



## Arı Sütünün Amiloid Beta ile Deneysel Alzheimer Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda Etkileri

Songül Benzigül<sup>1</sup>, Saliha Ayşenur Çam<sup>1</sup>, Fatma Uysal<sup>1</sup>, Seyfullah Oktay Arslan<sup>1</sup>,  
Hayriye Tatlı Doğan<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Ankara, Türkiye

<sup>2</sup> Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Ankara, Türkiye

Geliş: 02.06.2021; Revizyon: 22.08.2021; Kabul Tarihi: 23.08.2021

### Öz

**Giriş:** Arı sütünün amiloid beta1-42 enjekte edilerek Alzheimer modeli oluşturulan sıçanlarda, bilişsel işlevin azalmasına ve sinir hücresi inflamasyonuna karşı doza bağlı etkisini araştırmayı amaçladık.

**Yöntemler:** Çalışmada, 35 adet 4 aylık 280-310 g ağırlığında Wistar-Albino erkek sıçan kullanıldı. Her grupta 7 sıçan olacak şekilde 5 grup oluşturuldu. A $\beta$ 1-42, hamilton mikroenjeksiyonu ile hipokampüse çift taraflı 4 $\mu$ g/taf enjekte edildi. Kontrol grubuna A $\beta$ 1-42 yerine, aynı miktarda serum fizyolojik enjekte edildi. Hipokampus içine A $\beta$ 1-42 uygulamasından önceki 7 gün ve sonraki 10 günden sonra, arı sütü sıçan gruplarına sırasıyla 30 mg/kg, 100 mg/kg, 300 mg/kg mide sondası ile uygulandı. Bu uygulamalar bittikten sonra iki gün sürecek olan Pasif Sakınma testi, sonra beş gün sürecek olan Morris Su Tankı deneyleri uygulandı. Hipokampus dokularında TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  düzeyleri ölçüldü. İmmünohistokimyasal incelemelerde GFAP ve Iba1 boyanma şiddeti ve yaygınlığı, ayrıca astroglia ve mikrogliya hücrelerinin aktive olmuş morfolojiye sahip olup olmamaları esas alındı.

**Bulgular:** Gruplar karşılaştırıldığında, pasif sakınma testi ve morris su tankı testleri uygulanan sıçanlarda A $\beta$ 1-42 uygulamasıyla öğrenme ve hafızada gerileme oluştu. Arı sütü 30 mg/kg, 100 mg/kg ve 300 mg/kg uygulamasında öğrenme ve hafızada oluşan gerilemenin geri dönüşünde istatistiksel anlamlılık elde edilemedi. Alzheimer hastalığı grubunda gözlenen astrosit ve mikrogliya aktivite artışının, 30 mg/kg grubu hariç diğer tedavi gruplarında baskılandığı görüldü. Hipokampüste TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  düzeylerinin, A $\beta$ 1-42 uygulaması ile arttığı görüldü ve tedavi gruplarında arı sütü 30 mg/kg grubu hariç diğer iki grupta (100 ve 300 mg/kg) bu artışın baskılandığını tespit edildi.

**Sonuç:** Alzheimer modellememizdeki bulgularımıza göre arı sütü uygulaması sonucu, oluşan astoglyal ve mikroglyal aktivite ve inflamasyon yapıcı sitokin artışının baskılandığı görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Alzheimer hastalığı, sıçan, amiloid beta, arı sütü

DOI: 10.5798/dicletip.988081

**Correspondence / Yazışma Adresi:** Seyfullah Oktay Arslan, Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Ankara, Türkiye e-mail: soarslan@gmail.com

## Effects of royal jelly on rats with amyloid beta in experimental Alzheimer's model

### Abstract

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the dose-dependent effect of royal jelly against reduction of cognitive function and neuroinflammation in rats that were injected with amyloid beta1-42 peptide in Alzheimer's model.

**Methods:** In the study, 35 4-month-old Wistar-Albino male rats weighing 280-310 g were used. 5 groups were formed with 7 rats in each group. The A $\beta$ 1-42 peptide was injected 4 $\mu$ g/side to be bilateral into the hippocampus with the Hamiltonian microinjector. The control group was injected with the same amount of saline, instead of A $\beta$ 1-42 7 days before and 10 days after A $\beta$ 1-42 administration into the hippocampus, royal jelly was administered to the rat groups at doses of 30 mg/kg 100 mg/kg, and 300 mg/kg, respectively, by gastric gavaj. After these applications were completed, the Passive Avoidance test, which would last for two days, and then the Morris Water Tank experiments, which would last for five days, were applied. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels were measured in the hippocampus tissues. For the evaluation of immunohistochemical staining for immunohistochemical examinations, the severity and extent of staining for GFAP and Iba1, and whether astroglia and microglia cells have activated morphology were taken as basis.

**Results:** When the groups were compared, there was a decline in learning and memory with the application of A $\beta$ 1-42 in rats undergoing Passive Avoidance test and Morris Water Tank tests. After administration of royal jelly doses of 30 mg/kg, 100 mg/kg and 300 mg/kg, there was no improvement in learning and memory decline. The increase in astrocyte and microglia activity observed in the Alzheimer's disease group was suppressed in treatment groups with other doses, except for the as 30 mg/kg group. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in the hippocampus were increased with the administration of A $\beta$ 1-42 peptide, and we found that this increase was suppressed in the treatment groups in the other two groups (100 and 300 mg/kg), except for the dose group of royal jelly 30 mg/kg.

**Conclusion:** According to our findings in our Alzheimer's model, the application of royal jelly was found to suppress the resulting astogial and microglial activity and inflammatory cytokine increase.

