

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

FİKİR KATEGORİSİ

TAKIM ADI

.....Mikrop.....

PROJE ADI

Alzheimer hastalığında bağırsak mikrobiyotası ve hormonal ilişki

BAŞVURU ID

.....#76775.....

KATEGORİ

Biyoteknoloji İnovasyon Yarışması Fikir Kategorisi

İçindekiler

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)	
2. Problem/Sorun	
3. Çözüm	
4. Yöntem	
4.1. Hayvanlar modelleri	
4.2. Dozaj Bilgisi.....	
4.3. Davranışsal Değerlendirme.....	
4.4. Hormon Düzeylerinin Değerlendirmesi.....	
4.5. Histoloji Analizi.....	
4.6. Amiloid Birikimi ve Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi.....	
4.7. İstatistiksel Analiz.....	
5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü	
6. Uygulanabilirlik	
7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması	
8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar)	
9. Riskler	
10. Kaynaklar	

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Alzheimer hastalığı (AH), hafıza, biliş ve davranış bozuklukları ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır (Soria Lopez vd., 2019). Amiloid- β plakları, hiperfosforile tau proteinin nörofibriler yumakları ve nöroinflamasyonun AH oluşmasında rol aldığı bilinmektedir (Gallardo vd., 2019). Alzheimer hastalığı için tedavi seçenekleri, prognozu zayıflatmadan destekleyici ve semptomatik etki göstermektedir. Yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi büyük öneme sahiptir (Weller vd., 2018). Bu bağlamda, AH'de yararlı etkileri olduğu gösterilen probiyotikler potansiyel tedavi seçeneği olarak öne çıkmaktadır (Angelucci vd., 2019).

Probiyotikler, özellikle gastrointestinal sistemde mikrobiyal dengeyi iyileştirmek için uygulanan canlı, patojenik olmayan mikroorganizmalardır (Williams vd., 2010). Bağırsakta mikrobiyal dengenin bozulması, Alzheimer hastalığına neden olabilir (Janeiro vd., 2021). Aynı zamanda bağırsak mikrobiyotasının bozulması AH'nin ilerlemesine veya alevlenmesine yol açabilir (Pistollato vd., 2016; La Rosa vd., 2018). Hem hayvan hem de insan çalışmalarında, AH'de bağırsak mikrobiyal bileşiminin değiştiği gösterilmiştir (Vogt vd., 2017; Zhuang vd., 2018; Zhang vd., 2017). Dolayısıyla, Alzheimer hastalığında mikrobiyal dengenin düzeltilmesi tedavi açısından hedeflenebilir.

Bağırsak mikrobiyomu ile ilişkili hastalıkların tedavisinde probiyotiklerin kullanılabileceği önerilmiştir (Kim vd., 2019). **Bu bağlamda, probiyotik tedavisinin AH'nin ilerlemesini engellediği ve Alzheimer hastalarında ve fare modellerinde bilişsel eksiklikleri iyileştirdiği saptanmıştır (Abraham vd., 2019; Akbari vd., 2016; Peng vd., 2014).** Bağırsak mikrobiyotasının düzenlenmesinde rol alan probiyotikler, Alzheimer hastalığı için **yeni tedavi yöntemi** olabilir.

Faecalibacterium prausnitzii, yeni nesil probiyotik olarak kabul edilmektedir (Martín vd., 2017). Bağırsak mikrobiyotasının ana bileşenlerinden biri olan *Faecalibacterium prausnitzii*, insan kolonunda bütirat üreten en önemli bakterilerdendir (Ferreira-Halder vd., 2017). Bağırsak-beyin ekseninin kimyasal aracı olan bütirat, inflamasyonu baskılayıcı etki göstermektedir (Matt vd., 2018). 2018 yılında yapılan çalışmada, bütiratın Amiloid- β 1-40 oligomerizasyonuna müdahale edebileceği tespit edilmiştir (Ho vd., 2018). Ayrıca, Parkinson hastalığında ve travmatik beyin hasarında bütiratın nörokoruyucu etkileri bulunmuştur (Liu vd., 2017; Li vd., 2016). Bu nedenle, bütirat, AH'de Amiloid- β birikimini ve nöronal hasarı azaltarak yararlı etki gösterebilir.

AH'de mikroglia aktivasyonu sayesinde, tümör nekroz faktörü (TNF)- α ve interlökin (IL)-1 β gibi inflamatuvar sitokinler salgılanmaktadır. Bu sitokinler, nihayetinde nöroinflamasyon aracılı nörodejenerasyonu tetikleyerek AH'nin ilerlemesini hızlandırmaktadır (Kaur vd., 2019). Dolayısıyla, nöroinflamasyonun baskılanması, AH'nin ilerlemesini önlemek veya geciktirmek için alternatif bir strateji olabilir.

2008 yılında yapılan çalışmada *Faecalibacterium prausnitzii*'nin, NF-kapa B aktivasyonunu ve IL-8 üretimini bloke ederek anti-inflamatuvar etkiler sergilediği görülmüştür (Sokol vd., 2008). Bu bağlamda, *Faecalibacterium prausnitzii* AH'de inflamasyonu baskılayarak hastalığın ilerlemesini engelleyebilir. İnflamasyonu baskılayıcı *Faecalibacterium prausnitzii*'nin azalması dahil olmak üzere yaşa bağlı disbiyoz (bağırsak mikroflorasının dengesinin bozulması), AH'de beyinde β -amiloid birikimi ile ilişkilendirilmiştir (Cattaneo vd., 2017). *Faecalibacterium prausnitzii* azalması, bilişsel bozukluğu ve beyin amiloidozu olan hastalarda periferal bir inflamatuvar duruma neden olabilir. Bu doğrultuda, AH'de *Faecalibacterium prausnitzii* tedavi yaklaşımı amiloid birikimini azaltarak bilişsel işlevleri iyileştirebilir.

