



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GLİOBLASTOMA HÜCRESİNDE HİDROJEN
PEROKSİT İLE OLUŞTURULAN OKSİDATİF
STRESTE QUERCETİN VE DONEPEZİLİN HÜCRE
CANLILIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

AHMET ALBAYRAK

DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK VE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2022

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GLİOBLASTOMA HÜCRESİNDE HİDROJEN
PEROKSİT İLE OLUŞTURLAN OKSİDATİF
STRESTE QUERCETİN VE DONEPEZİLİN HÜCRE
CANLILIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

AHMET ALBAYRAK

DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK VE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2022

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, alıntı yapılan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Ahmet ALBAYRAK



Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (KSÜ BAP) tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2019/4-22D.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

GLİOBLASTOMA HÜCRESİNDE HİDROJEN PEROKSİT İLE OLUŞTURLAN OKSİDATİF STRESTE QUERCETİN VE DONEPEZİLİN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

(DOKTORA TEZİ)

Ahmet ALBAYRAK

ÖZET

Polifenoller, insan diyetinde doğal antioksidan moleküllerdir. Bu antioksidan bileşikler hücrede oluşan serbest radikalleri temizleme yeteneğine sahip olup nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu etkileri bulunmaktadır. Son zamanlarda, kolinesteraz (ChE) inhibitörü ve nöroprotektif ajanlar içeren kombinasyon tedavilerinin Alzheimer hastalığının önlenmesinde etkili bir yaklaşım olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda, glioblastoma U-118 MG hücrelerinde H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif hasara karşı ana polifenolik bileşik olan quercetin ile bir kolinesteraz inhibitörü olan donepezil kombinasyonunun nöroprotektif etkilerini incelemeyi amaçladık. U-118 MG hücreleri quercetin ve donepezil ön işlemlerinin ardından H_2O_2 ile muamele edilerek oksidatif strese maruz bırakıldı. Oksidatif stres hasarı oluşturmak için U-118 MG hücre hattına $250 \mu M$ H_2O_2 ilave edilerek 24 saat süreyle $37^\circ C$ 'de inkübe edildi. H_2O_2 'nin neden olduğu oksidatif streste quercetin ve donepezil'in koruyucu etkisini araştırmak için 4 farklı çalışma grubu oluşturuldu. Öncelikle U-118 MG hücre serisinde quercetin ve donepezil'in hücre canlılığına etkisi incelendi. Sonrasında ise U-118 hücre hattında H_2O_2 'nin neden olduğu oksidatif hasar oluşumunda quercetin ve donepezil'in önce ve sonra uygulamalarıyla etkin konsantrasyonu belirlendi. Son olarak quercetin ve donepezil kombinasyon uygulamasının hücre canlılığına etkisi incelendi. Hücre canlılık testi için hücre serilerine 2,3-Bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (XTT) yöntemi uygulandı. Bulgularımız sonucunda donepezil'in oksidatif stresin neden olduğu hücre hasarında koruyucu veya tedavi edici etkileri görülmezken quercetin ve kombinasyon uygulamalarının bütün dozlarda oksidatif stresin neden olduğu hücre hasarında koruyucu veya tedavi edici etkileri görülmektedir. Quercetin ve kombinasyon uygulamalarının nöroprotektif etki göstermesi, nörodenjeratif hastalıkların klinik tedavisi için ilaç geliştirilmesine yeni bir yaklaşım sunabilir.

Anahtar Kelimeler: Quercetin, Donepezil, Alzheimer Hastalığı, U-118 MG Glioblastoma

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik ve Bilimler Bölümü, Şubat / 2022

Danışman: Prof. Dr. Mustafa ÇELİK
Sayfa sayısı: 74

INVESTIGATION OF THE EFFECTIVENESS OF QUERCETIN AND DONEPEZIL ON CELL VITALITY IN OXIDATIVE STRESS GENERATED BY HYDROGEN PEROXIDE IN GLIOBLASTOMA CELL

(Ph. D. THESIS)

Ahmet ALBAYRAK

ABSTRACT

Polyphenols are natural antioxidant molecules in the human diet. These antioxidant compounds have the ability to scavenge free radicals formed in the cell, as a result of which they have protective effects against neurodegenerative diseases. Recently, combination therapies containing cholinesterase (ChE) inhibitors and neuroprotective agents have been shown to be a more effective approach in the treatment and prevention of Alzheimer's disease. Therefore, this study was designed to evaluate the neuroprotective effects of the combination of quercetin, the main polyphenolic compound, and donepezil, a cholinesterase inhibitor, against H₂O₂-induced oxidative damage in glioblastoma U-118 MG cells. U-118 MG cells were exposed to oxidative stress with Hydrogen peroxide (H₂O₂) after quercetin and donepezil pretreatments. In order to induce oxidative stress damage of the U-118 MG cell line, incubation was performed based on a 24-hour application time of 250 µM H₂O₂. In the study, 4 different study groups were selected to investigate the protective effect of quercetin and donepezil on oxidative stress caused by H₂O₂. First of all, the effects of quercetin and donepezil on cell viability were investigated in the U-118 MG cell line. Afterward, the effective concentration of quercetin and donepezil in the formation of oxidative damage caused by H₂O₂ in the U-118 cell line was determined by pre-and post-applications. Finally, the effect of quercetin and donepezil combination application on cell viability was investigated. For cell viability assay, 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (XTT) analysis was applied to cell lines. As a result of our findings, while no protective or therapeutic effects of donepezil are observed in cell damage caused by oxidative stress, protective or therapeutic effects of quercetin and combination applications are observed in cell damage caused by oxidative stress. The neuroprotective effect of quercetin and its combination applications offers a new approach to drug development for the clinical treatment of neurodegenerative diseases.

Key Words: Quercetin, Donepezil, Alzheimer's disease, Oxidative stress, U-118 MG glioblastoma

Kahramanmaraş Sütçü imam University
Institute for Graduate Studies in Science and Technology
Department of Bioengineering and Sciences, February / 2022

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa ÇELİK
Page number: 74

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, tüm çalışmalarım boyunca bana rehber olan, her zaman destek olup yol gösteren akademik hayata teşvik eden, her anlamda yanımda olan, yaşamım boyunca örnek alacağım değerli danışman hocam Prof. Dr. Mustafa ÇELİK'e

Bilgi ve tecrübeleri ile eğitimime katkı sağlayan, tezimin hazırlanması sürecinde değerli katkılarıyla, desteklerini, tecrübe ve bilgisini hiçbir zaman esirgemeyen, her konuda kendisinden çok şey öğrendiğim, hücre kültürü laboratuvarındaki üstün bilgi ve deneyimini benimle paylaşan kıymetli hocam Doç.Dr. Akif Hakan KURT'a,

Tez çalışmamın yürütülmesi aşamasında bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren Biyofizik AD. Öğretim üyesi saygıdeğer hocam Selma YAMAN'a

Değerli önerileri ve destekleri ile tez çalışmalarına katkıda bulunan Tıbbi Farmakoloji AD. Öğretim Üyesi kıymetli hocam Nadire ESER'e

Deney sonuçlarımın istatistiksel değerlendirmesine katkı sağlayan Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim AD. Öğretim üyesi değerli hocam Adem DOĞANER'e,

Tez deneylerimde ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, tez çalışması sürecinde tecrübe ve eşsiz bilgilerinden yararlandığım Kimya Teknolojisi AD. Öğretim üyesi Derya KILIÇASLAN'a

Yaşamım boyunca her şeyimi borçlu olduğum, sevgi, ilgi ve desteğini esirgemeyen sevgili aileme, ayrıca eşim Meryem ve kızım Zeynep'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

10/02/2022

AHMET ALBAYRAK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. Polifenoller ve flavonoidler	1
1.1.1. Flavonoidler'in kimyası	2
1.1.2. Serbest Radikaller	3
1.1.2.1. Serbest Radikal Türleri	4
1.1.2.2. Serbest Radikal Kaynakları	5
1.1.2.2.1. Ekzojen Serbest Radikal Kaynağı	5
1.1.2.2.2. Endojen Serbest Radikal Kaynağı	6
1.1.3. Oksidatif stres	6
1.1.4. Serbest ROS ve RNS'lerin biyolojik özellikleri	7
1.1.4.1. Oksidatif stresin lipitler üzerine etkileri	7
1.1.4.2. Oksidatif stresin DNA üzerindeki etkileri	7
1.1.4.3. Oksidatif stresin proteinler üzerindeki etkileri	8
1.1.5. Antioksidanlar	8
1.1.5.1. Enzimatik antioksidanlar	9
1.1.5.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar	10
1.1.5.3. Antioksidan özelliklere sahip flavonoidler	12
1.2. Quercetin	12
1.2.1. Quercetin'in Farmakolojik Etkileri	13
1.2.1.1. Antioksidan Etkileri	13
1.2.1.2. Nöroprotektif Etkileri	14
1.2.1.3. Anti-enflamatuar Etkileri	16
1.2.1.4. Antikanser Etkileri	16
1.2.1.5. Antimikrobiyal ve antiviral etkileri	17
1.2.1.6. Anti-ülser ve gastrit etkileri	17
1.2.1.7. Kardiyovasküler hastalıklar ve ateroskleroz	17
1.2.2. Quercetin'in Farmakokinetik Parametreleri	19
1.3. Donepezil	20
1.3.1. Donepezil'in Farmakolojik özellikleri	22
1.3.2. Donepezil'in Farmakokinetik Özellikleri	23
1.3.3. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojik Mekanizmaları	27
1.3.4. Alzheimer Hastalığına Terapötik Yaklaşımlar	30