**Keywords:** Alzheimer's disease, rat, amyloid beta, royal jelly.

### GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH), ilerleyici hafıza ve bilişsel kayıp ile karakterize yaşa bağlı bir hastalıktır. AH, geri dönüşü olmayan sinir hücresi harabiyetine ve beynin sonradan küçülmesine neden olur. Bugüne kadar AH ve diğer sinir hücresi harabiyetinin neden olduğu demanslar için gerçekten etkili bir tedavi tespit edilememiştir<sup>1,2</sup>. Mevcut AH'de kullanılan tedaviler, yalnızca semptomları hafifletir. AH'nin patofizyolojisinin tespit edilmesi, erken teşhis ve spesifik etkili tedavilerin geliştirilmesi için gereklidir. Ancak halen AH'nin kesin nedeni bilinmemektedir. Bununla birlikte araştırmacılar, AH patogenezinin ana bileşenleri üzerinde bir fikir birliğine varmış olup, patolojik belirtileri arasında amiloid beta (A $\beta$ ) protein kümeleri içeren hücre dışı amiloid plakların ve hücre içinde hiperfosforile tau proteininden oluşan nörofibriler yumakların

(NFY) oluşumunu tespit etmiştir. Ayrıca AH'nin reaktif astroglia, distrofik nörit, nöronların ölümü ve sinaps kaybı gibi durumlar, beynin entorhinal korteks, hipokampus, serebral korteks ve amigdalada meydana gelir. Ancak beynin en fazla zarar gören bölgeleri hipokampus ve serebral kortektir<sup>3,4</sup>. Hastalığın patolojisinin ne zaman başladığı tespit edilememektedir. AH'nin tespitinde ilerlemeler olmasına rağmen, hastalığın semptomlarını tetikleyen moleküler mekanizmaları gösteren, spesifik biyobelirteçler hakkında kesin bilgi bulunamamıştır. AH'nin en yaygın tipi Sporadik AH'dir, diğer tipi olan Ailevi AH'de hastaların yaklaşık %5-15'ni ilgilendirir<sup>2,5</sup>.

Arı sütü (AS), genç işçi arıların (*Apis mellifera*) çene ve hipofaringeal bezlerinden salgılanan beyaz veya sarımsı jelatinimsi bir maddedir<sup>6</sup>. Araştırmalar, tüm yaşamları boyunca AS ile beslenen kraliçe arıların, bal ve polenlerle

beslenen işçi arılara göre daha fazla öğrenme ve hafıza gelişimi gösterdiğini tespit etmişlerdir<sup>7</sup>. AS asidiktir (3.6-4.2), ana bileşeni %60-70 oranı ile sudur. Ayrıca bileşiminde %11-23 karbonhidrat, %9-18 protein, %4-8 lipitler, az miktarda vitamin, mineral tuzlar ve başka maddeler de mevcuttur. AS'nin kuru madde ağırlığının %50'sini proteinler, bunların da çoğunu suda çözünmeyen major arı sütü proteinleri oluşturur<sup>6,8</sup>. Arı sütünün tespit edilmiş çok sayıda biyolojik aktivitesi vardır. Arı sütü biyoaktif bileşiklerin yüksek içeriği sayesinde, insan sağlığı için faydalı olan geniş bir biyolojik etkiye sahiptir. Antihiperkolesterolemik etkiler, anti-enflamatuvar faaliyetler, antitümör etkileri, antimikrobiyal etkiler, immünomodülatör, anti-alerjik ve hipoglisemik etkiler gibi etkileri vardır. AS kozmetiklerde, takviye edici gıdalarda ve terapötik ürünlerde kullanılmaktadır<sup>9,10</sup>. AS, kraliçe arı tarafından tüm yaşamları boyunca tüketilen tek besindir. AS'nin kraliçe arının uzun ömür, yüksek doğurganlık, mükemmel öğrenme ve hafıza yeteneğine katkıda bulunduğu öne sürülmektedir<sup>7</sup>. Bu nedenle AS'nin, ileri yaşlanmada ve AH'de bilişsel işlevlere olan etkisine bakılmış, AH patolojisini değiştirebileceği öne sürülmüştür<sup>5,9,11</sup>.

Bu çalışmamızda AH gelişiminde Aβ'nın önemli bir rol oynadığı ve inflamatuvar cevabı arttırarak nöronal hasar oluşturduğu düşüncesiyle, sıçanlarda hipokampus içine Aβ enjeksiyonu ile AH modeli oluşturduk. Anti-enflamatuvar özelliğinden dolayı birçok hastalıkta denenmiş olan arı sütünün, Alzheimer hastalık modeli (AHM) oluşturulan sıçanlara da uygulayarak hastalık üzerindeki etkilerini inceledik. Hayvanların öğrenme ve hafıza işlevlerinin yanı sıra, hipokampüste astroglial ve mikrogial hücre aktivasyonunda, inflamasyona neden olan sitokinlerde oluşan değişiklikleri inceledik. Kısaca çalışmamız, arı

sütünün nöroprotektif etkilerinin varlığı ve inflamasyonla ilişkisini incelemeye yöneliktir.

## YÖNTEMLER

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Yerel Etik Kurulundan 19.04.2018 tarih ve 2018/16 karar numaralı Etik Kurul belgesi alındıktan sonra çalışmaya başlandı. Toplamda 35 adet 4 aylık 280-310 g ağırlığında Wistar-Albino erkek sıçan kullanıldı. Her grupta 7 sıçan olacak şekilde 5 grup oluşturuldu. Bunlar sırasıyla kontrol, AH, AS-A (Mide sondası ile 30 mg/kg/gün Arı sütü uygulandı), AS-B (Mide sondası ile 100 mg/kg/gün Arı sütü uygulandı), AS-C (Mide sondası ile 300 mg/kg/gün Arı sütü uygulandı) gruplarıdır. AS, distile su içerisinde çözülerek +4°C'de saklandı. AHM oluşturmak amacıyla, Aβ1-42 çözeltisi hazırlanmasında Aβ1-42 peptidinin 1 mg'ı 250 µl distile suda çözüldü. 7 gün 37°C'deki etüvde inkübasyona bırakıldı. Hipokampus içine Aβ1-42 uygulamasından önceki 7 günden itibaren AS gruplarına belirlenen dozlarda mide sondası ile uygulandı, bu uygulama Aβ1-42 uygulamasından sonraki 10 güne kadar devam etti. Kontrol ve hastalık gruplarına AS yerine, aynı hacimde distile su verildi.