Bağırsak mikrobiyotası, nörohormonal sisteme etki etmektedir. Mikrobiyota-bağırsak-beyin eksenini bozuklukları, hipotalamik-hipofiz-adrenal ekseninin düzensizliği ile ilişkilendirilmiştir (Farzi vd., 2018). Adrenokortikotropik hormon ve kortikosteron düzeylerinin mikropsuz (germ-free) sıçanlarda arttığı gösterilmiştir (Sudo vd., 2004). Östrojen hem erkeklerde hem de kadınlarda bilişsel gerileme patogenezinde ve AH riskinde önemli bir rol oynamaktadır (Janicki vd., 2010). Testosteron ve diğer androjen hormonları, bilişsel işlevin düzenlenmesinde ve amiloid beta proteini birikiminin engellenmesinde rol oynamaktadır (Maggio vd., 2012). Bu bağlamda, AH'de hormon düzeylerinin incelenmesi hastalığın mekanizmasının aydınlatılmasında önemlidir. Sunulan projede AH'de hipotalamik-hipofiz-adrenal ekseninin değerlendirilmesi için kortikosteron seviyesinin ölçülmesi hedeflenmiştir.

Bağırsak peptid hormonlarının enerji homeostazından ve gıda alımının düzenlenmesinden sorumludur. AH'de bağırsak peptid hormonlarının merkezi sinir sistemi üzerinde etki göstererek öğrenme ve hafıza gibi sinir fonksiyonlarını da modüle etmektedir (Gomes vd., 2014; Folch vd., 2015; Theodoropoulou vd., 2012). Peptid hormonlarından grelin, glikoz ve lipid metabolizmalarının yanı sıra öğrenme ve hafıza gibi daha yüksek beyin işlevlerinde de yer almaktadır. Grelinin, nörodejeneratif bozuklukların etyopatogenezinde görev alarak metabolizma ve nörodejenerasyon arasında bir bağlantıyı temsil etmektedir (Stoyanova, 2014). Grelinin Amiloid- β oligomerizasyonunun neden olduğu toksisiteye karşı hücreleri koruduğu saptanmıştır (Moon vd., 2011). Başka bir çalışmada, AH hastalarında gözlenen plazma grelin düzeyindeki yaşa bağlı düşüş ve grelin sinyallemedeki bozulma, zayıflamış hafıza ve öğrenme süreçleri ile yakından ilişkilendirilmiştir (Rigamonti vd., 2002). Dolayısıyla, grelin hormonu AH patogenezinde ve

hastalığın ilerlemesinde önemli rol oynayabilir. Bu bağlamda, projede farelerde grelin hormon düzeyleri değerlendirilecektir.

Çalışmamızda, AH'nin patogenezinin altında yatan mekanizmanın anlaşılmasında ve tedaviye yönelik uygulamalarda *Faecalibacterium prausnitzii* bakterisinin etkileri incelenecektir. AH'nin transgenik hayvan modeli olan APP^{swe}/PS1^{dE9} (APP/PS1) fareleri ve eşleşen vahşi tip C57BL/6 fareleri kullanılacaktır. *Faecalibacterium prausnitzii* bakteriyel süspansiyon intragastrik gavaj yoluyla 4 hafta boyunca günlük olarak uygulanacaktır. Kontrol grubu için farelere, günlük olarak sodyum karboksil metil selüloz verilecektir. 4 hafta sonunda, bilişsel eksiklikler Morris su labirenti testi ve nesne tanıma testi ile değerlendirilecektir. Davranış analizinden sonra, kalpten kan örneği alınan fareler ketamin ksilazin anestezisi altında sakrifiye edilecektir. Alınan kan örneğinde kortikosteron ve grelin seviyesi ELISA yöntemi ile belirlenecektir. Sakrifiye edilen farelerin beyin dokuları çıkarılarak CD11b immünohistokimyasal olarak, amiloid- β 42 ise ELISA yöntemi ile incelenecektir. Özetle, *Faecalibacterium prausnitzii*'nin bağırsak mikrobiyotası-bağırsak-beyin eksenini düzenleyerek APP/PS1 farelerinde bilişsel bozukluklara, nörodejenerasyona, A β birikimlerine ve nöroinflamasyona karşı etkileri araştırılacaktır. *Faecalibacterium prausnitzii*'nin, AH ile ilişkili nöroinflamasyonu baskılamak için yeni bir probiyotik diyet takviyesi olabileceği düşünülmektedir.

2. Problem/Sorun:

Demans, hafızada, düşünmede, davranışta ve günlük aktiviteleri gerçekleştirme yeteneğinde bozulmanın olduğu bir sendromdur. Bu sendrom, yaşlı insanlar arasında engelliliğin ve bağımlılığın başlıca nedenlerinden biridir. Dünya çapında yaklaşık 50 milyon insan demans hastasıdır ve her yıl yaklaşık 10 milyon yeni demans vakası ortaya çıkmaktadır. Demansın en sık (vakaların %60-70'i) nedeni ise Alzheimer hastalığıdır. Demansın yalnızca hasta olan kişiler üzerinde değil, aynı zamanda demans hastalarının bakıcıları, aileleri ve genel olarak toplum üzerinde de fiziksel, psikolojik, sosyal ve ekonomik etkileri vardır (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>). Hastalar, öncelikle hafıza ve düşünme becerilerini, nihayetinde ise en basit fizyolojik işlevlerini yerine getirme yeteneğini dahi kaybederler. AH için mevcut tedaviler, herhangi bir aşamada olan hastalar için kolinesteraz inhibitörlerini ve orta-şiddetli AH demansı olan kişiler için memantini içermektedir. Bu ilaçların, hastalığın seyri sırasında uygun zamanda reçete edildiğinde hem hasta hem de bakıcı için yaşam kalitesini arttırdığı gösterilmiştir. Fakat, bu tedaviler hastalığın seyrini veya düşüş oranını değiştirmemektedir (Mossello vd., 2012; Howard vd., 2012). Dolayısıyla, Alzheimer hastalığı için mevcut olan **tedavi seçenekleri yetersiz** olup hastalığın ilerlemesini engelleyememektedir. Bu bağlamda, hastalıkla ilişkili bilişsel gerilemeyi azaltacak tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır.