1.3.4.1. Farmakolojik terapötik yaklaşımlar	30
1.3.4.2. Farmakolojik Olmayan Terepotik Yaklaşımları	31
2. MATERYAL VE METOT	32
2.1. Materyal	32
2.1.1. Kullanılan cihazlar	32
2.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler	33
2.2. Metot	33
2.2.1. Hücre kültürü uygulamaları	33
2.2.1.1. Glioblastoma (U-118 MG) hücre serisi	34
2.2.2. Hücrelerin pasajlanması (Subculturing)	34
2.2.2.3. Hücrelerin toplanması	34
2.2.2.4. Hücrelerin çözülmesi	35
2.2.2.5. Hücrelerin sayılması	35
2.2.2.6. Hücre hatlarında H ₂ O ₂ ile hasar modelinin oluşturulması	36
2.2.2.7. Donepezil ve Quercetin stok çözeltilerinin hazırlanması	37
2.2.2.8. H ₂ O ₂ ile Donepezil ve Quercetin stok çözeltilerinin hazırlanması ...	37
2.2.2.9. U-118 MG hücrelerinde Donepezil ve Quercetin etkilerinin ayrı ayrı değerlendirilmesi	37
2.2.2.10. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi Donepezil ve Quercetin etkisinin değerlendirilmesi	38
2.2.2.11. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu sonrası Donepezil ve Quercetin ayrı ayrı etkisinin değerlendirilmesi	38
2.2.2.12. U-118 MG hücrelerinde Donepezil ve Quercetin etkisinin birlikte değerlendirilmesi	39
2.2.2.12.1. Donepezil ve Quercetin Birlikte Uygulanmasının Oksidatif Hasar Öncesi U-118 MG Hücre Canlılığı Üzerine etkileri	39
2.2.2.12.2. Oksidatif Hasar Sonrası U-118 MG Hücrelerinde Quercetin ve Donepezilin Birlikte Uygulanmasının Değerlendirilmesi	39
2.2.2.13. Hücre Proliferasyon Canlılık Testi II (XTT)	40
3. BULGULAR	41
3.1. Hücre Kültürü Uygulamaları	41
3.1.1. Hücre hatlarında H ₂ O ₂ ile hasar modelinin oluşturulması	41
3.1.2. U-118 MG Hücrelerinde quercetin etkisinin değerlendirilmesi	42
3.1.3. U-118 MG hücrelerinde donepezil uygulamasının değerlendirilmesi	43
3.1.4. U-118 MG hücrelerinde quercetin ve donepezilin birlikte uygulanmasının değerlendirilmesi	44
3.1.5. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi quercetin etkisinin değerlendirilmesi	45
3.1.6. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi donepezilin etkisinin değerlendirilmesi	46
3.1.7. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi quercetin ile donepezilin birlikte uygulamasının etkisinin değerlendirilmesi	47
3.1.8. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu sonrası quercetin etkisinin değerlendirilmesi	49

3.1.9. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu sonrası donepezilin etkisinin değerlendirilmesi	50
3.1.10. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum sonrası quercetin ile donepezilin birlikte etkisinin değerlendirilmesi	51
4. TARTIŞMA.....	53
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR.....	56
ÖZGEŞMİŞ	74



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Polifenollerin sınıflandırılması.....	2
Şekil 1.2. Temel flavonoid yapısı.....	2
Şekil 1.3. Endojen serbest radikal ROS ve RNS oluşumu	6
Şekil 1.4. Quercetin kimyasal yapısı	13
Şekil 1.5. Donepezil ve Donepezil 3 boyutlu molekül formülü	21
Şekil 1.6. Donepezil sentezi	21
Şekil 1.7. Alzheimer hastalığının patogenezi	30
Şekil 2.1. U-118 MG hücre hattı üzerinde H ₂ O ₂ uygulama	37
Şekil 2.2 XTT ‘in formazan kristaline dönüşüm reaksiyonu.....	40
Şekil 3.1. U-118 MG hücrelerinde hidrojen peroksitin hücre canlılığı üzerine etkisi.....	41
Şekil 3.2. U-118 MG hücrelerinde quercetin hücre canlılığına etkisi.....	42
Şekil 3.3. U-118 MG hücrelerinde donepezilin hücre canlılığına etkisi	43
Şekil 3.4. U-118 MG hücrelerinde donepezilin ile quercetin hücre canlılığına etkisi	44
Şekil 3.5. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi quercetin hücre canlılığına etkisi	45
Şekil 3.6. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi donepezilin hücre canlılığına etkisi	46
Şekil 3.7. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi quercetin ile donepezilin birlikte uygulamasının hücre canlılığına etkisi	48
Şekil 3.8. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu sonrası quercetin hücre canlılığına etkisi	49
Şekil 3.9. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu sonrası donepezilin hücre canlılığına etkisi	50
Şekil 3.10. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum sonrası quercetin ile donepezilin birlikte uygulaması hücre canlılığına etkisi.....	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Reaktif oksijen türleri (ROS).....	4
Çizelge 1.2. Reaktif nitrojen türleri (RNS).....	5
Çizelge 1.3. Quercetin ve türevlerinin Alzheimer modellerinde nöroprotektif etkileri.....	18
Çizelge 1.4. Donepezil uygulamaları.....	27
Çizelge 2.1. Kullanılan kimyasal maddeler	33
Çizelge 3.1. U-118 MG H ₂ O ₂ ile oluşturulan hasar modelinde istatistiksel sonuçlar	41
Çizelge 3.2. U-118 MG Hücre hattına quercetin yalnız uygulaması.....	42
Çizelge 3.3. U-118 MG üzerine donepezil uygulamasının istatistiksel sonuçları	43
Çizelge 3.4. U-118 MG quercetin ve donepezil birlikte uygulamasının istatistiksel sonuçları	44
Çizelge 3.5. Oksidatif hasar oluşum öncesi quercetin hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.....	45
Çizelge 3.6. Oksidatif hasar oluşum öncesi donepezil hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri	46
Çizelge 3.7. Oksidatif hasar oluşum öncesi quercetin ile donepezil birlikte uygulaması hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.....	47
Çizelge 3.8. Oksidatif hasar oluşum sonrası quercetin hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.....	49
Çizelge 3.9 Oksidatif hasar oluşumu sonrası donepezil hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.....	50
Çizelge 3.10 Oksidatif hasar oluşum sonra quercetin ile donepezil birlikte uygulamasının hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.....	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

U-118 MG	: Glioblastoma Hücreleri
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
O₂-	: Süperoksit Anyonu
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
ATP	: Adenozin Trifosfat
OH-	: Hidroksil Radikali
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
RNS	: Reaktif Nitrojen Türlerini
GSH	: Glutasyon Peroksidaz
SOD	: Süperoksit Dismutaz
ROO-	: Peroksil Radikali
AMPK	: Adenozin Monofosfa ile Aktifleştirilen Protein Kinaz
APP	: Amiloid Öncül Protein
Aβ42	: Amiloid- β 42
COX	: Siklooksijenaz
CRP	: C-reaktif protein
FAP	: Familyal Adenomatöz Polipozis
NF-κ B	: Nükleer Faktörü Kappa B
PAF	: Trombosit Aktive Edici Aktör
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
SHR	: Spontan Hipertansiyon Sıçanlar
L-NAME	: N-nitro-L-arginin Metil Ester
DOCA	: Deoksikortikosteron Asetat
ACh	: Asetilkolin
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
HRV	: Kalp Atış Hızı Değişkenliğini
NBM	: Nükleus Basalis Magnocellularis
BDNF	: Beyin Türevli Nörotrofik Faktör
NFT	: Nörofibriler Yumaklar
NMDA	: N-metil-d-aspartat Antagonistler
HSPG	: Heparan Sülfat Proteoglikanlar

HLA-DR	: İnsan Lökosit Antijen-DR
RAGE	: İleri Glikasyon son Ürün Reseptörleri
JAK/STAT	: Janus Protein Kinaz/ sinyal iletilci ve transkripsiyon aktive ediciler yolu
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
FBS	: Fetal Bovine Serum
KBB	: Kan-Beyin Bariyeri
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
DMSO	: Dimetilsülfoksit
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
PBS	: Fosfat Tamponlu Solüsyon (Phosphate Buffered Saline)
M	: Molarite
nm	: Nanometre
mL	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromol

1. GİRİŞ

1.1. Polifenoller ve flavonoidler

Polifenoller bitkilerin ikincil metabolitleridir. Bitkiler; hastalıklara, aşırı radyasyona ve sıcaklık/kuraklık gibi stres faktörlerine karşı korunmak için polifenollerini üretirler (Davinelli ve ark., 2012). Polifenoller, aromatik/fenolik halkasal kimyasal yapılara sahip olup flavonoid ve flavonoid olmayan iki alt gruba ayrılan bileşiklerdir. Flavonoidler, 15 karbon atomuna sahip polifenolik bileşiklerdir ve iki benzen halkasının oksijen içeren bir piren halkası (C) ile bağlanması sonucu oluşmaktadır (Farhadi ve ark., 2019).