## Alzheimer Modelinin Oluşturulması

Gruplardaki sıçanlara, intraperitoneal ketamin/ksilazin (100/5 mg/kg) ile anestezi yapıldı. Hayvanların kafa derisi açıldıktan sonra bregmanın koordinatları bulundu. Hipokampusün koordinatları Paxinos&Watson sıçan beyin atlasına göre belirlendi<sup>12</sup>. Kemik dokusu, mikrodeleri ile sagittal kesiklerden açıldı. Aβ1-42 peptidi, Hamilton mikroenjektörü ile hipokampus içine AP:-3,5 mm, ML:±2.0 mm, DV:-2.8 mm koordinatlarında çift taraflı 1 µl/taraf enjekte edildi. Kontrol grubuna aynı miktarda serum fizyolojik 1 µl/dk hızında enjekte edildi. Sonrasında kesi yeri 3/0 mm cerrahi ipliği kullanılarak kapatıldı.

## Davranış Deneyleri

AS ve distile su uygulamaları bittikten sonra Pasif sakinme testi (PST), sonrasında Morris su tankı (MST) deneyleri uygulandı. PST’de sıçan ilk gün aydınlık bölme 20 saniye bırakıldı, sonra giyotin kapı açıldı, hayvanın karanlık bölme geçme süresi not edildi. 60 saniyede geçmeyen, deney dışı bırakıldı. Hayvan karanlık bölme geçtiğinde kapı kapatıldı, 0,5 mA elektrik şoku uygulandı. Deneyden 24 saat sonra hayvan tekrar aydınlık bölme bırakıldı ve giyotin kapı açıldı. 300 saniyeye kadar hayvanların karanlık bölgeye geçme süresi not alındı. Bu sürede geçmeyenler öğrenmiş kabul edildi.

MST testinde daha önceki çalışmalarda uygulanmış MST test düzeneği kuruldu<sup>13</sup>. Tüm hayvanlar sırayla aynı noktalardan bırakıldı, bilgisayara bağlı olan kameranın algılamasıyla deney otomatik olarak başlayarak, 90 saniye boyunca hayvanın hareketleri kaydedildi. Belirlenen süre içerisinde platformu bulamayan sıçanlara, platformun yeri gösterilerek 20 saniye platform üzerinde kalmaları sağlandı. Dört günün sonunda, 20 defa platformu bulma alıştırmaları yapılmış olan sıçanlar beşinci günde teste alındı. Testte platform kaldırılarak tanka bırakılan hayvanlar 60 saniye yüzdürüldü ve program tarafından önceden platformun olduğu kadranda geçirilen süre kaydedildi.

Davranış deneylerinden sonra, intramüsküler ketamin/ksilazin (100/5 mg/kg) ile anestezi yapılan sıçanların dokuları alındı. Beyin dokuları çıkarılarak sağ hemisfer hipokampusü biyokimyasal analizler için PBS ile dolu kaplara, sol hemisfer histolojik incelemeler için formol ile dolu kaplara konuldu. Sonrasında beyin dokuları -80°C’de muhafaza edildi.

## Proenflamatuvar Sitokin Ölçümleri

Sıçanların hipokampuslerinde ELISA kitleri kullanılarak TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  düzeyleri üreticinin talimatları doğrultusunda standart eğri kullanılarak pg/ml doku olarak hesaplandı.

Hipokampus dokuları sonikatörde homojenize edildi. Dokular santrifüj edildikten sonra süpernatant alınarak seyreltildi ve kuyucuklara 100  $\mu$ L standart eklenerek kuyucuklar kaplandı. Oda sıcaklığında inkübe edildi. 4 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı. Ardından kuyucuklar boşaltıldı. 100  $\mu$ L biyotinlenmiş TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  Deteksiyon Antikoru her bir kuyucuğa eklendi. Plak hafifçe çalkalanarak oda sıcaklığında inkübe edildi. Kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırılarak yıkama işlemi tekrarlandı. 100  $\mu$ L HRP-Streptavidin solüsyonu kuyucuklara eklendi ve yavaşça çalkalanarak oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra yıkama işlemi tekrarlandı. 100  $\mu$ L TMB tek-basamak substrat reaktifi her bir kuyucuğa eklendi ve karanlıkta çalkalanarak inkübe edildi. 50  $\mu$ L Stop Solüsyonu kuyucuklara eklendi ve 450 nm’de okuma yapıldı.

## İmmünohistokimyasal İncelemeler

Formalin fikse parafine gömülü beyin dokularından 3mm kalınlığında kesitler hazırlandı. Kesitler etüvde 72°C’de bekletildi. Antikorlar; Iba1 (İyonize Kalsiyum Bağlayıcı Adaptör Molekülü1) (1:8000), GFAP (Glial Fibriler Asidik Protein) (1:100) oranında seyreltildi. Deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemi sonrası Iba1 için 40 dk EDTA çözeltisinde, GFAP için 5 dk sitrat çözeltisinde antijen ve retrieval işlemi gerçekleştirildi. Ardından yıkama solüsyonuyla 3’er defa yıkandı. Örnekler %3’lük hidrojen peroksidazda bekletildikten sonra yıkama işlemi tekrarlanıp, primer antikor ile 30 dk inhübasyon yapıldı. Yıkama işleminin ardından lamlara sırasıyla sekonder antikor ve streptavidin peroksidaz damlatılarak 8’er dakika bekletildi. Sonra yıkama işlemi, deiyonize suyla yapıldı. Örnekler sırayla DAB Kromojen damlatıldıktan sonra bekletildi. Yıkama işlemleri sonrası hematoksilende boyanıp, alkol/ksilolden geçirilen kesitler kapatıldı. İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde GFAP ve Iba1 için

boyanmanın şiddeti ve yaygınlığı, ayrıca astroglia ve mikroglia hücrelerinin aktive olmuş morfolojiye sahip olup olmamaları esas alındı. İmmünohistokimyasal boyanmanın şiddeti ve yaygınlığı 0'dan +3'e kadar sayı ile semikantitatif olarak skorlandı (0=Yok, +1=Az, +2=Orta, +3=Şiddetli).