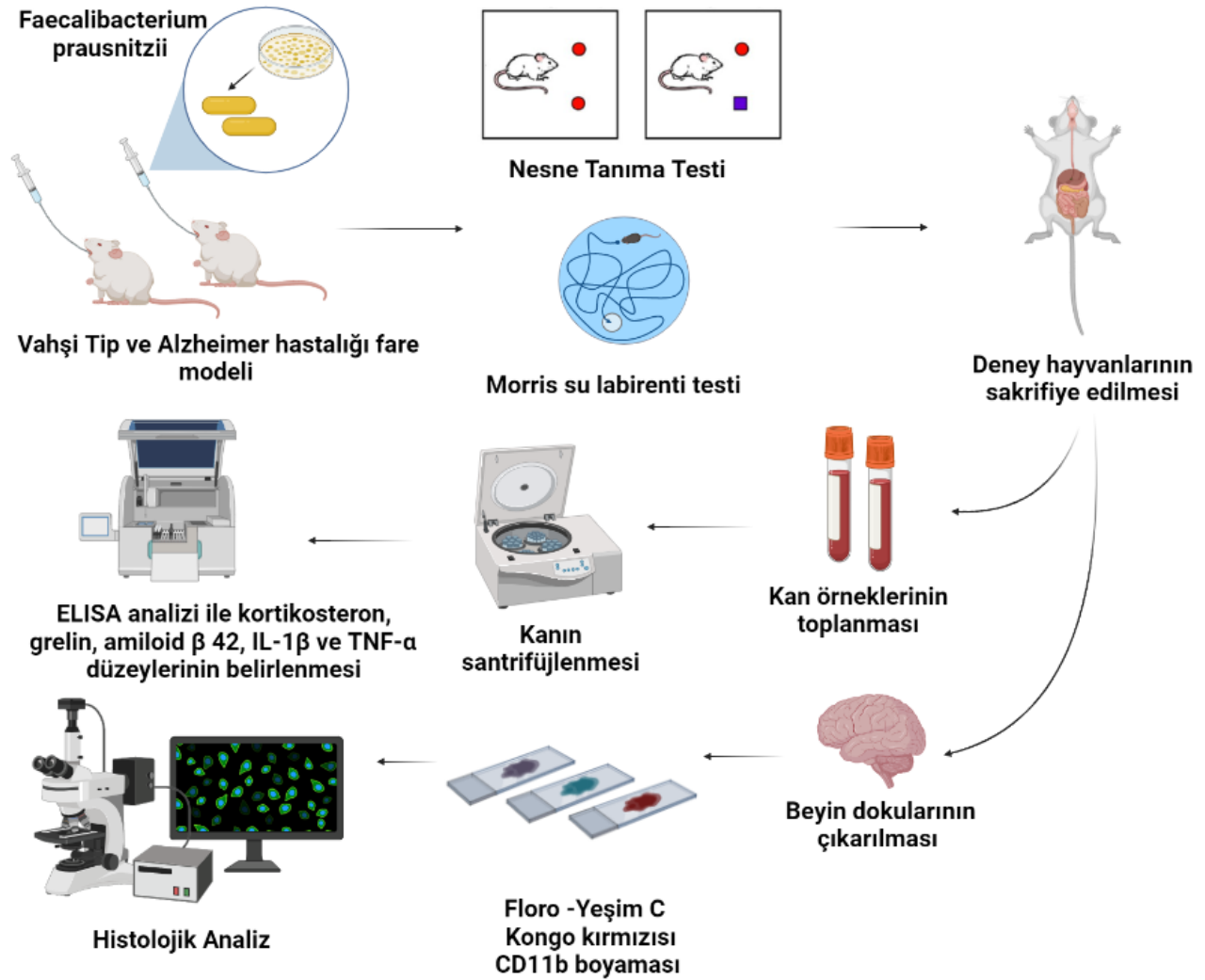
3. Çözüm

Demansın en sık nedeni olan Alzheimer hastalığının ilerlemesini yavaşlatacak ve oluşma riskini azaltacak tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi **amaçlanmıştır**. Bu bağlamda, nörokoruyucu etkilere sahip olan bütiratı sentezleyen *Faecalibacterium prausnitzii* bakterisinin AH'de olumlu etkilere sahip olacağı öne sürülmektedir. Bu bakterinin amiloid beta birikimini azaltarak hastalığın ilerlemesine ve bilişsel bozuklukların artmasına engel olacağı düşünülmektedir. *Faecalibacterium prausnitzii*, probiyotik olarak faydalı etkilere sahip olduğundan ve sağlıklı insan mikrobiyotasında mevcut olduğundan bu bakterinin yan etkilerinin en az olacağı düşünülmektedir (Ferreira-Halder vd., 2017). Alzheimer hastalığında, *Faecalibacterium prausnitzii* etkilerinin araştırılması, epilepsi

gibi mikrobiyota tarafından etkilenen diğer nörolojik hastalıkların tedavisi için de alternatif sunacaktır. Bu bakterinin olumlu etkilerinin saptanması durumunda, kombinasyon tedavileri için çalışmalar yapılabilir. Kombinasyon tedavileri, bireysel ajanların daha düşük dozlarında kullanımına olanak yaratarak tedavilerin maliyetlerini ve yan etkilerini azaltabilir (Cummings vd., 2019). Dolayısıyla, sunulan çalışma Alzheimer hastalarının yaşam kalitesini artırmakla birlikte ülkenin ekonomik yükünün de azaltılmasına katkıda bulunabilir.

4. Yöntem

Projede kullanılacak yöntem Figür 1’de kısaca açıklanmıştır.