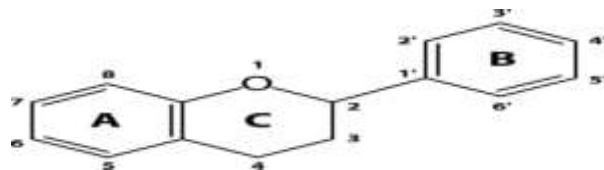
Flavonoidler; flavonlar, flavonoller, flavanonlar, izoflavanonlar, kateşinler ve antosiyanidinler dâhil olmak üzere çeşitli alt sınıflara ayrılırlar. Quercetin, flavanon familyasına aittir (Şekil 1) ve dünyada beş binden fazla flavonoid yapısında bileşik mevcuttur (Manach ve ark., 2004). Bitkilerdeki pigmentler (kırmızı, mavi ve sarı) flavonoidlerden oluşurlar. Portakal, limon gibi meyveler ile soğan, patates ve karnabahar gibi sebzelerin yanı sıra tohum, tahıl, baharat, kahve ve çay gibi bitkisel kaynaklı içeceklerde de flavonoidler bulunur (Yang ve ark., 2001). Polifenoller ve flavonoidler ilaç ve beslenme alanlarında uygulandıkları için rağbet görmüşlerdir. Ayrıca anti-inflamatur, anti-alerjik, anti-diyabetik, anti-hepatotoksik, anti-kanser ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkileri de bilinmektedir (Peng ve ark., 2003). Flavonoidler yıllar önce araştırılmaya başlanmasına rağmen son yıllarda biyolojik ve sanayide de kullanıldığı için çok önem kazanmıştır. Flavonoidler üzerinde birçok çalışma yapılmış ve doğal ve sağlıklı olduğu kabul edilmiştir (Stavric ve ark., 1994).

Polifenoller						
Flavonoid						Flavonoid olmayan
Flavonlar	Flavanonlar	İsoflavanonlar	Kateşinler	Flavonoller	Antosiyanidinler	
Hesperetin	Apigenin	Daizein	Catechin	Quercetin	Malvidin	Fenolik asit- hidroksibenzoik asit ve hidroksisinnamik asit
Naringenin	Luteolin	Genistein	Epicatechin	Kaempferol	Peonidin	
				Myricetin	Delphinidin	
					Cyanidin	
						Lignanlar
						Stilbenler - resvetatrol, piceatann

Şekil 1.1. Polifenollerin sınıflandırılması (Chen, Tzu-Ying, 2013)

1.1.1. Flavonoidler'in kimyası

Flavonoidler, kimyasal olarak üç halkalı yapıdadır ve bu yapı bir hatrosiklik piren halkası (C) vasıtasıyla bağlanmış iki benzen halkasından oluşur (Şekil 1.2) (Panche ve ark., 2016). Flavonoidlerin hidroksil gruplarının pozisyonu ve sayılarına dayanarak metabolik mekanizması belirlenir ve buna göre 6 gruba ayrılırlar.



Şekil 1.2. Temel flavonoid yapısı (Kumar ve Pandey, 2013)

Bunlar flavonlar (hesperetin, haringenin), flavanonlar (apigenin, luteolin), isoflavanonlar (daizein, genistein), kateşinler (catechin, epicatechin), flavonoller (quercetin, kaempferol ve myricetin) ve antosiyanidinlerdir (malvidin, peonidin, delcicinindin ve camidin) (Tangney ve ark., 2013). Doğal flavonoidlerde bulunan hidroksil grubunun en fazla yediye kadar olduğu bilinmektedir. Flavonoidlerin yapısına katılan hidroksil grupları, reaktif özelliklerinden dolayı alkillenir veya glikozillenirler. Dolayısıyla flavonoidlerin aglikonlar, glikozitler ve metillenmiş türevlerine bitkilerde sık rastlanır. Benzen halkası ile kondanse edilmiş altı üyeli halka ya piron (flavonoller ve flavanonlar) ya da dihiroderivatif (flavonoller ve flavanonlar) 'tir (Gibellini ve ark., 2011).

Flavonoidler genellikle 3, 5, 7, 2, 3', 4' ve 5' pozisyonlarında hidroksillenir. Alkol grubunun metil eterleri ve asetil esterlerinin doğada bulunduğu bilinmektedir. Glikozitler oluştuğunda, glikozidik bağ normalde 3 veya 7 pozisyonlarında bulunur ve karbonhidrat L-ramnoz (bitki karbonhidratı), D-glukoz, glukoramnoz, galaktoz veya arabinoz olabilir. (Novza ve Popova, 2016).

1.1.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, ortaklanmamış elektron taşıyan ve biyolojik materyallere girme eğilimi olan atomlar, moleküller veya iyonlardır. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral yüke sahip olabilirler. Bu durum biyolojik sistemlerde normal şartlar altında sürekli oluşmaktadır (Seifried ve ark 2007). Bu ortaklanmamış elektronlar oldukça reaktif olup çevrelerindeki atom ve moleküllere saldırırlar. Radikal, çiftlenmemiş elektronunu başka bir moleküle verebilir veya başka bir molekülden elektron koparabilir. Bu şekilde başka moleküllerle kolaylıkla elektron alışverişi yapan ve onların yapısını bozan radikal moleküller haline gelir. Bu moleküllere “serbest radikaller”, “oksidan moleküller” ya da “reaktif oksijen türleri (ROS: reactive oxygen species)” adı verilmektedir. Bu serbest radikallere özgü bir reaksiyondur ve bir radikal başka bir radikale sebep olur (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Doku hasarına yol açan ROS'un aşırı üretimi de oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır (Aydemir ve sarı 2009). Oluşan serbest radikaller, oksidatif reaksiyonlar sonucunda protein, lipit, karbonhidrat ve DNA gibi vücuttaki önemli moleküllere etki ederek yapılarının bozulmasına ve pek çok biyolojik soruna neden olmaktadır (Tamer ve ark). Serbest radikaller; bazı kanser türleri, diyabet, yaşlanma, miyokardiyal enfarktüs gibi birçok hastalıkta gösterilmiştir (Delibaş ve Özcanakaya, 1995; Gümüştaş ve Atukeren, 2008).

Serbest radikaller, normal yaşam fonksiyonları için önemlidir. Hem hayvanlarda hem de insanlarda fizyolojik ve patolojik koşullar altında üretilir. Fakat bunların yan etkilerini en aza indirmek ve vücutta yaptığı hasarları onarmak için süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon-peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi bir dizi enzimsel mekanizma söz konusudur. Antioksidanlar, bu savunma mekanizmalarında ana rol oynamaktadır (Yamada ve ark., 2010).

1.1.2.1. Serbest Radikal Türleri

Serbest radikaller arasında süperoksit ($O_2^{\bullet -}$), hidroksil ($\bullet OH$), peroksit ($ROO^{\bullet}$), lipid peroksil ($LOO^{\bullet}$) ve Alkoksil ($RO^{\bullet}$) gibi radikaller bulunur. Serbest reaktif nitrojen türleri ise nitrik oksit ($NO^{\bullet}$) ve nitrojen dioksit ($NO_2^{\bullet}$) içerir. Reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türleri radikal olmayan (non-radikal) diğer reaktif türlere kolayca dönüşebilir (Halliwell ve Gutteridge, 1999; Valko ve ark., 2007).

Genellikle oksidanlar olarak adlandırılan hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3), singlet oksijen ($^1O_2$), hipokloröz asit ($HOCl$), nitrik asit (HNO_2), peroksinitrit ($ONOO^-$), dinitrojen trioksit (N_2O_3) ve lipid peroksit ($LOOH$) serbest olmayan radikaller arasında sayılmakta ve canlı organizmada kolaylıkla serbest radikal reaksiyonlarına yol açabilmektedirler (Valko et ark., 2007; Sen ve Chakraborty, 2011; Nunes ve ark., 2012).