### İstatistik Analizi

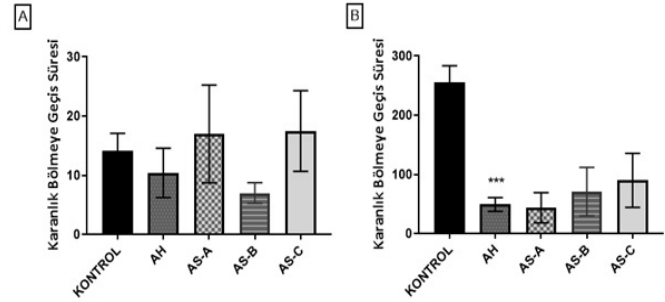
Deney çalışmalarındaki veriler Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows 15 programı ile değerlendirildi. Gruplar arası değerlendirmede normal dağılım gösterip göstermemelerine bağlı olarak One-way ANOVA testi ve devamında Post-hoc Bonferonni testi veya Kruskal Wallis Analizi ve onu takiben Mann-Whitney U Testi kullanılarak yapıldı. Grafikleri oluşturmada GraphPad Prism 7 kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için  $p < 0.05$  değeri referans alındı.

## BULGULAR

### Davranış Deneylerinin Bulguları

Pasif sakinma deneyinin ilk günü aydınlık kompartmana konan hayvanların karanlık kompartmana geçiş süreleri Kontrol  $14.1 \pm 3$ , AH  $10.46 \pm 4.17$ , AS-A  $17 \pm 8.3$ , AS-B  $7.03 \pm 1.75$ , AS-C  $17.5 \pm 6.8$  grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p > 0.05$ ). İkinci gün karanlık bölme geçiş süreleri Kontrol  $256.03 \pm 27.6$ , AH  $49.54 \pm 11.5$ , AS-A  $44 \pm 25.57$ , AS-B  $71.2 \pm 40.8$ , AS-C  $90.37 \pm 45.4$  karşılaştırıldı. Kontrol grubuna göre tedavi gruplarında değişim oluşmasına rağmen AH grubu ile istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur (Şekil 1).

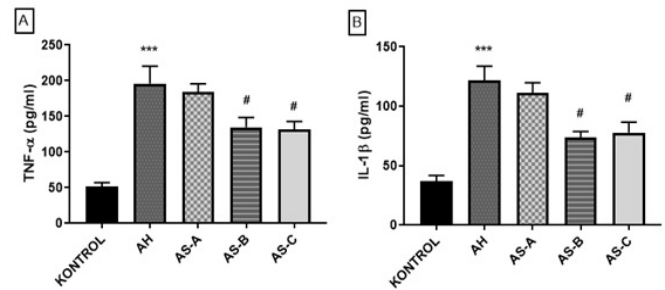
Morris su tankında platformu bulma süreleri gruplar arası kıyaslandığında ilk gün istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Kontrol ile AH grubunun platformu bulma sürelerinde iki, üç ve dördüncü günde de anlamlı bir farklılık gözlenmedi.



**Şekil 1:** Pasif Sakınma deney sonuçları. (A) Pasif sakinma testinin ilk gününde deney gruplarının karanlık bölme geçiş süresi, (B) Pasif sakinma testinin ikinci gününde deney gruplarının karanlık bölme geçiş süresi. (\*\*\*) $p < 0.001$  Kontrol grubuna göre, AH grubuna göre kıyaslamayı göstermektedir. AH: Alzheimer Hastalık grubu AS-A: 30 mg/kg, AS-B: 100 mg/kg, AS-C: 300 mg/kg Arı sütü uygulanan gruplar

### Proenflamatuvar Sitokin Ölçümlerine İlişkin Bulgular

AH grubu,  $196.16 \pm 24$  TNF- $\alpha$  düzeylerinde Kontrol grubuna  $51.7 \pm 5.7$  göre yüksek bulundu ( $p < 0.001$ ). Tedavi grupları AS-B  $134.86 \pm 13.6$  ( $p < 0.05$ ), AS-C  $131.7 \pm 11.26$  ( $p < 0.05$ ), TNF- $\alpha$  düzeylerinin ise AH'ye göre düşük olduğu belirlendi. AH grubu  $121.93 \pm 11.83$  IL-1 $\beta$  düzeylerinin, Kontrol grubuna  $37.2 \pm 4.78$  göre yüksek olduğu bulundu ( $p < 0.001$ ). Tedavi grupları AS-B  $73.89 \pm 4.96$  ( $p < 0.05$ ), AS-C  $77.84 \pm 8.8$  ( $p < 0.05$ ) IL-1 $\beta$  düzeylerinin ise AH'ye göre düşük olduğu belirlendi (Şekil 2).



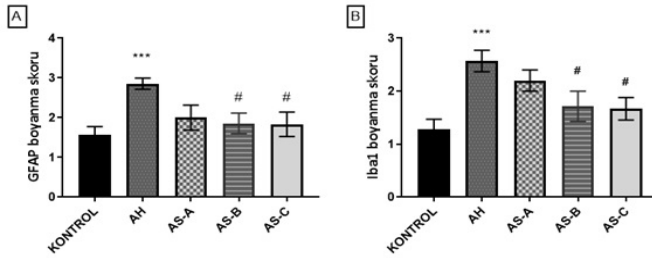
**Şekil 2:** Hipokampüste IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  düzeyleri. (\*\*\*) $p < 0.001$  Kontrol grubuna göre, # $p < 0.05$ , AH grubuna göre kıyaslamayı göstermektedir. AH: Alzheimer Hastalık grubu, AS-A: 30 mg/kg, AS-B: 100 mg/kg, AS-C: 300 mg/kg Arı sütü uygulanan gruplar)