Figür 1. Alzheimer hastalığında Faecalibacterium prausnitzii etkilerinin incelenmesi. Vahşi tip ve Alzheimer hastalığı farelere Faecalibacterium prausnitzii oral gavaj yoluyla 4 hafta boyunca günlük olarak uygulanacaktır. Kontrol grubu için farelere, günlük olarak sodyum karboksil metil selüloz verilecektir. 4 hafta sonunda, bilişsel eksiklikler Morris su labirenti testi ve nesne tanıma testi ile değerlendirilecektir. Davranış analizinden sonra, fareler ketamin ksilazin anestezisi altında sakrifiye edilecektir. Alınan kan örneğinde kortikosteron ve grelin seviyesi ELISA yöntemi ile belirlenecektir. Aynı zamanda kan örneklerinde amiloid-β42, IL-1β ve TNF-α seviyeleri de ölçülecektir. Sakrifiye edilen farelerin beyin dokuları çıkarılarak Kırmızı Kongo, Floro Yeşim C ve CD11b immünohistokimyasal olarak incelenecektir.

4.1 Hayvanlar modelleri: APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenik Alzheimer hastalığı fare modeli (APP/PS1) ve eşleşen vahşi tip C57BL/6 (WT) fareleri, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye'deki Model

Hayvan Araştırma Merkezi'nden satın alınacaktır. Tüm fareler, Yozgat Bozok Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı'nda, kontrollü bir sıcaklık (22 ± 1 °C) ortamında, bağıl nem ($65 \pm \%5$) ile büyütülecektir. Fareler, bir aydınlık/karanlık döngüsü altında barındırılacaktır. Deney sırasında su ve yiyecek ad libitum (serbest yemleme) olarak verilecektir. Tüm deneyler, Hayvan Deneyleri Kılavuzuna uygun olarak yapılacaktır ve Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından etik kurul onamı alınacaktır. 6 aylık APP/PS1 fareleri ($n = 20$), rastgele iki gruba ayrılacaktır: Faecalibacterium prausnitzii ile tedavi edilen grup ve APP/PS1 kontrol grubu.

4.2 Dozaj Bilgisi: Faecalibacterium prausnitzii (ATCC 27766, Manassas, Amerika Birleşik Devletleri, <https://www.atcc.org/products/27766>) bakterisinin 37°C derecede, anaerobik olarak LYHBHI ortamında [beyin-kalp infüzyon ortamının ana bileşeni (37 g/L, BD, Franklin Lakes, NJ, Amerika Birleşik Devletleri), maya özütü (5 g/L, Oxoid, Basingstoke, Birleşik Krallık), selobiyoz (1 g/L, Sigma, Louis, MO, Amerika Birleşik Devletleri), maltoz (1 g/L, Amresco, Solon, OH, Amerika Birleşik Devletleri), hemin (5 mg/L, Sigma) ve sistein (0,5 g/L, Sigma)] kültürü yapılacaktır (Sokol vd., 2008). Bakteriyel süspansiyonlar 850 x g'de 15 dakika boyunca 20 °C'de santrifüjlenecektir. Bir Vitek kolorimetre (bioMérieux) ile belirlendiği üzere mL başına 1×10^9 F. prausnitzii konsantrasyonuna kadar steril fosfat tamponlu salin ile iki kez yıkanacaktır. Bu doz, önceki çalışmalara göre seçilmiştir (Huang vd., 2016). Faecalibacterium prausnitzii ile tedavi edilen fareler, 4 hafta boyunca her gün aynı saatte 200 µL Faecalibacterium prausnitzii ile intragastrik olarak tedavi edilecektir. APP/PS1 kontrol grubu farelere, her gün aynı saatte aynı konsantrasyonda (200 µL) sodyum karboksil metil selüloz verilecektir. WT fareleri ayrıca günlük olarak aynı konsantrasyonda sodyum karboksil metil selüloz çözeltisi alacaktır.

4.3 Davranışsal Değerlendirme: Faecalibacterium prausnitzii tedavisinden sonra, bilişsel eksiklikler, daha önceki çalışmalarda tarif edildiği gibi Morris su labirenti (MSL) testi ve nesne tanıma testi (NTT) ile değerlendirilecektir (Sun vd., 2016; Sun vd., 2019). MSL testi, su ile doldurulmuş dairesel bir havuzda (120 cm çapında; 50 cm yüksekliğinde) ve yüzeyin 1 cm altına batırılmış görünmez sabit bir platformda (10 cm çapında) gerçekleştirilecektir. 1-5 arası eğitim günlerinde, fareler platformu aramak için eğitilecektir ve harcanan zaman kaçış gecikmesi olarak kaydedilecektir. Daha sonra platform sudan çıkarılarak farenin yüzme izleri, geçiş sayıları ve hedef kadranda geçirilen süre belirlenecektir. NTT 5 gün sürdürülecektir; fareler 2 gün boyunca bir açık alan kutusuna (25 cm x 25 cm x 35 cm) alıştırılacaktır. 3-4. günlerde, aynı malzemeden iki nesne alanın ortasında simetrik bir konuma yerleştirilecektir. Beşinci günde, fareler bir tanıdık nesne (3 cm x 2 cm x 3 cm) ve bir yeni nesne ile bölgeye geri getirilecektir. Tanıdık nesneyi (TN) ve yeni nesneyi (YN) keşfetmek için harcanan zaman kaydedilip ve analiz edilecektir. Keşif, nesneyi koklamak (1 cm içinde), pençelemek veya ısırarak tanımlanmaktadır. Bir ayırım indeksi (Aİ) “ $A\ddot{I} = (YN - TN / YN + TN) \times \%100$ ” formülü ile hesaplanacaktır.

4.4 Hormon Düzeylerinin Değerlendirmesi: Davranış analizinden 24 saat sonra farelere ötenazi uygulanacaktır. Gövde kanı EDTA kaplı tüplerde toplanacaktır ve 3500 x g'de 15 dakika santrifüjlenecektir. Plazma süpernatanı toplanarak kuru buz üzerinde saklanacaktır. Tüm numuneler daha sonraki analizler için -80 °C'de dondurulacaktır. Kortikosteron seviyeleri üreticilerin talimatlarına göre ticari olarak mevcut Kortikosteron ELISA Kiti kullanılarak belirlenecektir.