Çizelge 1.1. Reaktif oksijen türleri (ROS) (Karabulut ve Gülay, 2016)

Radikaller		Radikal olmayan	
Süperoksit	$O_2^{\bullet -}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil	$OH^{\bullet}$	Hipokloröz asit	$HOCl$
Peroksil	$ROO^{\bullet}$	Hipobromöz asit	$HOBr$
Alkoksil	$RO^{\bullet}$	Singlet oksijen	$^1O_2$
Hidroperoksil	$HO_2^{\bullet}$	Ozon	O_3
Lipid peroksil	LOO		

Çizelge 1.2. Reaktif nitrojen türleri (RNS) (Karabulut ve Gülay, 2016)

Radikaller		Radikal olmayan	
Nitrik oksit	NO	Nitrik asit	HNO ₂
Nitrojen dioksit	NO ₂	Nitrosil katyonu	NO ⁺
		Nitroksil anyonu	NO ⁻
		Dinitrojen tetroksid	N ₂ O ₄
		Dinitrojen trioksit	N ₂ O ₃
		Peroksinitrit	ONOO
		Peroksinitrik asit	ONOOH
		Nitronyum katyonu	NO ₂ ⁺
		Nitril klorid	NO ₂ Cl
		Alkil peroksinitrit	ROONO

1.1.2.2. Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikaller hem endojen hem de ekzojen kaynaklardan üretilir. Vücuttaki üretimleri sürekli ve insan fizyolojisinin normal bir parçasıdır.

1.1.2.2.1. Ekzojen Serbest Radikal Kaynağı

Kirlilik: Hava kirleticileri (asbest, benzen, karbon monoksit, klor, formaldehit, ozon ve toluen), kimyasal çözücüler (temizlik ürünleri, tutkal, boyalar, tiner, parfümler ve böcek ilaçları) ve su kirleticileri (kloroform ve trihalometanlar) gibi farklı kirleticiler türlerinin tamamı serbest radikallerin güçlü üreticileridir. Pişirme sırasında organik maddelerin yakılması, orman yangınları ve volkanik faaliyetler sırasında da serbest radikaller üretilir (Sen ve Chakraborty, 2011; Takashima ve ark, 2012; Bouaziz, 2018; Neha ve ark, 2019).

Işıklar: UV ışınları, tıbbi ve diş röntgenleri, gama ışınları ve mikrodalga ışınları serbest radikal oluşumuna yol açabilir (Kumar, 2014).

Besin kaynaklı faktörler: Katkı maddeleri, alkol, ızgara yiyecekler, yanmış gıdalar, hidrojene bitkisel yağlar, işlenmiş gıdalar yüksek seviyelerde lipid peroksit içeren serbest radikaller üretebilir (Birben ve ark., 2012).

Toksinler ve ilaçlar: Karbon tetraklorür, parakuat, benzopiren, anilin boyaları, toluen ve adriamisin, bleomisin, mitomisin C, nitrofurantoin ve klorpromazin gibi ilaçlar serbest radikal üretimini artırır (Ye ve ark., 2015).

Çeşitli nörodejeneratif bozukluklarda önemli bir faktör olan oksidatif stres, hücrelerde ROS birikimine neden olan, yaşa bağlı dejeneratif süreçlerin en yaygın mekanizmasıdır. Mitokondri, ROS üretimi için birincil bölgedir ve mitokondriyal disfonksiyon ROS'un aşırı üretimine ve ardından ATP tüketimine ve sonuçta hücre ölümüne yol açar (Costa ve ark., 2016; Kennedy ve ark., 2016).

1.1.4. Serbest ROS ve RNS'lerin biyolojik özellikleri

ROS ve RNS'lerin yararlı etkileri düşük/orta konsantrasyonlarda ortaya çıkar ve hücresel yanıtı karşı birkaç normal fizyolojik fonksiyonda yer alır. Çoğu hücre süperoksit, hidrojen peroksit ve nitrik oksit üretebilirken, diğerleri uyarılabilir ROS/RNS salınım sistemine sahiptir. Fagositoz, kanser hücrelerinin makrofajlar ve sitotoksik lenfositler tarafından öldürülmesi, sitokromiklerin sitokrom P450 ile detoksifikasyonu, mitokondride ATP üretimi (enerji üretimi), hücre büyümesi

1.1.4.1. Oksidatif stresin lipitler üzerine etkileri

Lipit peroksidasyonu, hücre zarlarına; akışkanlığı ve geçirgenliği bozarak zarar verebilir. Lipitlerin peroksidasyonu bazı türlerin saldırısıyla başlatılır ve bir metilen grubundan (CH₂) hidrojen (H) atomu çıkarılabilir, bu da karbon atomu (CH) üzerinde eşlenmemiş bir elektron ile sonuçlanır. Bu şekilde oluşturulan karbon radikali, daha sonra bir lipit peroksil radikali (LOO•) oluşturmak için bir oksijen molekülü ile reaksiyona girebilen bir konjüge dien üretmek için moleküler yeniden düzenleme ile stabilize edilir. Böylece, lipit hidroperoksitler (LOOH) şekillenir ve aynı zamanda daha fazla lipit peroksitleri üretilir (Birben ve ark., 2012; Kalyanaraman, 2013; Lavie, 2015; Katerji ve ark., 2019).

1.1.4.2. Oksidatif stresin DNA üzerindeki etkileri

Reaktif oksijen (ROS) ve reaktif nitrojen (RNS) türleri DNA ile etkileşime girerek oksidatif hasara yol açar. DNA, OH gibi serbest radikallerin verdiği hasara karşı oldukça hassastır. OH serbest radikalleri DNA ile reaksiyona girerek şeker moleküllerinden hidrojen atomlarının eklenmesi veya kaybına yol açar. Özellikle, pirimidinin C4-C5 çift bağı OH radikali saldırısına karşı çok hassastır. Bu atakların bir sonucu olarak timin glikol, urasil glikol, üre kalıntısı, 5-hidroksi ideoksüridin, 5-hidroksideoksisitidin ve hidantoin gibi oksidatif pirimidin hasar ürünleri oluşur (Sen ve Chakraborty, 2011; Birben ve ark., 2012).

Serbest radikal saldırıları poli sentez enziminin (ADP-riboz) aktivasyonuna neden olur. Bu enzimin aktivasyonu programlanmış hücre ölümüne (apoptosis) ve DNA'nın parçalanmasına yol açar. Bu işlem, elektron taşıma zinciri fonksiyonunu bozarak NAD⁺'in hücresel seviyesini azaltır (Sen ve Chakraborty, 2011; Birben ve ark., 2012; Lavie, 2014).

1.1.4.3. Oksidatif stresin proteinler üzerindeki etkileri

ROS, peptit zincirinin parçalanmasına, proteinlerin elektrik yükünün değişmesine, proteinlerin çapraz bağ yapmasına ve spesifik amino asitlerin oksidasyonuna neden olabilir ve spesifik proteazlara karşı proteoliz duyarlılığını artırabilir. Ayrıca, aktif bölgelerinde veya yakınında metal bulunan enzimler, özellikle metal katalizli oksidasyona duyarlıdır (Baradaran ve ark., 2014; Lavie, 2014).

Proteinlerde sistein ve metiyonin amino asitleri oksidasyona daha fazla duyarlıdır. Sülfhidril grupları, disülfür bağları oluşturmak üzere oksitlenebilir ve karbonil grupları proteinlerin yan zincirlerine eklenebilir (Gutiérrez ve ark., 2014; Lavie, 2014).

1.1.5. Antioksidanlar

Antioksidanlar, düşük konsantrasyonda oksidatif süreci önemli ölçüde engelleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanır (Valco ve ark.,2007). Endojen ve ekzojen antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize ederek ve redoks dengesini koruyarak vücudu serbest radikallerden korumak için kullanılır (Pham-Huy ve ark., 2008). Antioksidanlar ve ROS arasındaki dengesizlik oksidatif strese neden olur ve bu da hücresel hasara yol açar. Antioksidanların oksidatif reaksiyonlara etkisi farklı şekillerde olabilmektedir (Gutteridge, 1995). Bu etkiler şu şekildedir:

- Metal iyonları ile bağlanarak radikal oluşumunu önleyebilir
 - Daha zayıf yeni bir moleküle dönüşebilir (süpürme faaliyeti)
 - Yakalayıp ve bağlayarak radikalleri nötralize edilebilir (zincir kırma reaksiyonları)
 - Hidrojeni oksidanlara aktararak etkisiz hale getirebilir (söndürme etkisi)
 - Gerçek antioksidanların (sinerjistler) aktivitesini artırabilir.
 - İnsan vücudu oksidanları dengelemeye yardımcı olan çeşitli iç antioksidanlarla donatılmıştır. Vücuttaki etki mekanizmalarına göre antioksidan mekanizmaları gruplara ayrılır. Sınıflandırma şu şekildedir (Mazen, 2016);
- **Önleme:** Reaktif türlerin üretimi en aza indirilir. Örneğin, desferrioksamin.