### İmmünohistokimyasal Bulgular

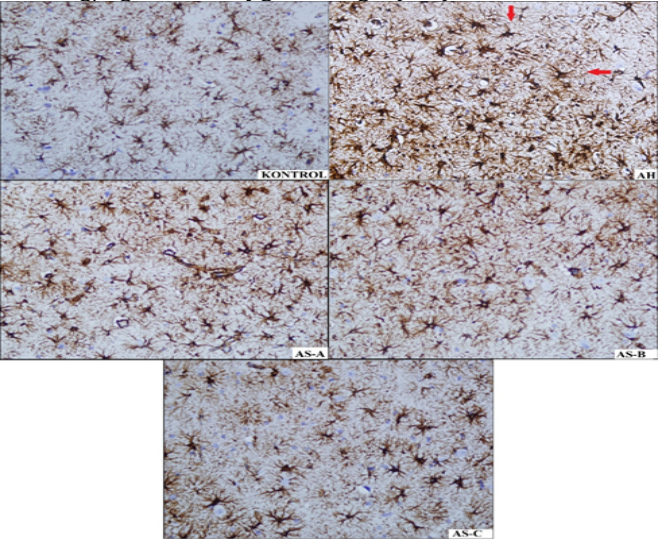
GFAP boyama sonuçları incelendiğinde AH grubunun  $2.86 \pm 0.14$  Kontrol grubuna  $1.57 \pm 0.2$  göre boyanma skorunun yüksek olduğu gözlemlendi ( $p < 0.001$ ). Tedavi grupları AS-B  $1.86 \pm 0.26$

( $p < 0.05$ ), AS-C  $1.83 \pm 0.31$  ( $p < 0.05$ ), GFAP boyanma skorunun AH grubuna göre anlamlı ölçüde düşük olduğu gözlemlendi. Anti-Iba1 ile yapılan immünohistokimyasal boyama ile mikroglia hücreleri boyandı. Mikroglia sayısı ve aktive olan mikroglia oranı göz önüne alınarak semi-kantitatif skorlama yapıldı.

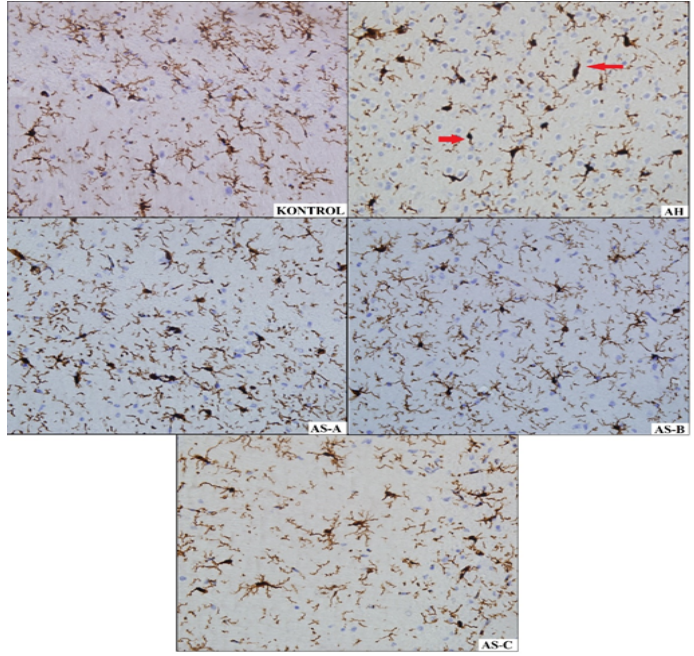
Boyanma skorları incelendiğinde AH grubunun  $2.57 \pm 0.20$  boyanma skorunun Kontrol grubuna  $1.29 \pm 0.18$  göre arttığı gözlemlendi ( $p < 0.001$ ). Tedavi grupları AS-B  $1.71 \pm 0.29$  ( $p < 0.05$ ), AS-C  $1.67 \pm 0.21$  ( $p < 0.05$ ), boyanma skorunun AH grubuna göre anlamlı ölçüde düşük olduğu bulundu (Şekil 3) (Şekil 4) (Şekil 5).



**Şekil 3:** İmmünohistokimyasal GFAP ve Iba-1 boyanma skorları. (\*\*\*) $p < 0.001$  Kontrol grubuna göre, # $p < 0.05$  AH grubuna göre kıyaslamayı göstermektedir. AH: Alzheimer Hastalık grubu, AS-A: 30 mg/kg, AS-B: 100 mg/kg, AS-C: 300 mg/kg arı sütü uygulanan gruplar)



**Şekil 4:** İmmünohistokimyasal GFAP boyamaları (40 x büyütme). GFAP ile boyanan astroglia hücreleri okla gösterilmiştir. (AH: Alzheimer Hastalık grubu, AS-A: 30 mg/kg, AS-B: 100 mg/kg, AS-C: 300 mg/kg arı sütü uygulanan gruplar). GFAP ile boyanan astroglia hücreleri okla gösterilmiştir.



**Şekil 5:** İmmünohistokimyasal Iba-1 boyamaları (40 x büyütme). Aktive olan mikroglia hücreleri okla gösterilmiştir. (AH: Alzheimer Hastalık grubu, AS-A: 30 mg/kg, AS-B: 100 mg/kg, AS-C: 300 mg/kg arı sütü uygulanan gruplar) Aktive olan mikroglia hücreleri okla gösterilmiştir.

## TARTIŞMA

AH oluşturulmuş deneysel modeller, hastalığın patogenezi için daha iyi anlamak için kullanılmaktadır. Çalışmalarda transgenik fare modelleri ailevi AH'yi yansıtmak için kullanırken en yaygın tipi olan sporadik AH'nin patolojisinin aydınlatılmasında yetersiz kalmaktadır. Peptit enjekte edilmiş sıçanlar genetik faktörlerin dışında kalan sporadik AH patolojisine benzer şekilde inflamasyon ve diğer patolojik değişiklikleri taklit ettiği için hayvan modellerinde kullanılmaktadır. AH modeli oluşturmak için sıçan beynine A $\beta$ 1-42'nin intrahipokampal enjeksiyonu önerilmiştir<sup>14,15</sup>. Yapılan bir çalışmada sıçanlara bilateral hipokampusta A $\beta$ 1-42 enjeksiyonu uygulandıktan sonra morris su tankı testi uygulanmış ve nöronal apoptozu uyardığı, bilişsel işlevin bozulduğu görülmüştür. Bu ve başka çalışmalarda, intrahipokampal A $\beta$ 1-42 enjeksiyonunun AH ile ilişkili bir sinir hücresi harabiyetine neden olduğu doğrulanmıştır<sup>16</sup>. Araştırma bulguları, AS'nin öğrenmeyi ve