Grelin hormon düzeyleri, proteaz inhibitörleri (Pefbloc ve TPCK) ile muamele edilmiş plazma kullanılarak ELISA yoluyla ölçülecektir (Bonfili vd., 2017). Fare Grelin Aktif ELISA kiti, plazmadaki grelin moleküllerinin (aktif form) anti-grelin IgG tarafından yakalanmasına ve elde edilen kompleksin bir mikrotitre plakasının kuyularına immobilizasyonuna dayanan bir sandviç

ELISA'dır. İkinci bir biyotinlenmiş antikorun greline bağlanma ve bağlanmamış materyallerin yıkanması ve ardından yaban turpu peroksidazının immobilize biyotinlenmiş antikorlara konjuge edilmesinden sonra, immobilize edilmiş antikor-enzim konjugatlarının miktarı, substrat 3,3',5,5'-tetra-metilbenzidin varlığında yaban turpu peroksidaz aktivitelerinin izlenerek gerçekleştirilir. Enzim aktivitesi, şekillendirilmiş ürünlerin asitleştirilmesinden sonra 590 nm'de emicilikten düzeltilen 450 nm'de artan emicilik ile spektrofotometrik olarak ölçülür. Emicilikteki artış, bilinmeyen numunede yakalanan fare grelin (aktif form) miktarı ile doğru orantılı olduğundan, aktif grelin konsantrasyonu, bilinen referans standartlarıyla aynı tahlilde oluşturulan bir referans eğrisinden enterpolasyon yoluyla türetilir.

4.5 Histoloji Analizi: Davranış analizinden sonra farelere ötenazi uygulanacaktır ve beyinleri çıkarılacaktır. Çıkarılan doku sabitlendikten sonra bölümlere ayrılacaktır. Floro-Yeşim (Fluoro Jade) C ve Kongo kırmızısı boyama daha önceki çalışmalarda tarif edildiği gibi yapılacaktır (Li vd., 2018; Li vd., 2016). CD11b'nin lokalizasyonu bir lazer taramalı konfokal mikroskop kullanılarak tespit edilecektir. Dilimler ilk önce CD11b'ye karşı birincil antikorlarla (1:200; Southern Biotech, Birmingham, ABD) 4 °C'de gece boyunca inkübe edilecektir. Bu dilimler daha sonra uygun sekonder antikor ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilecektir ve antikorlar lazer taramalı konfokal mikroskop kullanılarak tespit edilerek fotoğraflanacaktır.

4.6 Amiloid Birikimi ve Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi: Amiloid β 42 konsantrasyonu, üreticinin talimatlarına göre ELISA (Invitrogen Corporation, Camarillo, California, ABD) ile ölçülecektir. $A\beta$ 22 düzeyi hesaplanarak μ g mg-1 olarak ifade edilecektir. IL-1 β ve TNF- α seviyeleri, üreticinin talimatlarına göre ELISA (Westang Bio-Tech Co., Ltd, Şanghay, Çin) kullanılarak tespit edilecektir; sonuçlar pg mg-1 olarak ifade edilecektir.

4.7 İstatistiksel Analiz: Tüm istatistiksel analizler SPSS 16.0 yazılımı kullanılarak yapılacaktır. Veriler, ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilecektir. İstatistiksel farklılıklar, tek yönlü bir ANOVA ve ardından Tukey testi ile analiz edilecektir. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilecektir.

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

- Çalışmada, Alzheimer hastalığının tedavisinde Faecalibacterium prausnitzii etkinliği **yenilikçi** ve **özgün** olarak **ilk kez** ele alınacaktır.
- Alzheimer hastalığında probiyotik kullanımının **grelin ve kortikosteron** seviyeleri üzerindeki etkileri ELISA yöntemi ile incelenecektir.
- Faecalibacterium prausnitzii'nin Alzheimer hastalığında bilişsel işlevlere etkileri **davranış testleri** ile, hücresel etkileri ise **histolojik analizlerle** belirlenecektir.
- Projemiz, demans başta olmak üzere nörolojik hastalıklarda probiyotik tedavilerinin geliştirilmesi açısından **ön çalışma** niteliği taşıyacaktır.
- Çalışmanın ülkemizde ve dünyada Alzheimer hastalığının riskinin azaltılmasında ve bu hastalığın ilerlemesinin yavaşlatılmasında yeni bir **terapötik yaklaşım** sunacağı düşünülmektedir.

6. Uygulanabilirlik

- Literatürde daha önce benzer probiyotik kullanımının Alzheimer hastalığı üzerinde etkileri incelenerek tedavi potansiyeli olabileceği gösterilmiştir (Sun vd., 2020). Sunulan projede benzer metodoloji kullanılacaktır. Farklı olarak, çalışmamızda grelin ve kortikosteron hormon seviyeleri de incelenerek mikrobiyotanın etkileri daha yakından incelenecektir.
- Alzheimer fare modellerinde *Faecalibacterium prausnitzii* kullanımı, tedavi edici etki gösterirse bir sonraki aşama olarak klinik çalışmalara başlanabilir.
- Sunulan proje Teknoloji Hazırlık Seviyeleri'nde THS 2 seviyesine uygun gelmektedir. Proje gerçekleştirilirse THS 4 seviyesine erişilecektir. Daha sonrasında, kliniğe uyarlama ve klinik çalışmalar şeklinde proje devam ettirilerek sanayileştirilebilir.