- **Durdurma:** Katalitik ve katalitik olmayan molekülleri kullanarak reaktif türlerini süpürürler, kendi elektronlarını ROS'a aktararak, ROS' un yan etkilerini nötralize ederler. Örneğin, askorbik asit ve alfa-tokoferol.
- **Onarım:** Hasarlı hedef molekülleri onarırlar. Örneğin, glutatyon

Antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki kategoriye ayrılabilir

1.1.5.1. Enzimatik antioksidanlar

Akciğerlerin başlıca enzimatik antioksidanları SOD, katalaz ve GSH-Px'tir. Bu ana enzimlere ek olarak, hem oksijenaz-1 dahil olmak üzere diğer antioksidanlar ve tioredoksinler (TRXs), peroksiredoksinler (PRXs) ve glutaredoksinler gibi redoks proteinlerinin de ayrıca pulmoner antioksidan savunmasında önemli roller oynadığı gösterilmiştir. (Birben ve ark., 2012; Ye ve ark., 2014).

Süperoksit dismutaz (SOD)

SOD, önemli bir endojen antioksidan enzimdir ve farklı hücresel bölümlerde bulunan üç metal içeren izoformda bulunabilir: SOD1 (bakır-çinko Süperoksit Dismutaz) sitoplazma, çekirdek ve plazma zarında bulunur; SOD2 (manganez SOD) esas olarak mitokondride ve SOD3 (bakır-çinko SOD), hücre dışı kompartmandaki süperoksitin atılması ve iltihaplanma sırasında üretilen caydırıcı süperoksitlerde benzersizdir (Athiroh ve ark., 2014; Ye ve ark., 2014). SOD, ROS'a karşı ilk hat savunma sistemi olarak hareket eder ve süperoksit dismutaz ile katalizlenen tepkimenin ürünü olan H_2O_2 ise CAT ile H_2O 'ya indirgenir (Sen ve Chakraborty, 2011).

Katalaz (CAT)

Katalaz (CAT) enzimi esas olarak peroksizomlarda bulunur. Memeli hücrelerinin mitokondrilerinde yoktur. Bunun tek istisnası sıçan kalp hücrelerindeki mitokondridir. Mitokondride oksijenin suya indirgenmesi için toplam oksijen tüketiminin %1-2'si süperoksit ve hidrojen peroksit gibi sitotoksik türlerin oluşumuna yol açar. Artan süperoksit radikalleri mitokondriye zarar verir. Bu durumlarda antioksidan savunma sistemleri devreye girer. Mitokondride oluşan süperoksit radikalleri ilk önce Mn-SOD (SOD 2) ve glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından yok edilir. Her bir katalaz (CAT) molekülü, SOD tarafından üretilen milyonlarca hidrojen peroksit molekülünü her saniyede suya ve oksijene ayrıştırabilir (Aslankoça ve ark., 2019; Sen ve Chakraborty, 2011).

Glutasyon peroksidaz (GPx)

Genellikle hücrelerin sitoplazmasında bulunur ve hücreyi H_2O_2 'nin neden olduğu oksidatif hasara karşı koruyarak H_2O_2 'den hidroksil radikalının oluşumunu önler. Glutasyon peroksidaz, GSH oksidasyonu ile H_2O_2 'yi metabolize ederek zararsız hale getirir (Navarro-Yepes ve ark., 2014). İnsanda en az sekiz GPx enzimi vardır, GPx1 – GPx8. GPx1, çoğu memeli hücresinde sitosol ve mitokondride bulunur ve birçok fizyolojik koşulda hücre içi peroksitlerin metabolize edilmesinde katalazdan daha etkilidir. GPx 5, 7 ve 8 sistein içeren GPx'lerdir, GPx 6 ise insanlarda selenosistein aktif bir bölgeye sahiptir. Sistein içeren GPxler peroksitlerin detoksifiye edilmesinde selenyum bağımlı GPx'lerden çok daha az verimlidir (Ye ve ark., 2014).

Glutasyon redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz, GSH'in dönüştürülmesi için gerekli olan flavoprotein enzimi ve önemli bir hücresel antioksidandır. Glutasyon redüktaz NADPH bağımlı bir flavoproteindir. GR'nin aktif bölgesinde sistein rezidülerinin varlığı, NADPH'ye bağlı GSSG'nin GSH'ye indirgenmesini katalize ederek reaktif oksijen metabolitlerine karşı hücre savunmasında önemli bir rol oynar (Gill ve ark., 2013). GSH/GSSG oranı, bir organizmada oksidatif stresin önemli bir ölçüsüdür, çok yüksek GSSG konsantrasyonu birçok enzime oksidatif olarak zarar verebilir (Navarro-Yepes ve ark., 2014).

1.1.5.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar, askorbik asit (C Vitamini), a-tokoferol (E Vitamini), glutasyon (GSH), karotenoidler, flavonoidler ve diğer antioksidanlar ile temsil edilir.

Glutasyon (GSH)

Glutasyon, hücrelerin serbest radikaller, reaktif oksijen türleri (ROS) ve hidrojen peroksit gibi oksidatif etkilere karşı korunmasında önemli bir rol oynar (Hatori ve ark 2020). GSH, bir tripeptittir (L-g-glutamil-L-sisteinil-Lglisin) ve tüm hücre bölümlerinde bol miktarda bulunan çözünebilir bir antioksidandır. GSH antioksidan etkilerini çeşitli şekillerde gösterir. GSH-Px ve GSH transferaz gibi çeşitli detoksifiye edici enzimler için bir kofaktördür ve C ve E vitaminlerini aktif formlarına geri döndürmede rol oynar. GSH, proapoptotik ve antiapoptotik sinyal yollarıyla etkileşerek hücreleri apoptoza karşı korur. GSH, AP-1, NF-kB ve Sp-1 gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerini düzenler ve aktive eder (Sousa ve ark., 2012; Birben ve ark., 2012).

E Vitamini (α -Tokoferol)

Hücre zarının hidrofobik iç bölgesinde yoğunlaşan, lipitte çözünebilen, membranı oksidatif hasara karşı koruyan bir vitamindir. E vitamini, lipit peroksidasyonu sırasında üretilen peroksil radikaline elektron verir. E vitamini, kanser hücrelerinin apoptozunu tetikler ve O₂- ve HO 'yu daha az reaktif formlara dönüştürerek serbest radikal oluşumlarını inhibe eder (Birben ve ark., 2012; Altınar ve Atalay 2017).

Askorbik Asit (Vitamin C)

C vitamini, serbest radikal ve reaktif oksijen türlerini temizleme etkisi, redoks potansiyeli, lipitler ve diğer makro moleküllerde oksidatif hasarın önlenmesini sağlayan doğal, güçlü bir antioksidandır. Genel bir antioksidan olmasının yanı sıra, son gelişmeler TET (Ten-eleven translocation) enzimleri için bir kofaktör olarak işlev görüp DNA demetilasyonuna yol açarak askorbatın gen aktivitesinin epigenetik regülasyonundaki rolü tanımlamıştır (Macan ve ark., 2019; Birben ve ark., 2012).

β -Karoten (Vitamin A)

Bitkilerde bulunan pigmentlerdir. Öncelikle, β -karotenin peroksil (ROO), hidroksil (OH) ve süperoksit (O₂⁻) radikalleri ile reaksiyona girebilir. Karotenoidler düşük oksijen kısmi basıncında antioksidan etkilerini gösterir, ancak daha yüksek oksijen konsantrasyonlarında pro-oksidan koşullar olabilir. β -Karoten, NF-kB ve interleukin (IL) -6 aktivasyonunu inhibe eder. Ayrıca hücrelerin apoptozunu da etkiler (Tanumihardjo, 2012).

Ürik Asit

Ürik asit, hidroksil, singlet oksijen, süperoksit, peroksinitrit anyonu, peroksinitrik asiti etkisizleştirir ve geçiş metallerini bağlar. Lipit peroksidasyonu engelleyerek koruyucu olarak görev yapabilir. Ürik asit, güçlü bir serbest radikal süpürücü olmasının yanı sıra Fe ve Cu gibi metal iyonlarının bağlayıcısı olarak da hareket eder (Sousa ve ark., 2012). ONOO ürik asit tarafından atılır, C vitamini görevi görür (Sousa ve ark., 2012).

