intraselüler A $\beta$  seviyesine yol açan AP Indiana ve PS1 Finn mutasyonları taşımamaktadır. Bununla birlikte APP'nin etkisinin doza bağımlı olduğu görülmüştür. APP'nin düşük dozlarda, normal öğrenme ve hafıza sürecinde rol oynarken, yüksek dozlarda ise kognitif olarak azalmaya ve nörodejenerasyona neden olduğu kanıtlanmıştır.<sup>9</sup>

### 3.1.5.B) Olgun Plaklarla Amiloid Patolojisinin Sıçan Modelleri

Amiloid plakların gelişmesi için kullanılan ilk model ile, Swedish ve Swedish/London mutasyonlarını taşıyan hAPP695'i ekspres eden homozigot çift sıçanlarda (Tg478/Tg1116) başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu sıçanlar hem artmış APP, A $\beta$ 40 ve A $\beta$ 42 deposu gösterirken hem de 17-18 aylıkken diffuze olmuş plakların gelişmesini sağlamaktadırlar. Mutasyon geçirmiş insan presenilin genini taşıyan 3. transgenin katılması ile (içeriye sokulması ile), plakların oluşmaya başlama yaşının daha da hızlanarak 9 aya düştüğü görülmektedir. 9 aylıktan itibaren, PSAPP sıçanların (Tg478/Tg1116/Tg11587) korteks, hipokampus, olfaktör bulbul, talamus ve hipotalamusunda çok sayıda diffuze plak oluşumu gözlemlenirken, beyincik ve beyin sapında ise plak oluşumu görülmemiştir. 22 aylıkken bile hipokampusunda sadece birkaç tane yoğun plak varlığı saptanmıştır. Damarlarda A $\beta$  birikimi gözlemlenmemiştir. (F-18) FDDNP, mikro pozitron emisyon tomografisinin kullanımı ile A $\beta$  plaklarının birikimi kanıtlanmıştır. Ayrıca astrosit ve mikrogliaların aktivasyonunun ve Tau'nun hiperfosforilasyonunun, kompakt yoğun plakların etrafında gerçekleştiği görülmüştür. Bu sıçanlar plakların yokluğunda, bozulmuş LTP ve buna eşlik eden ilerleyici davranışsal eksiklikler göstermiş ve bu durum 7 aylıkken saptanabilmiştir. Davranışsal eksikliklerin, hipokampusteki A $\beta$ 42 yükü ile doğru orantılı olduğu gösterilmiştir. Ancak,

bu sıçanlarda, nörofibriller patoloji veya sinirsel bir kayıp bulunmamaktadır. Etkili AH modellerinin kullanılması ile böbrek hastalığı, hipertansiyon ve immunosüpresyonla ilişkili prematüre ölümlere olan yatkınlığın engellendiği görülmektedir.<sup>9</sup> McGill-R-Thy1-APP sıçan modeli, taşıdığı tek transgen ile AH benzeri amiloid patolojisinin kopyasını oluşturma özelliği olan tek modeldir. Bu model, Swedish ve Indiana mutasyonlarını taşıyan hAPP751 genini açıklamaktadır. Bu sıçanlarda tek transgenin bulunması, insan APP ekspresyonunun beyin AH ile ilişkili spesifik bir bölgesinde üretilmesine olanak sağlamıştır.

## 3.2. Non-Transgenik Hayvan Modelleri

### 3.2.1. Alzheimer Hastalığında Erken Sıçan Modelleri

Gen transferinin ortaya çıkışından oldukça önce, sıçanların AH modelinde belirgin bir rol oynadığı görülmektedir. Fakat, bu modellerin birçoğu AH için tam olarak doğru, kesin bir model sistemi sunamamıştır. Çünkü bu modeller ile nörotik plakların varlığı, NFY ve sinir kaybı gösterilememiştir.

Bir kimyasal veya lezyon (yara) ile oluşturulan sıçan modelleri, AH'nin kolinerjik hipotezini test etmek için çok fazla kullanılmıştır. Bu hipoteze göre, yaşlı ve demanslı hastalardaki kolinerjik eksikliklerin, kognitif bozukluklardan sorumlu olan ana faktör olduğu öngörülmektedir. Bu durum da, semptomatik olarak antikolinesteraz ilaç tedavisinin kullanılmasına yol açmıştır. AH'de görülen kortikal kolinerjik sinirsel kaybı aktive etmek için çeşitli bileşikler kullanılmıştır. Kullanılan bu bileşikler kısmen non-spesifik olan skopolamin ve kolinerjik sinirler için spesifik olan p75NTR'dir. Lezyonla uyarılan sıçan modellerinde ise beyin travması, bilateral kesilmiş hipokampal fimbrio-fariks, ooferektomi (yumurtalığın çıkarılması) ve post iskemik beyinde hipertermi modelleri kullanılmıştır.<sup>9</sup>