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

İş Paketleri	Zaman Planlaması	
1	<u>Deney hayvanlarının ve <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> temini:</u> Deney hayvanları Ankara Hayvan Araştırma Merkezinden temin edilecektir. <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> ise Amerika ATCC şirketinden satın alınacaktır.	1 ay
2	<u>Deney hayvanlarına <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> verilmesi:</u> Deney sürecinin başlatılabilmesi için <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> kültürde çoğaltılacaktır. Daha sonrasında <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> intragastrik olarak, deney hayvanlarına verilecektir.	1 ay
3	<u>Davranış testleri:</u> Hayvanların bilişsel işlevlerinin değerlendirilmesi için Morris su labirenti testi ve nesne tanıma testi yapılacaktır.	2 ay
4	<u>Hormon seviyelerinin belirlenmesi:</u> Davranış testlerinden sonra hayvanlar sakrifiye edilerek kan örnekleri toplanacaktır. Kan örneklerinde ELISA yöntemi ile kortikosteron ve grelin hormonlarının seviyeleri araştırılacaktır.	1 ay
5	<u>Amiloid birikimi ve sitokin düzeylerinin belirlenmesi:</u> Toplanan kan örneklerinde Amiloid β 42, IL-1 β ve TNF- α düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlenecektir.	1 ay
6	<u>Histolojik analiz:</u> Floro-Jade C, Kongo kırmızısı boyama ve CD11b immünohistokimyasal boyama ile amiloid birikimi, mikroglia aktivasyonu ve nöron hasarı değerlendirilecektir.	2 ay

8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar):

Demans ilerleyici bir bilişsel gerileme ile karakterize klinik bir sendromdur. Demans hastalarında hafıza, düşünce, davranış ve günlük aktiviteleri gerçekleştirme yeteneğinde bozulma görülmektedir (Cunningham vd., 2015). Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre ortalama 50 milyon insan demans hastasıdır ve her yıl yaklaşık 10 milyon yeni vakası ortaya çıkmaktadır. Demansın en sık nedeninin ise Alzheimer hastalığı olduğu bilinmektedir (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>).

Sunulan projede **Alzheimer hastaları** başta olmak üzere demans hastalarının tedavide kullanılabileceği probiyotik geliştirilmesini hedeflenmektedir. Alzheimer demansı olan bir ebeveyni veya kardeşi (birinci derece akrabası) olan bireylerin, Alzheimer'lı birinci derece akrabası olmayanlara göre hastalığa yakalanma olasılığı daha yüksektir (Green vd., 2002; Loy vd., 2014). Ayrıca, birden fazla birinci derece akrabası Alzheimer hastası olanlar daha da yüksek risk altındadır (Lautenschlager vd., 1996). Bu bağlamda, yapılan çalışma olumlu sonuç verirse **birinci derece**

akrabası Alzheimer hastası olan bireylerde önleyici terapi olarak *Faecalibacterium prausnitzii* kullanılabilir.

9. Riskler

Riskleri yönetebilmek için olasılık ve etki hesapları yapılarak toplam risk skoru ortaya konmalıdır.

En Önemli Riskler	Risk Yönetimi (B Planı)
Deney hayvanları istenen özelliklerde olmayabilir. Etki oranı: 10%	Farelerin temin edildiği Hayvan Araştırma Merkezi ile iletişime geçilerek bu sorun düzeltilebilir. Temin süresine bağlı olarak gecikme diğer iş paketlerindeki sürelerden tasarruf ile dengelenebilir.
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> kültürde çoğalmayabilir. Etki oranı: 15%	Kültürde kullanılan LYHBHI ortamı literatürde <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> için önerilen diğer ortamlar ile değiştirilebilir (Martín vd., 2017).
Hormon düzeylerinin belirlenmesinde ELISA kiti çalışmayabilir. Etki oranı: 40%	Üretici firma ile görüşülerek kitlerin tekrar temini sağlanacaktır. Deney tekrarlanacaktır. ELISA analizlerinde tekrar sorun yaşanması durumunda, greline alternatif olarak leptin, IL-6 ve TNF- α sitokinlerine alternatif olarak IL-1 ve IFN- γ , kortikosterona alternatif olarak aldosteron seviyeleri incelenecektir.
Histolojik analizde boyanma gerçekleşmeyebilir. Etki oranı: 35%	Üretici firma ile görüşülerek boyanın tekrar temini sağlanacaktır. Deney tekrarlanacaktır.

10. Kaynaklar

- Abraham, D., Feher, J., Scuderi, G. L., Szabo, D., Dobolyi, A., Cservenak, M., Juhasz, J., Ligeti, B., Pongor, S., Gomez-Cabrera, M. C., Vina, J., Higuchi, M., Suzuki, K., Boldogh, I., & Radak, Z. 2019. "Exercise and probiotics attenuate the development of Alzheimer's disease in transgenic mice: Role of microbiome", *Experimental gerontology*, 115, 122–131.
- Akbari, E., Asemi, Z., Daneshvar Kakhaki, R., Bahmani, F., Kouchaki, E., Tamtaji, O. R., Hamidi, G. A., & Salami, M. 2016. "Effect of Probiotic Supplementation on Cognitive Function and Metabolic Status in Alzheimer's Disease: A Randomized, Double-Blind and Controlled Trial", *Frontiers in aging neuroscience*, 8, 256.
- Angelucci, F., Cechova, K., Amlerova, J., & Hort, J. 2019. "Antibiotics, gut microbiota, and Alzheimer's disease", *Journal of neuroinflammation*, 16(1), 108.
- Cattaneo, A., Cattane, N., Galluzzi, S., Provasi, S., Lopizzo, N., Festari, C., Ferrari, C., Guerra, U. P., Paghera, B., Muscio, C., Bianchetti, A., Volta, G. D., Turla, M., Cotelli, M. S., Gennuso, M., Prella, A., Zanetti, O., Lussignoli, G., Mirabile, D., Bellandi, D., ... INDIA-FBP Group 2017. "Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly", *Neurobiology of aging*, 49, 60–68.
- Farzi, A., Fröhlich, E. E., & Holzer, P. 2018. "Gut Microbiota and the Neuroendocrine System", *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 15(1), 5–22.