Bilirubin

Hem katabolizmanın son ürünüdür hem de zincir kırıcı bir antioksidan olarak işlev görmektedir. Plazma albümini, baskın plazma proteini, aynı zamanda sülfhidril grupları nedeniyle bir antioksidandır ve myeloperoksidaz (MPO) türevi klorlanmış reaktif türleri ve ROO'ları temizleyebilir (Sousa ve ark., 2012).

1.1.5.3. Antioksidan özelliklere sahip flavonoidler

Flavonoidler C6–C3–C6 heterosiklik piren halkası ve fenil grupları arasındaki üçlü karbon köprüsü oksijenle halka oluşturmaktadır. Flavonoidler, yapısal olarak altı grupta sınıflandırılır (Fusi ve ark, 2020).

- Antosiyanidinler (Malvidin, Cyanidin)
- Flavonoller (Quercetin, Kaempferol)
- Flavonlar (Hesperetin, Naringenin)
- Flavanonlar (Apigenin, Luteolin)
- Kateşinler (Flavanoller) (Catechin, Epicatechin)
- Izoflavonoidler (Daizein, Genistein)

Flavonoidler antioksidan seçim gösterme adına serbest radikallerle etkileşime girerek onları nötralize ederler. Flavonoidler, LOOH zincirini kırarlar, O_2^- , OH radikallerini söndümlendirebilir, demir ve bakır gibi geçiş metallerini şelatlayabilirler (Ergin, 2015).

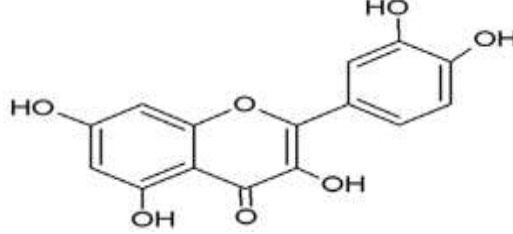
Flavonoidlerin antioksidan etkileri aromatik OH^- gruplarına bağlıdır ve serbest radikal süpürücü aktiviteler için etkilidir. Flavonoidler için reaktif yapısal gruplar: (1) pirogallol grubu; (2) katekol grubu; (3) 2,3-çift 4-okso ve 3-hidroksil grubu; (4) ek rezonans etkili gruplardır (Yang ve ark 2001). Hidrojen veren radikal toplayıcılar olarak hidrojenin varlığı, kimyasal özelliklere, antioksidan aktiviteye sahip olduklarını gösterir. Bir antioksidan olarak tanımlanabilmek için bir polifenolün iki temel koşulu karşılaması gerekmektedir (Janeiro and Brett, 2004). Bu koşullar aşağıdaki gibidir:

- İlk olarak, oksitlenecek substrata göre düşük konsantrasyonda mevcut olduğunda, oksidanlığı veya serbest radikal aracılı oksidasyonu geciktirir veya önler.
- İkincisi, süpürme işleminden sonra oluşan radikal, moleküller arası hidrojen bağı ile kararlı olmalıdır (Rice-Evans ve ark 1996).

1.2. Quercetin

Quercetin, flavonoidlerin flavanol alt grubunun bir üyesidir (Kolaç ve ark 2017). Quercetin, Quercetum (Meşe Ormanı) Latince kelimesinden gelen ve ilk defa bu bitki reçinesinden elde edilen bir flavonoiddir. Soğan başta olmak üzere brokoli, kiraz, çilek, elma, üzüm, domates gibi meyve ve sebzelerde; tohum, fındık, çay ve kırmızı şarapta yoğun olarak bulunmaktadır (Moskaug ve ark., 2004). Quercetin oda sıcaklığında katı halde bulunan sarı renkli bir bileşiktir. Formülü: $C_{15}H_{10}O_7$, molekül ağırlığı: 302,24 g/mol, saflığı:

$\geq$ %95, erime noktası: 314 °C 'dir. Quercetin'in etil alkol, Dimetilsülfoksit (DMSO), Dimetilformamid (DMF) gibi organik çözücülerde iyi çözüldüğü bilinmektedir (Andres ve ark., 2018). Quercetin (3,3',4',5,7-pentahidroksifavanon veya 3,3',4',5,7-pentahidroksi-2-fenilkromen-4-on) yapısında 3 halka ve 5 hidroksil grubu bulunmakta olup (Şekil 1.4) özgün yapısı OH gruplarının sayısı ve konumlarından kaynaklanmaktadır (Suganthi ve ark., 2015)



Şekil 1.4. Quercetin kimyasal yapısı

Yapılan çalışmalarda polifenolik bir bileşik olan quercetin; anti-viral, anti-ülser, anti- diyabetik, antiproliferatif, antioksidan, anti-kanser ve anti-inflamatuar etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu sebeple metabolik ve enflamatuar hastalıkların tedavisinde sıkça başvurulmuş bir biyoflavonoiddir (Hashemzaei ve ark., 2017). Quercetin, bilişsel bozulma iskemisi, travmatik yaralanma, Parkinson hastalığı (PD) ve Huntington hastalığı (HD) gibi nörodejeneratif bozukluklara etkisi üzerine hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalar mevcuttur (Rishitha ve ark., 2018; Li ve ark., 2016; El-Horany ve ark., 2016; Sandhir ve Mehrotra 2013).

1.2.1. Quercetin'in Farmakolojik Etkileri

1.2.1.1. Antioksidan Etkileri

Quercetin'in güçlü ve etkili bir antioksidan olduğu araştırmalarda gösterilmiştir. Süperoksit anyon serbest radikallerinin konsantrasyonlarını azaltmaktadır. Antioksidan potansiyelinin, Alzheimer hastalığı dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara karşı iyi bir seçim olduğu bildirilmiştir (Alok ve ark., 2014). Önceki çalışmalarda quercetin'in doğrudan radikal süpürücü etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Yapısında iki farmakoforun bulunması antioksidan aktivitelerinden sorumludur: Biri B halkasında bir katekol grubu, diğeri C-3 konumundaki OH grubudur. Ayrıca, quercetin bir antioksidan enzim olan Nükleer faktör (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf-2 ARE) ve paraoksonaz 2'yi (PON2) indükleyerek hücreyi modüle eder. (Nrf-2 ARE, oksidatif strese karşı hücrel savunmaların önemli bir düzenleyicisidir. Nrf2-ARE yolağının kontrolü altındaki proteinler arasında hem oksijenaz-

1, glutamat sistein ligaz, glutatyon S-transferaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz, sülfiredoksin ve tioredoksin bulunur. Nrf2-ARE yolunun aktivasyonu, oksidatif hasara ve hücre ölümüne karşı nöroprotektif etki sağlar. Ayrıca, Nrf2-ARE yolunun, çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda (Parkinson, Alzheimer ve Huntington hastalıkları ve amiyotrofik lateral skleroz) bulunan yanlış katlanmış protein agregatların oluşumunu ve bozulmasını modüle edebilmektedir (Gan ve ark., 2014; Costa ve ark., 2014; Khan ve ark., 2020). Ayrıca, Nrf2-ARE yolağının Parkinson, Alzheimer, Huntington ve amiyotrofik lateral skleroz gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda yanlış katlanmış protein agregatların oluşumunu ve bozulmasını modüle edebilmektedir (Gan ve ark., 2014; Costa ve ark., 2014; Khan ve ark., 2020). Quercetin sigara gibi serbest radikallerin çevresel nedenlerine karşı da koruma sağlayabilir. Sigara katranı, eritrosit zarlarına zarar verdiği tespit edilen bir serbest radikal kaynağıdır. Quercetin ve konjugat metabolitlerinin eritrositleri sigara içmenin neden olduğu membranöz hasardan koruyabildiği de gösterilmiştir (David ve ark., 2016).

1.2.1.2. Nöroprotektif Etkileri

Quercetin'in nöroprotektif etkileri kapsamlı olarak araştırılmıştır. Düşük mikromolar konsantrasyonlarda nöronlardaki oksidatif stresi ve hücre toksisitesini antagonize eder. Quercetin, NF-kB ve iNOS gibi pro-enflamatuvar sitokinleri aşağı yönde düzenleyerek (down-regülasyon) nöroinflamatuvar aktiviteleri bastırır. Quercetin emiliminden sonra glukuronitler, sülfatlar ve metillenmiş türevler gibi konjuge quercetin metabolitlerinin nöroprotektif etki sağladığı gösterilmiştir (Caruana ve ark., 2016; Jantan ve ark., 2015; Khan ve ark., 2020). Quercetin'in nöroprotektif etkinliği hem *in vitro* hem de *in vivo* modellerde araştırılmıştır. İnsan ekson-1 Huntingtin (128Q) nöronal ekspresyonu ile *C. elegans* nematodlarında ilaç taraması kullanılarak yapılan bir çalışmada, 3 β -Methoxy-Pregnenolone (MAP4343), 17 β -oestradiol (17 β E2) ve isoquercetin dahil 12 flavonoidin 128Q nematodlarda nöronal fonksiyonu ve ayrıca MAP4343, 17 β E2 ve isoquercetin knock-in HD farelerinden türetilen mutant Htt striatal hücrelerde stres direncini desteklediği gösterilmiştir (Farina ve ark 2017).