### 3.2.2. Streptozotosin ile Uyarılan Alzheimer Hastalığı Modeli

Streptozotosinin (STZ), özellikle pankreatik beta hücrelerine toksik etkisinin olduğu bilinmektedir. STZ ile uyarılan diyabet modeli, organizmadaki insülin eksikliğinin etkilerini test etmek için kemirgenler üzerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu nedenle, STZ ile uyarılan diyabet modelindeki insülin eksikliği tip 1 diyabet mellitusa benzemektedir. STZ, molekülün glukoz kısmının glukoz transport 2'ye düşük afinitesi yüzünden, beta hücreleri tarafından hücre içine alınmaktadır ve nitrit oksid gibi

prooksidan molekülleri uyarmaktadır. Nitrit oksid superoksit veya oksijen ile reaksiyona girmektedir. Bu durum da, beta hücrelerinin DNA'sına zarar veren oksidatif ve nitrozatif strese neden olmaktadır. STZ-diabetik sıçanlarda, hipokampal nörojenezin azaldığı, LTP'nin bozulduğu, dendritik ve sinaptik azalma ile ilişkili olarak öğrenme ve hafıza performanslarının azaldığı görülmektedir. Hipokampal Tau fosforilasyonunun olması bu modelin diğer bir özelliğini ortaya çıkarmaktadır. AH olan transgenik fareler STZ ile tedavi edildiğinde, hiperfosforile Tau'nun AH'nin ayırıcı tanısı olan NFY oluşturduğu ve bu yumağın daha çözünmez ve ilerlemiş hale geldiği görülmektedir. İnsülin eksikliği ile artmış A $\beta$  birikimi arasındaki ilişki, APP'yi ayıran enzim 1'in transkripsiyonel aktivasyonuna bağlı mekanizma sayesinde anlaşılmaktadır. Aralarındaki ilişkiye diğer bir kanıt olarak, AH tipi bunama modelinde, kognitif değişiklikler ve demansın STZ'nin intraserebroventriküler (icv) enjeksiyonundan kaynaklandığı gösterilmektedir. Icv-STZ beyindeki insülin sinyalini önleyerek kognitif performansta azalmaya ve LTP'de bozulmaya neden olmaktadır. Moleküler düzeyde icv-STZ; mitokondrial fonksiyonlarda, sürekli bozulan beyin enerji metabolizmasında ve insülin sinyal proteini olan GLUT1 ve GLUT3'ün aktivitesi ve ekspresyonunda azalmaya neden olurken, oksidatif stres ve nöroenflamasyonu artırmaktadır. Icv-STZ modelindeki bu bozuklukların, N-metil D-aspartat (NMDA) ve  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metilisoksazol-4-propiyonik asit (AMPA) reseptörlerinin fonksiyonu ve ekspresyonu ile ilişkili olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca, Tau'nun fosforilasyonunda ve NFY oluşumunda artış görülürken, Tau'nun mikrotübüle bağlanmasında azalma olduğu gösterilmektedir. Tau fosforilasyonunda ve glutamat reseptörleri fonksiyonundaki azalmanın, glikojen sentaz kinaz-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) enziminin up-regülasyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca, bu modelde kolinerjik bozuklukların olduğu da görülmektedir. Bu modelden elde edilen sonuçlara göre; beyindeki glukoz metabolizması ve hipokampustaki insülin sinyal anormalliklerinin, AH'de kognitif değişikliklerden önce meydana geldiği gösterilmektedir.<sup>16</sup>

### 3.2.3. Metabolik Hastalıkların Hayvan Modelleri

AH'nin biomarkerlarını geliştirmek için insülin/fofoinazitid-3-kinaz (PI3-K) yoluğarı arasındaki

ilişki üzerinde, hiperinsülinemili fare modelleri ile çalışılmaktadır. Hiperinsülinemide, sistemik olarak insülin uygulandıktan sonra 10 dk gibi kısa bir süre içerisinde Tau fosforilasyonunun teşvik edildiğarı görülmektedir. İnsülinin, PI3-K/Akt yoluğarı presenilin 1'in fosforilasyonunu önlediğarı kanıtlanmıştır. Bu yolla da insülinin A $\beta$  üretimini düzenlediğarı gösterilmektedir.<sup>16</sup>