hafızayı korumanın yanı sıra bilişsel davranış eksikliklerini önleme ve tedavi etme yeteneğini vurgulamaktadır. AH araştırmalarında kemirgenler, doğal yaşlanma ve AHM oluşturularak yaygın şekilde kullanılmaktadır<sup>5</sup>. Ayrıca Klinik öncesi deneyler AS'nin, AHM oluşturulmuş sıçanlarda A $\beta$  sentezini azalttığı, A $\beta$  klirensini artırarak amiloidogenezin patolojilerini düzelttiğini göstermektedir<sup>17</sup>. Çalışmaların çoğunda hayvanlar, ağızdan veya gavaj yoluyla uzun bir süre (10 gün veya daha fazla) AS ile tedavi edilmiştir. Taradığımız çalışmalarda antienflamatuvar olarak kullanılan AS dozları 25 - 500 mg/kg vücut ağırlığı/gün arasında olduğu görüldü<sup>4,18,19</sup>. Arzi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, AS'nin 25 mg/kg dozda antienflamatuvar etkinliğinin olmadığı görülmüşken 50 mg/kg ve üstünde etkinlik başladığı görülmüş<sup>19</sup>. Çalışmamızda da AS'nin 30 mg/kg dozda antienflamatuvar etkinliği görülmezken, artan dozlarda; 100 mg/kg ve 300 mg/kg dozlarında bu etkinlik görüldü.

Deney protokolümüze göre A $\beta$  enjeksiyonundan 10 gün sonra sıçanlarda öğrenme ve bellek işlevlerini test etmek amacıyla yapılan PST, ilk gün karanlık bölmeye geçiş sürelerinde gruplar arasında fark bulunmazken, deneyin ikinci günü AH grubundaki tüm sıçanların karanlık bölmeye geçtikleri gözlemlendi. AH grubunun karanlık bölmeye geçiş süreleri Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde düşük olduğu tespit edildi. A $\beta$  enjeksiyonu ile oluşan öğrenme ve hafıza işlevlerindeki bu düşüşün, A $\beta$  uygulaması ile bilişsel işlevlerde bozulma oluşturduğunu doğruladı. AS, sıçan gruplarına sırasıyla 30 mg/kg, 100 mg/kg, 300 mg/kg dozlarda uygulandıktan sonra, PST uygulamamızda iki yüksek dozumuzda bir miktar bilişsel açıdan düzelme gözlemlendi. Fakat istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değildi. PST bittikten sonraki gün MST deneyinde, sıçanların etrafa yerleştirilen işaretler yardımıyla

platformun yerini öğrenme ve referans belleğini kullanarak platformu bulabilme kabiliyetleri ölçüldü. AH grubundaki sıçanların alıştırmaya testlerinde platformu bulmak için daha uzun zaman harcamaları, A $\beta$  uygulaması ile bilişsel işlevlerde bozulma oluştuğunu doğruladı. A $\beta$  uygulaması ile oluşan bu bozulma sonrası, AS gruplarına sırasıyla 30 mg/kg, 100 mg/kg, 300 mg/kg dozlarda uygulanan sıçanlarda, PST'de olduğu gibi bilişsel işlevde bir miktar düzelme oluştu ancak istatistiksel açıdan anlamlı değildi. Sıçanlarda serebroventrikül içine STZ enjeksiyonu ile oluşturulan AH modelinde, 2 hafta boyunca AS ile oral tedavinin etkisinin morris su labirenti testiyle değerlendirildiği bir çalışmada, uzun süreli AS kullanımının tedaviye olumlu bir etkisi olduğunu göstermiştir<sup>4</sup>. AH modelleri olarak kullanılmış APP/PS1 Fare Modeli 3 ay AS tedavisi uygulandıktan sonra davranış deneylerinden MST testinde ve kademeli PST'ye tabi tutuldular ve farelerin davranışsal bozukluklarının iyileştiği görülmüştür<sup>17</sup>. Başka bir çalışmada, kısa süreli AS uygulaması (6 gün) yaşlı sıçanlarda uzamsal hafızayı değiştirmediği görülmüş ve kısa süreli kullanımının yeterli olmadığı sonucuna varılmış<sup>18</sup>. Bizim çalışmamızda da A $\beta$ 'nin yol açtığı bilişsel gerilemenin bir miktar düzeldiği ama anlamlı aralıkta olmadığı görüldü. Sonuçlarımız bu çalışmayı desteklemektedir.

Daha önce yapılan çalışmalarda A $\beta$ 'nin glial sekresyonu artırdığı görülmüştür. Artan astrosit aktivitesinin doğrudan A $\beta$  üretmediği ama farklı yollardan A $\beta$ 'nin eliminasyonunu etkilediği tespit edilmiştir. AHM'de, hipokampus içine A $\beta$ 1-42 enjeksiyonu sonrası gelişen reaktif gliozisi ölçmek için immünohistokimyasal Iba-1 (mikroglia için) ve GFAP (astrositler için) boyamalarının yararlı olacağı belirtilmiş ve çalışmalarda kullanılmıştır. Ayrıca mikroglialar sitokinleri (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) aktive ettikten sonra bu sitokinlerin astrositleri aktive ettiği öne sürülmüştür<sup>20,21</sup>. Çalışmamızda hipokampus

içine çift taraflı A $\beta$ 1-42 enjeksiyonu ile AHM oluşturulan sıçan gruplarına, AS'nin sırasıyla 30 mg/kg, 100 mg/kg, 300 mg/kg dozlarda oral uygulamasının etkisi hayvanların hipokampus dokularında proenflamatuvar sitokin IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  düzeylerine bakarak ve Iba-1 ve GFAP boyamaları yardımıyla mikroglia ve astroglia aktivasyonlarını incelendi.