Quercetin'in, Alzheimer hastalığında terapötik etkinlik, öğrenme, bellek ve bilişsel işlevleri geliştirdiği gösterilmiştir (David ve ark., 2016). Bir başka çalışmada quercetin uygulamasının *in vitro* modeller kullanarak AChE ve sekretaz enzimlerinin inhibisyonunu sağladığı, böylece asetilkolinin bozulmasını önlediği ve A β üretimini azalttığı sonucuna varılmıştır (Khan ve ark., 2009; Shimmyo ve ark., 2008). Sabogal-Guáqueta ve arkadaşları Hipokampus ve Amigdala'da quercetin uygulamasının eksrtraselüler β - amyloidosisi tersine

çevirdiğini ve taupatiler, astrogliosis ve mikrogliozisi azalttığını, böylece triple-transgenic Alzheimer fare modelinde bilişsel ve duygusal fonksiyonu koruduğunu bildirmişlerdir (Sabogal-Guáqueta ve ark., 2015).

Alzheimer fare modelinde uzun süreli quercetin uygulanmasının biliş ve mitokondriyal disfonksiyon üzerine etkileri araştırılmış, quercetin mitokondriyal membran potansiyelini düzenleyerek mitokondriyal disfonksiyonu iyileştirdiği, ROS üretimini azalttığı ve ATP sentezini sağladığı belirtilmiştir. Araştırmacılar ayrıca, enerji metabolizmasının önemli bir hücre düzenleyicisi olan AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) ekspresyonunu arttırdığını gözlemlemişlerdir (Wang ve ark., 2014).

Quercetin, zebra balığında skopolaminle uyarılmış hafıza bozukluğunda hafıza arttırıcılar olarak işlev gördüğü ve bu nedenle muhtemelen kolinerjik nörotransmisyonu arttırdığı bildirilmiştir (Richetti ve ark., 2011). Yapılan bir çalışmada, quercetin glikozitlerin (rutin, izoquercetin), PC12 hücrelerinde 6-hidroksidopaminin neden olduğu gen ekspresyonundaki değişiklikleri antagonize edebildiği gösterilmiştir (Magalingam ve ark., 2015). İzole sıçan beyin mitokondrisinde, bir antikanser ilacı olan oksaliplatinin toksisitesi, önemli ölçüde quercetin tarafından oksidatif stres azaltarak antagonize edildiği gösterilmiştir (Waseem ve Parvez, 2016). Quercetin, düşük dozlarda oksidatif stresi modüle ederek A β (1-42) toksisitesine karşı koruyucu etkiler göstermiştir (Ansari ve ark., 2009). Absorbe edilen quercetin çoğu *in vitro* olarak sadece sınırlı testlere tabi tutulmuş metabolitler olarak bulunur. Bununla birlikte, bir dizi glukuronide, metile ve sülfatlanmış quercetin metabolitlerinin *in vitro* nöroprotektif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Shirai ve ark., 2006; Ruotolo ve ark., 2014). Birçok çalışma, quercetin *in vivo* uygulandığında nöroprotektif etkili olduğunu ve oksidatif stresi antagonize edebildiğini göstermektedir. Oral quercetin (0.5-50 mg/kg), kemirgenleri oksidatif stres ve nörotoksisiteden koruduğu gösterilmiştir (Ishisaka ve ark., 2011; Das ve ark., 2008). Quercetin kurşun, metilmercury ve tungsten gibi metallerin nörotoksisitesine karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (Hu ve ark., 2008; Barcelos ve ark., 2011; Sachdeva ve ark., 2015). Poli Klorlu Bifenillerin, insektisit endosülfanın ve MPTP'nin (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinin) nörotoksisitesinin, *in vivo* olarak quercetin tarafından azaltıldığı gösterilmiştir (Bavithra ve ark., 2012; Lv ve ark., 2012; Lakroun ve ark., 2015).

1.2.1.3. Anti-enflamatuar Etkileri

Quercetin'in en dikkat çekici özelliklerinden biri, inflamasyonu modüle etme yeteneğidir. Quercetin, siklooksijenaz (COX) ve lipoksijenaz gibi inflamatuvar enzimleri inhibe ederek tıpkı prostaglandinler ve lökotrienler gibi inflamatuvar etkileri azaltır (Xiao ve ark., 2011; Warren ve ark., 2009). *In vitro* çalışmalarda, quercetin'in insan karaciğer türevi (human hepatocyte-derived) hücre hattında NO sentez, COX-2 ve C-reaktif protein (CRP) gibi inflamatuvar araçların seviyelerinde önemli bir azalma sağladığını rapor etmişlerdir (Arcía-Mediavilla ve ark., 2007). Sıçanlarda, 80 mg dozdaki quercetin'in hem akut hem de kronik inflamasyonu inhibe ettiği ve adjuvan kaynaklı artritte önemli antiartritlik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Guardia ve ark., 2001). Düzenli egzersiz yapan sağlıklı erkek profesyonel olmayan sporcularda 2 aylık quercetin (500 mg) takviyesinin etkisi incelenmiş ve CRP düzeylerinde önemli bir düşüş olduğu görülmüştür (Askari ve ark., 2012). Quercetin tüketiminden sonra sistemik dolaşımında bulunan quercetin türevlerinin güçlü antioksidan ve anti-inflamatuar ajanlar olarak işlev görebileceği ve quercetin bakımından zengin diyetin genel biyolojik aktiviteye katkıda bulunabileceği bildirilmektedir (Lesjak ve ark., 2018).

1.2.1.4. Antikanser Etkileri

Epidemiyolojik araştırmalar, daha fazla sebze ve meyveyle diyetin kansere karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir. Quercetin, antiproliferatif, büyüme faktörü supresyonu ve antioksidan içeren potansiyel antikanser özelliklerine sahiptir (Lamson ve ark., 2000). Quercetin güçlü antikarsinojenik özelliklere sahiptir ve apoptozu uyarcı olduğu bilinmektedir böylece beyin, karaciğer, kolon ve diğer dokulardaki tümör büyümesini azaltır ve malign hücrelerin yayılmasını engeller. (Akan ve Garip 2013; Vásquez-Garzón ve ark., 2009). Familial Adenomatöz Polipozis (FAP) hastalarında kurkumin ve quercetin ile kombinasyon tedavisininin araştırıldığı bir çalışmada, hastalara ortalama 6 ay boyunca günde 3 kez 20 mg kurkumin, 480 mg ve 20 mg quercetin uygulanmış, kurkumin ve quercetin ileal ve rektal adenomların sayısını ve büyüklüğünü minimum yan etki ile azalttığı gözlenmiştir (Cruz–Correa ve ark., 2006). Quercetin, TLR4 /NF- κ B (nükleer faktörü kappa B) sinyal yolunu inhibe ederek insan kolon kanseri Caco-2 hücrelerinin migrasyonu ve invazyonunu inhibe edebilir (Han ve ark., 2016). Hem *in vitro* hem de *in vivo* kanser çalışmalarında quercetin'in prostat kanserine karşı yararlı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Yang ve ark., 2015). Quercetin'in BEAS-2B hücre serilerinde heksavalent krom (Cr [VI]) kaynaklı hücre canlılığı kaybını ve ROS oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Pratheeshkumar ve ark., 2017).

1.2.1.5. Antimikrobiyal ve antiviral etkileri

Quercetin'in özellikle gastrointestinal, solunum, idrar ve dermal sistemi etkileyen hemen hemen tüm bakteri varyasyonlarına karşı antibakteriyel etkiler sergilediği bilinmektedir. Anti-enfektif ve replikatif olmayan yetenekleri muhtemelen antiviral özelliklere katkıda bulunabilir (Quecan ve ark., 2019 ; Gansukh ve ark., 2021).

1.2.1.6. Anti-ülser ve gastrit etkileri

Quercetin, mast hücrelerinden ve diğer alerjik maddelerden histamin salınmasını engelleyerek anti-alerjik özellik gösterir, böylece doğal bir antihistaminik görevi yapar. Quercetin'in alerjik etkileri önleme yeteneğinin, astım ve bronşitin tedavisi ve önlenmesinde önemli etkileri vardır (Coles ve ark., 2000).