### 3.2.4. Aşılama ile Oluşturulan Alzheimer Hastalığı Modelleri

İmmünizasyonun etkisinin incelendiğarı bazı çalışmalarda; spesifik durumlara ve sitokine maruz kalmaya verilen cevapta M1 ve M2 fenotiplerinin üstünlüğü kanıtlanmıştır. Jimenez ve arkadaşlarının yaptığarı çalışmalarda sonuçunda yaşlanmayla birlikte TNF- $\alpha$ , interleukin1, iNOS'un yanı sıra interleukin 4, interleukin 10 ve TGF- $\beta$  mRNA'sında artış olduğarı gösterilmiştir.<sup>17</sup> Bu durumu klasik aktivasyon bölgesi için bir alternatiften vazgeçilmesi olarak yorumlamışlardır. Bu fare modelleri antikolar ile tedavi edildiğinde, aktivasyon bölgesinde değişiklik meydana gelmektedir. İlk çalışmalarda markerlarda karşılıklı değişimlerin olduğarı bulunmuştur.<sup>17</sup> Örneğinin; antikolarla tedavi sırasında MAP kinase p38 azalırken MAP kinase p44/42'nin arttığarı görülmektedir. Mikroglia aktivasyon bölgesindeki benzer değişikliklerin AH'deki aşılama çalışmalarıyla ilişkili olduğarı görülmektedir. Aşılammış AH ile aşılammış hastalar karşılaştırıldığında süpürücü (scavenger) reseptör (SCARA1) ve kristalize olabilen parça (Fcy) reseptörü içeren mikroglial markerların lekelenmesinde (boyanmasında) azalma olduğarı görülmektedir. Aşılanan ve 2 yıl içinde otopsiye gelen vakalarda mikrohemoraji ve vasküler A $\beta$  birikiminde artış olduğarı görülmekte ve fagositik mikroglia varlığı gösterilmektedir. Bapineuzumab antikoru ile yapılan faz 2 ve faz 3 denemelerinde manyetik rezonans görüntülemelerde A $\beta$  ile ilişkili anormallikler gözlemlenmektedir. Deglukozilasyon yoluğarı antikoların Fcy reseptörlerine afinitesinin azalması ile fare modellerinde bu anormalliklerin azaldığı gösterilmektedir. Antijen-antikor etkileşiminin neden olduğarı mikroglia aktivasyonunun, immunoterapiye verilen vasküler cevapta rolünün olduğarı düşünülmektedir.<sup>18</sup>

\*Yazarlar herhangi bir çıkar ilişkisi içinde bulunmadıklarını bildirmiştir.

<b>C</b>	<b>İLETİŞİM İÇİN:</b> Kübra Elçioğlu Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Haydarpaşa, 34668 İstanbul, Türkiye <a href="mailto:kubra.elcioglu@marmara.edu.tr">kubra.elcioglu@marmara.edu.tr</a>
<b>✓</b>	<b>GÖNDERİLDİĞİ TARİH:</b> 26 / 10 / 2016 • <b>KABUL TARİHİ:</b> 30 / 05 / 2017



## KAYNAKLAR

1. Viola KL, Klein WL. Amyloid  $\beta$  oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol* 2015; 129: 183-206.
2. Grammas P. Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation* 2011; 8: 26.
3. Craft S, Cholerton B, Baker LD. Insulin and Alzheimer's disease: untangling the web. *J Alzheimers Dis* 2013; 33: 263-275.
4. Dineley KT, Jahrling JB, Denner L. Insulin resistance in Alzheimer's disease, *Neurobiol Dis* 2014; 72: 92-103.
5. Hoas C. Presenile because of presenilin: The presenilin genes and early onset Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurol* 1996; 9: 954-959.
6. Lim YY, Maruff P, Pietrzak RH, et al. Effect of amyloid on memory and non-memory decline from preclinical to clinical Alzheimer's disease. *Brain* 2014; 137: 221- 231.
7. Foley AM, Ammar ZM, Lee RH, Mitchell CS. Systematic review of the relationship between amyloid beta levels and measures of transgenic mouse cognitive deficit in AD. *J Alzheimers Dis* 2015; 44: 787-795.
8. *Manipulating The Mouse Embryo: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1994.
9. Carmo SD, Cuello CA. Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats, *Molecular Neurodegeneration* 2013; 8: 1-11.
10. Tong C, Li P, Wu NL, Yan Y, Ying QL. Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 2010; 467: 211-213.
11. Tran TN, Kim SH, Gallo C, et al. Biochemical and biophysical characterisation of recombinant rat apolipoprotein E similarities to human apolipoprotein E3. *Arch Biochem Biophys* 2013; 520: 18-25.
12. Zilka N, Filipcik P, Koson P, et al. Truncated Tau from sporadic Alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo. *FEBS Lett* 2006; 580: 3582-3588.
13. Stancu IC, Vasconcelos B, Terwel D, et al. Models of amyloid beta induced Tau pathology: the lonAg and folded road to understand the mechanism. *Molecular Neurodegeneration* 2014; 9: 51.
14. Sadigh-Eteghad S, Sabermarouf B, Majdi A, et al. Amyloid-Beta: A Crucial Factor in Alzheimer's Disease. *Med Princ Pract* 2015; 24: 1-10.
15. Mc Larnon J. Correlated inflammatory responses and neurodegeneration in peptid-injected animal models of Alzheimer's disease, *Biomed Research International* 2014; 923670.doi:10.1155/2014/923670.
16. Calvo-Ochoa E, Arias C. Cellular and metabolic alterations in the hippocampus caused by insulin signalling dysfunction and its association with cognitive impairment during aging and Alzheimer's disease: studies in animal models. *Diabetes Metabolism Research and Reviews* 2015; 31: 1-13.
17. Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, et al. Inflammatory Response in the Hippocampus of PS1<sub>M146L</sub>/APP<sub>751SL</sub> Mouse Model of Alzheimer's Disease: Age-Dependent Switch in the Microglial Phenotype from Alternative to Classic. *Journal of Neuroscience* 2008; 28: 11650-11661
18. Heneka MT, Carson MJ, Khoury JE, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2015; 14: 388-405.