Iba-1, aktive edilmiş mikroglia için bir immünohistokimyasal belirteç olarak kullanılmaktadır<sup>22</sup>. GFAP, astrositler dahil glia hücreleri için klasik bir belirteçtir<sup>23</sup>. Çalışmamızda mikroglial aktivasyonu araştırmak amacıyla sıçanların hipokampus kesitlerini, mikroglial aktivasyon belirteci olan anti-Iba1 ile boyadık. Boyanma skorları incelendiğinde AH grubunun boyanma skorunun, kontrol grubuna göre arttığı gözlemlendi. Aktive olmuş mikroglia sayısı, AH grubuna göre anlamlı düzeyde daha az bulunurken, tedavi gruplarında 100 mg/kg, 300 mg/kg dozların uygulanmasından sonra A $\beta$  tetikli mikroglial aktivasyon artışını anlamlı düzeyde engellediği bulundu. Yapılan bir çalışmada, A $\beta$  uygulaması sonrası anti-CD11b ile yapılan incelemede, çalışmamıza benzer şekilde mikroglia aktivitesinde artış gözlemlendi<sup>24</sup>.

Astrositler, AH nöroenflamasyonuna ve sinir hücresi harabiyetine neden olurlar. Kemirgenlerde yapılan çalışmalarda, astrositlerin AH'ye neden olan nöroenflamatuvar ve nörodejeneratif süreçlere doğrudan bir katkısı olduğunu göstermektedir<sup>25</sup>. Üçlü transgenik bir AH fare modelinin (3xTg-AH) hipokampusundeki astroglia sayısal yoğunluğunu araştırmak için, belirteç olarak GFAP boyaması kullanılmış<sup>26</sup>. Çalışmamızda astrogliosisi değerlendirmek için, sıçanların hipokampus kesitlerinde anti-GFAP antikoru boyanmasını kullandık. Tedavi gruplarında 100 mg/kg, 300 mg/kg AS dozlarının A $\beta$  uygulaması ile artan astoglia aktivasyonu azalttığı görüldü.

Nöroenflamatuvar cevapta artış gösteren enflamatuvar sitokinlerden TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$

düzeylerinin, hipokampüse A $\beta$  enjeksiyonu ile arttığını, AS uygulamasının ise bu artışı azalttığını bulduk. Benzer bir çalışmada, A $\beta$  enjeksiyonu ile oluşturulan AHM'ye enflamatuvar cevabı baskılayan TGF- $\beta$ 1 uygulaması, gliadindeki proenflamatuvar mediyatörlerin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve iNOS) artışını önlediği görülmüş<sup>24</sup>. Çalışmamızda A $\beta$ 1-42 uygulamasıyla, mikroglia ve astrogliaların aktivasyonu ile belirginleşen bilişsel işlevlerdeki düşüş, AS uygulamaları ile düzelmiştir. AS 30 mg/kg dozunda uygulanması ile AH patolojisinde anlamlı düzeyde gerileme gözlenmezken, 100 mg/kg ve 300 mg/kg dozları uygulanan gruplarda TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  düzeylerinin AH'e grubuna göre düşük olduğu belirlendi ve enflamatuvar cevabın baskılandığı görüldü. AS'deki 10-HDA ile yapılan bir çalışmada, LPS ile uyarılan C57BL/6J fareleri ve mikroglial BV-2 hücreleri Oral olarak 10-HDA verilince TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  seviyelerinin azaldığı görülmüştür<sup>27</sup>. Kadmiyum kaynaklı kortikal hasar oluşturulmuş fare modeline, intragastrik yolla AS'nin iNOS, ROS, NOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Bax, kaspaz-3 ve kortikal nöronlarda kadmiyum seviyesini azalttığı belirtilmiştir<sup>28</sup>.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda görülen; davranış deneyleri ile biyokimyasal ve histolojik incelemeler dikkate alındığında, hipokampus içi A $\beta$  uygulaması ile sıçanların hipokampusünde, astrogliosis ve mikrogliosis artışı görülür. Buna paralel TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  sitokinlerinin arttığı ve bu artışın beyinde enflamatuvar cevap oluştuğunu gösterilmektedir. Bu aşırı enflamatuvar cevabın, A $\beta$  tetikli patolojisini artırarak uzaysal öğrenmede ve hafızada belirgin gerilemeye yol açtığı davranış testleri ile görülmüştür. Çalışmamızda, AHM oluşturulan sıçanların bilişsel işlevlerindeki düşüş, PST ve MST davranış testleri ile gösterilmiştir. Aynı zamanda hayvanların hipokampuslerinde A $\beta$ 1-42 enjeksiyonunu takiben mikroglia ve astroglia aktivitesindeki artış,



immünohistokimyasal incelemelerle ortaya konmuş ve bu hücrelerin aktivitelerine paralel olarak IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  sitokin düzeylerinde artış olduğu görülmüştür. Çalışmamızın davranış testleri bulgularında, öğrenme ve hafıza işlevleri düşüşündeki geri döndürücü etki kısmen görülmekle birlikte istatistiksel anlamlılık yakalanmadı. Bu sonuçlar bizi, davranış deneyleri bulgularında en sağlıklı veri elde edilmesi için gruplardaki sayının daha yüksek tutulması gerektiği fikrine sahip olmamıza götürdü. AHM ile oluşturulan nörodejenerasyon ilerleyici nitelikte ve tedavide AS uygulama süresinin belirleyici olduğundan uzun vadeli değişimleri gözlemlemek için çalışma süreleri uzatılabilir.

Deneysel olarak oluşturulan AH modellememizdeki bulgularımıza göre AS uygulaması sonucunda, oluşan astogial ve mikrogial aktivite ve enflamasyon yapıcı sitokin artışının doza bağlı olarak baskılandığı görüldü. Bu sonuç arı sütünün sinir hücresi enflamasyona karşı etkili olabileceğini düşündürmektedir.

**NOT:** Bu makale Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü için hazırlanmış olan "Arı Sütünün Amiloid Beta ile Deneysel Alzheimer Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda Etkileri" başlıklı doktora tezinden üretilmiştir.

**Etik Kurul Kararı:** Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Yerel Etik Kurulundan 19.04.2018 tarih ve 2018/16 karar numaralı Etik Kurul belgesi alındıktan sonra çalışmaya başlandı.