- Ferreira-Halder, C. V., Faria, A., & Andrade, S. S. 2017. "Action and function of *Faecalibacterium prausnitzii* in health and disease", *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 31(6), 643–648.
- Gallardo, G., & Holtzman, D. M. 2019. "Amyloid- β and Tau at the Crossroads of Alzheimer's Disease", *Advances in experimental medicine and biology*, 1184, 187–203.
- Ho, L., Ono, K., Tsuji, M., Mazzola, P., Singh, R., & Pasinetti, G. M. 2018. "Protective roles of intestinal microbiota derived short chain fatty acids in Alzheimer's disease-type beta-amyloid neuropathological mechanisms", *Expert review of neurotherapeutics*, 18(1), 83–90.
- Janeiro, M. H., Ramírez, M. J., & Solas, M. 2021. "Dysbiosis and Alzheimer's Disease: Cause or Treatment Opportunity?", *Cellular and molecular neurobiology*, 10.1007/s10571-020-01024-9. Advance online publication.
- Kim, S. K., Guevarra, R. B., Kim, Y. T., Kwon, J., Kim, H., Cho, J. H., Kim, H. B., & Lee, J. H. 2019. "Role of Probiotics in Human Gut Microbiome-Associated Diseases", *Journal of microbiology and biotechnology*, 29(9), 1335–1340.
- Li, H., Sun, J., Wang, F., Ding, G., Chen, W., Fang, R., Yao, Y., Pang, M., Lu, Z. Q., & Liu, J. 2016. "Sodium butyrate exerts neuroprotective effects by restoring the blood-brain barrier in traumatic brain injury mice", *Brain research*, 1642, 70–78.
- Liu, J., Wang, F., Liu, S., Du, J., Hu, X., Xiong, J., Fang, R., Chen, W., & Sun, J. 2017. "Sodium butyrate exerts protective effect against Parkinson's disease in mice via stimulation of glucagon like peptide-1", *Journal of the neurological sciences*, 381, 176–181.
- Maggio, M., Dall'Aglio, E., Lauretani, F., Cattabiani, C., Ceresini, G., Caffarra, P., Valenti, G., Volpi, R., Vignali, A., Schiavi, G., & Ceda, G. P. 2012. "The hormonal pathway to cognitive impairment in older men", *The journal of nutrition, health & aging*, 16(1), 40–54.
- Martín, R., Miquel, S., Benevides, L., Bridonneau, C., Robert, V., Hudault, S., Chain, F., Berteau, O., Azevedo, V., Chatel, J. M., Sokol, H., Bermúdez-Humarán, L. G., Thomas, M., & Langella, P. 2017. "Functional Characterization of Novel *Faecalibacterium prausnitzii* Strains Isolated from Healthy Volunteers: A Step Forward in the Use of *F. prausnitzii* as a Next-Generation Probiotic", *Frontiers in microbiology*, 8, 1226.
- Matt, S. M., Allen, J. M., Lawson, M. A., Mailing, L. J., Woods, J. A., & Johnson, R. W. 2018. "Butyrate and Dietary Soluble Fiber Improve Neuroinflammation Associated With Aging in Mice", *Frontiers in immunology*, 9, 1832.
- Soria Lopez, J. A., González, H. M., Léger, G. C. 2019. "Alzheimer's disease", *Handbook of clinical neurology*, 167, 231–255.
- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X. N., Kubo, C., & Koga, Y. 2004. "Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice", *The Journal of physiology*, 558(Pt 1), 263–275.
- Weller, J., & Budson, A. 2018. "Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment", *F1000Research*, 7, F1000 Faculty Rev-1161.
- Williams N. T. 2010. "Probiotics", *American journal of health-system pharmacy: AJHP: official*
- Kaur, D., Sharma, V., & Deshmukh, R. (2019). Activation of microglia and astrocytes: a roadway to neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology*, 27(4), 663–677.

- Pistollato, F., Sumalla Cano, S., Elio, I., Masias Vergara, M., Giampieri, F., & Battino, M. (2016). Role of gut microbiota and nutrients in amyloid formation and pathogenesis of Alzheimer disease. *Nutrition reviews*, 74(10), 624–634.
- La Rosa, F., Clerici, M., Ratto, D., Occhinegro, A., Licito, A., Romeo, M., Iorio, C. D., & Rossi, P. (2018). The Gut-Brain Axis in Alzheimer's Disease and Omega-3. A Critical Overview of Clinical Trials. *Nutrients*, 10(9), 1267.
- Vogt, N. M., Kerby, R. L., Dill-McFarland, K. A., Harding, S. J., Merluzzi, A. P., Johnson, S. C., Carlsson, C. M., Asthana, S., Zetterberg, H., Blennow, K., Bendlin, B. B., & Rey, F. E. (2017). Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Scientific reports*, 7(1), 13537.
- Zhuang, Z. Q., Shen, L. L., Li, W. W., Fu, X., Zeng, F., Gui, L., Lü, Y., Cai, M., Zhu, C., Tan, Y. L., Zheng, P., Li, H. Y., Zhu, J., Zhou, H. D., Bu, X. L., & Wang, Y. J. (2018). Gut Microbiota is Altered in Patients with Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 63(4), 1337–1346.
- Zhang, L., Wang, Y., Xiayu, X., Shi, C., Chen, W., Song, N., Fu, X., Zhou, R., Xu, Y. F., Huang, L., Zhu, H., Han, Y., & Qin, C. (2017). Altered Gut Microbiota in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 60(4), 1241–1257.
- Peng, X., Meng, J., Chi, T., Liu, P., Man, C., Liu, S., Guo, Y., & Jiang, Y. (2014). *Lactobacillus plantarum* NDC 75017 alleviates the learning and memory ability in aging rats by reducing mitochondrial dysfunction. *Experimental and therapeutic medicine*, 8(6), 1841–1846.
- <https://www.atcc.org/products/27766>
- Huang, X. L., Zhang, X., Fei, X. Y., Chen, Z. G., Hao, Y. P., Zhang, S., ... & Yu, C. G. (2016). *Faecalibacterium prausnitzii* supernatant ameliorates dextran sulfate sodium induced colitis by regulating Th17 cell differentiation. *World journal of gastroenterology*, 22(22), 5201.
- <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Mossello, E., & Ballini, E. (2012). Management of patients with Alzheimer's disease: pharmacological treatment and quality of life. *Therapeutic advances in chronic disease*, 3(4), 183–193.
- Howard, R., McShane, R., Lindesay, J., Ritchie, C., Baldwin, A., Barber, R., Burns, A., Dening, T., Findlay, D., Holmes, C., Hughes, A., Jacoby, R., Jones, R., Jones, R., McKeith, I., Macharouthu, A., O'Brien, J., Passmore, P., Sheehan, B., Juszczak, E., ... Phillips, P. (2012). Donepezil and memantine for moderate-to-severe Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine*, 366(10), 893–903.
- Cummings, J. L., Tong, G., & Ballard, C. (2019). Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 67(3), 779–794.
- Ferreira-Halder, C. V., Faria, A., & Andrade, S. S. (2017). Action and function of *Faecalibacterium prausnitzii* in health and disease. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 31(6), 643–648.
- Cunningham, E. L., McGuinness, B., Herron, B., & Passmore, A. P. (2015). Dementia. *The Ulster medical journal*, 84(2), 79–87.
- Green, R. C., Cupples, L. A., Go, R., Benke, K. S., Edeki, T., Griffith, P. A., Williams, M., Hips, Y., Graff-Radford, N., Bachman, D., Farrer, L. A., & MIRAGE Study Group (2002). Risk of dementia among white and African American relatives of patients with Alzheimer disease. *JAMA*, 287(3), 329–336.