**Çıkar Çatışması Beyanı:** Çıkar çatışması bulunmamaktadır.

**Finansal Destek:** Bu çalışma Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 4990 nolu proje ile desteklenmiştir.

**Declaration of Conflicting Interests:** The author declare that she has no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** This study is supported by Ankara Yıldırım Beyazıt University/ Scientific Research Projects Unit (Project No. 4990).

## KAYNAKLAR

1. Javier Olivera-Pueyo CP-V. Dietary supplements for cognitive impairment Introduction: the Mediterranean diet: Myth or reality? *Actas Esp Psiquiatr.* 2017; 45: 37-47.
2. Rabbito A, Dulewicz M, Kulczyńska-Przybik A, Mroczko B. Biochemical Markers in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 1989.
3. Kozlov S, Afonin A, Evsyukov I, Bondarenko A. Alzheimer's disease: As it was in the beginning. *Rev Neurosci.* 2017; 28: 825-43.
4. Guardia de Souza e Silva T, do Val de Paulo MEF, da Silva JRM, et al. Oral treatment with royal jelly improves memory and presents neuroprotective effects on icv-STZ rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Heliyon.* 2020; 6: e03281.
5. Ali AM, Kunugi H. Royal Jelly as an Intelligent Anti-Aging Agent—A Focus on Cognitive Aging and Alzheimer's Disease: A Review. *Antioxidants.* 2020; 9: 937.
6. Fratini F, Cilia G, Mancini S, Felicoli A. Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. *Microbiol Res.* 2016; 192: 130-41.
7. Pyrzanowska J, Wawer A, Joniec-maciejak I, et al. Long-term administration of Greek Royal Jelly decreases GABA concentration in the striatum and hypothalamus of naturally aged Wistar male rats. *Neurosci Lett.* 2018; 675: 17-22.
8. Okamoto I, Taniguchi Y, Kunikata T, et al. Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. *Life Sci.* 2003; 73: 2029-45.
9. Khazaei M, Ansarian A, Ghanbari E. New Findings on Biological Actions and Clinical Applications of Royal Jelly: A Review. *J Diet Suppl.* 2018; 15: 757-75.

10. Uçar M. Arı Sütünün Diyabet, Tümör Oluşumu ve Metabolik Sendrom Üzerine Etkisi. *Online Türk Sağlık Bilim Derg.* 2018; 3: 101–12.
11. Ramadan MF, Al-Ghamdi A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *J Funct Foods.* 2012; 4: 39–52.
12. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd ed. New York, Academic Press. 1996. Vol. 191, *Journal of Anatomy.* Wiley-Blackwell; 1996. 315–317 p.
13. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 1984; 11: 47–60.
14. Drummond E, Wisniewski T. Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* 2017; 133: 155–75.
15. McLarnon J, Ryu J. Relevance of A $\beta$ 1-42 Intrahippocampal Injection as An Animal Model of Inflamed Alzheimers Disease Brain. *Curr Alzheimer Res.* 2008; 5: 475–80.
16. Zhang J, Ke K-F, Liu Z, Qiu Y-H, Peng Y-P. Th17 Cell-Mediated Neuroinflammation Is Involved in Neurodegeneration of A $\beta$ 1-42-Induced Alzheimer's Disease Model Rats. Vitorica J, editor. *PLoS One.* 2013; 8: e75786.
17. You M, Pan Y, Liu Y, et al. Royal Jelly Alleviates Cognitive Deficits and  $\beta$ -Amyloid Accumulation in APP/PS1 Mouse Model Via Activation of the cAMP/PKA/CREB/BDNF Pathway and Inhibition of Neuronal Apoptosis. *Front Aging Neurosci.* 2019; 10.
18. Pyrzanowska J, Piechal A, Blecharz-Klin K, et al. Administration of Greek Royal Jelly produces fast response in neurotransmission of aged Wistar male rats. *J Pre-Clinical Clin Res.* 2015; 9: 151–7.
19. Arzi A, Olapour S, Yaghooti H, Karampour NS. Effect of Royal Jelly on Formalin Induced-Inflammation in Rat Hind Paw. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.* 2015; 10: 8–11.
20. McLarnon JG. Correlated Inflammatory Responses and Neurodegeneration in Peptide-Injected Animal Models of Alzheimer's Disease. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 1–9.
21. Preman P, Alfonso-Triguero M, Alberdi E, Verkhatsky A, Arranz AM. Astrocytes in Alzheimer's Disease: Pathological Significance and Molecular Pathways. *Cells.* 2021; 10: 540.
22. Hovens I, Nyakas C, Schoemaker R. A novel method for evaluating microglial activation using ionized calcium-binding adaptor protein-1 staining: cell body to cell size ratio. *Neuroimmunol Neuroinflammation.* 2014; 1: 82.
23. Hol EM, Roelofs RF, Moraal E, et al. Neuronal expression of GFAP in patients with Alzheimer pathology and identification of novel GFAP splice forms. *Mol Psychiatry.* 2003; 8: 786–96.
24. Chen J-H, Ke K-F, Lu J-H, Qiu Y-H, Peng Y-P. Protection of TGF- $\beta$ 1 against Neuroinflammation and Neurodegeneration in A $\beta$ 1-42-Induced Alzheimer's Disease Model Rats. *PLoS One.* 2015; 10: e0116549.
25. Arranz AM, De Strooper B. The role of astroglia in Alzheimer's disease: pathophysiology and clinical implications. *Lancet Neurol.* 2019; 18: 406–14.
26. Olabarria M, Noristani HN, Verkhatsky A, Rodríguez JJ. Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia.* 2010; 58.
27. You M, Miao Z, Tian J, Hu F. Trans-10-hydroxy-2-decenoic acid protects against LPS-induced neuroinflammation through FOXO1-mediated activation of autophagy. *Eur J Nutr.* 2020; 59: 2875–92.
28. Almeer RS, Kassab RB, AlBasher GI, et al. Royal jelly mitigates cadmium-induced neuronal damage in mouse cortex. *Mol Biol Rep.* 2019; 46: 119–31.