- Loy, C. T., Schofield, P. R., Turner, A. M., & Kwok, J. B. (2014). Genetics of dementia. *Lancet* (London, England), 383(9919), 828–840.
- Lautenschlager, N. T., Cupples, L. A., Rao, V. S., Auerbach, S. A., Becker, R., Burke, J., Chui, H., Duara, R., Foley, E. J., Glatt, S. L., Green, R. C., Jones, R., Karlinsky, H., Kukull, W. A., Kurz, A., Larson, E. B., Martelli, K., Sadovnick, A. D., Volicer, L., Waring, S. C., ... Farrer, L. A. (1996). Risk of dementia among relatives of Alzheimer's disease patients in the MIRAGE study: What is in store for the oldest old?. *Neurology*, 46(3), 641–650.
- Janicki, S. C., & Schupf, N. (2010). Hormonal influences on cognition and risk for Alzheimer's disease. *Current neurology and neuroscience reports*, 10(5), 359–366.
- Sun, J., Wang, F., Ling, Z., Yu, X., Chen, W., Li, H., Jin, J., Pang, M., Zhang, H., Yu, J., & Liu, J. (2016). *Clostridium butyricum* attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in diabetic mice via modulation of gut microbiota. *Brain research*, 1642, 180–188.
- Sun, J., Liu, S., Ling, Z., Wang, F., Ling, Y., Gong, T., Fang, N., Ye, S., Si, J., & Liu, J. (2019). Fructooligosaccharides Ameliorating Cognitive Deficits and Neurodegeneration in APP/PS1 Transgenic Mice through Modulating Gut Microbiota. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(10), 3006–3017.
- Li, H., Sun, J., Wang, F., Ding, G., Chen, W., Fang, R., Yao, Y., Pang, M., Lu, Z. Q., & Liu, J. (2016). Sodium butyrate exerts neuroprotective effects by restoring the blood-brain barrier in traumatic brain injury mice. *Brain research*, 1642, 70–78.
- Li, H., Sun, J., Du, J., Wang, F., Fang, R., Yu, C., Xiong, J., Chen, W., Lu, Z., & Liu, J. (2018). *Clostridium butyricum* exerts a neuroprotective effect in a mouse model of traumatic brain injury via the gut-brain axis. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 30(5), e13260.
- Gomes, S., Martins, I., Fonseca, A. C., Oliveira, C. R., Resende, R., & Pereira, C. M. (2014). Protective effect of leptin and ghrelin against toxicity induced by amyloid- β oligomers in a hypothalamic cell line. *Journal of neuroendocrinology*, 26(3), 176–185.
- Folch, J., Patraca, I., Martínez, N., Pedrós, I., Petrov, D., Etcheto, M., Abad, S., Marin, M., Beas-Zarate, C., & Camins, A. (2015). The role of leptin in the sporadic form of Alzheimer's disease. Interactions with the adipokines amylin, ghrelin and the pituitary hormone prolactin. *Life sciences*, 140, 19–28.
- Theodoropoulou, A., Metallinos, I. C., Psyrogiannis, A., Vagenakis, G. A., & Kyriazopoulou, V. (2012). Ghrelin and leptin secretion in patients with moderate Alzheimer's disease. *The journal of nutrition, health & aging*, 16(5), 472–477.
- Stoyanova. Ghrelin: A link between ageing, metabolism and neurodegenerative disorders. *Neurobiology of Disease*, 1–12 (2014).
- Moon, M. et al. Ghrelin ameliorates cognitive dysfunction and neurodegeneration in intrahippocampal amyloid-beta1-42 oligomer-injected mice. *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 23, 147–159, doi:10.3233/JAD-2010-101263 (2011).
- Rigamonti, A. E., Pincelli, A. I., Corrà, B., Viarengo, R., Bonomo, S. M., Galimberti, D., Scacchi, M., Scarpini, E., Cavagnini, F., & Müller, E. E. (2002). Plasma ghrelin concentrations in elderly subjects: comparison with anorexic and obese patients. *The Journal of endocrinology*, 175(1), R1–R5.
- Bonfili, L., Cecarini, V., Berardi, S., Scarpona, S., Suchodolski, J. S., Nasuti, C., ... & Eleuteri, A. M. (2017). Microbiota modulation counteracts Alzheimer's disease progression influencing neuronal proteolysis and gut hormones plasma levels. *Scientific reports*, 7(1), 1–21.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., BermúdezHumarán, L.G., Gratadoux,

- J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J., Corthier, G., 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16731–16736.
- Sun, J., Xu, J., Yang, B., Chen, K., Kong, Y., Fang, N., Gong, T., Wang, F., Ling, Z., & Liu, J. (2020). Effect of *Clostridium butyricum* against Microglia-Mediated Neuroinflammation in Alzheimer's Disease via Regulating Gut Microbiota and Metabolites Butyrate. *Molecular nutrition & food research*, 64(2), e1900636.