Quercetin Gastrointestinal mukozayı çeşitli deneysel modellerin neden olduğu akut lezyonlardan ve kısıtlama stres pilor ligasyonu, eserin aspirin, indometasin, asit-etanol ve etanolün neden olduğu mide ülserleri dahil olmak üzere farklı nekrotik ajanlara karşı korur.

Mide koruyucu etki mekanizması, endojen PAF, mukus üretiminde bir artış, histamin seviyelerini azaltan antihistaminik özellikler ve etanol ile indüklenen mast hücrelerinin sayısında azalmayı içerir. Aynı zamanda H. pylori büyümesini, histamin ve dibutiril siklik AMP tarafından uyarıma yanıt olarak parietal hücreler tarafından asit oluşumunu ve ayrıca gastrik H⁺/K⁺ proton pompasını da engeller (De Lira Mota ve ark., 2009).

1.2.1.7. Kardiyovasküler hastalıklar ve ateroskleroz

Quercetin, koroner kalp hastalığına karşı kötü kolesterol (LDL)'nin oksidasyonunu önleyerek korur. Quercetin düzenli olarak alınması yaşlılarda koroner kalp hastalığının önlenir. Bilimsel kanıtlar, Quercetin'in ateroskleroz, miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarı, kardiyotoksisite ve hipertansiyon gibi kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkisini göstermiştir (Russo ve ark., 2012). Bir başka çalışmada Spontan hipertansiyon sıçanlar (SHR) (N-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME), deoksikortikosteron asetat (DOCA)-tuzu ile NO sentez inhibisyonu ile indüklenen hipertansiyonlu sıçanlar kullanılarak quercetin'in (kronik olarak verildiğinde) progresif kan basıncını indüklediği gösterilmiştir (Calabró ve ark., 2018). Aynı bir çalışmada quercetin'in kalp, damarlar ve böbrekte morfolojik ve fonksiyonel değişiklikleri önleyebildiği belirtilmiştir (Perez-Vizcaino ve ark., 2009). En önemli bulgular Quercetin'in, transgenik farelerde insan C-reaktif protein (CRP) ve kardiyovasküler risk faktörlerinin (murin serum amiloid A proteinleri, fibrinojen) sitokinle uyarılmış ekspresyonunu tamamen azalttığını göstermiştir (Prater ve ark., 2008).

Quercetin ERK veya MAP kinazın aktivasyonunu inhibe ederek ROS kaynaklı kardiyomiyopatiyi temizlemektedir. Ayrıca quercetin kardiyoprotektif etkisi, Src kinaz, sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktivatörleri (STAT3), kaspaz 9, Bax ve inflamatuvar faktörünün uyarılmasıyla manganiz superoxide dismutaz (MnSOD) ekspresyonunun azalmasıyla elde edilmiştir. Bu nedenle, quercetin kardiyomiyosit üzerinde kapsamlı etkileri vardır. Kardiyomiyositte STAT3 inaktivasyonu yoluyla inflamatuvar bir yanıtın inhibisyonu, bir iskemi/reperfüzyon hasar modeli için faydalı olmaktadır. (Chen ve ark., 2013).

Quercetin ve türevleri ile *in vitro* ve *in vivo* koşullar altında oluşturulan Alzheimer modellerinde quercetin nöroprotektif etkilerini değerlendirmek üzere yapılan bazı çalışmalardan elde edilen sonuçlar (Çizelge 1.3)

Çizelge 1.3. Quercetin ve türevlerinin Alzheimer modellerinde nöroprotektif etkileri

Alzheimer hastalığı	Model sistemi	Maruz kalma	Etkileri	Kaynakça
1-Quercetin	Fare hipokampal HT-22 hattı	Glutamat kaynaklı toksisite	ROS üretimini engeller, GSH oksidasyonunu önler ve lipid peroksidasyonunu inhibe eder	(Ishige ve ark., 2001)
2- Quercetin	İnsan embriyonik Böbrek (HEK) 293 hücresi	A β (1–42)	A β peptidinin fibrilasyonunu engeller ve Önceden şekillendirilmiş olgun fibriller istikrarsızlaştırır	(Ono ve ark., 2003)
3- Quercetin	HT22 Murin nöroblastoma hücreleri	A β (25–35)	Amiloidojenik A β peptitlerinin uzatılması bastırılır	(Kim ve ark. 2005)
3- Quercetin	Primer hipokampal kültürler	A β (1–42)	Oksidatif stres kaynaklı hasarı ve apoptosisi azaltır	(Ansari ve ark., 2009)
4-Quercetin-30-glukozit	PC12 hücreler	A β (1–42)	H ₂ O ₂ kaynaklı ROS üretimini azaltır	(Zhu ve ark., 2013)
5-Quercetin Ginkgo flavonolleri	Çift transgenik (Tg APP / PS1) fareler	A β (1–42)	CREB / BDNF sinyal yolu uyarır, hipokampusta A β üretiminin azaltır ve mekansal öğrenme açığını tersine çevirir	(Hou ve ark., 2010)
6- Quercetin	APP stable cell line (APP695-transfected (SH-SY5Y))	A β (25–35)	ROS temizleyici, BACE aktivitesini inhibe eder, A β antiagregasyon kabiliyetine sahiptir ve hücre içi GSH içeriğini artırır ve lipid peroksidasyonunu önler	(Jiménez-Aliaga ve ark., 2011)

7-Quercetin-3-O-glukuronid	Üretilen primer nöron kültürleri Tg2576 AH fare modelinden	A β (1–42)	A β peptit üretimini engeller, A β agregasyonu müdahale eder, CREB sinyal yolunu geliştirerek nöron canlılığını muhafaza eder ve -Jun N-terminal kinazları ve mitojen-aktif protein kinaz sinyal yollarını aktive eder	(Ho ve ark., 2013)
8-Acanthopanax Henry'nin etil asetat Quercetin	Serbest hücreler	A β (1–42)	Asetil kolinesteraz ve antioksidan inhibitörleri aktivite olarak rol alır	(Zhang ve ark., 2014)
9- Quercetin	İnsan beyni mikrovasküler endotel hücreleri (hBMEC)	A β (1–40)	Hücre canlılığını artırır, laktat salınımını azaltır dehidrojenaz, nükleer yoğunlaşmayı hafifletir, Bariyer bütünlüğünü koruyarak güçlendirir.	(Li ve ark., 2014)
10-Quercetin	AH' nin üçlü transgenik fare modeli (3 $\times$ Tg AD)	A β (1–40)	Eşleştirilmiş sarmal filament (PHF), β -amiloid (β A) 1-40 ve β A 1-42 seviyelerinde önemli bir azalma ve BACE1 aracılı APP parçalanmasında (CTF β 'ye) bir azalma görülür. Ayrıca, Quercetin öğrenme ve uzamsal bellek görevlerinde daha iyi performans ve daha fazla risk değerlendirme davranışı başlatır	(Sabogal ve ark., 2015)
11-Quercetin	C57BL / 6 genetik arka planında İsveçli çift mutasyona sahip insan APP751 tamamlayıcı DNA'sına sahip APP23 fareleri	A β (1–40)	EIF2a ve ATF4'ün fosforilasyonunu azaltır beyindeki GADD34 indüksiyonu yoluyla ekspresyon, yaşlı farelerde belleğin gelişmesine ve erken aşamada hafızadaki bozulmanın gecikmesi AH model farelerde etkiler	(Hayakawa ve ark., 2015)

1.2.2. Quercetin'in Farmakokinetik Parametreleri

Çalışmalar, quercetin düşük biyoyararlanımının, çok çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olmasına rağmen, terapötik amaçlar için kullanımını sınırladığını göstermiştir (Cai ve ark., 2013).

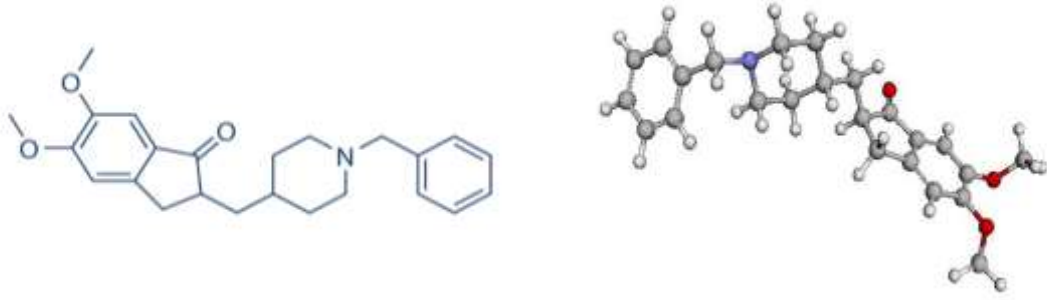
Quercetin'in biyoyararlanımını domuzlarda araştırılmıştır. Quercetin, her hayvana 0,4 mg/kg intravenöz uygulanmış ve bir hafta sonra tek 50 mg/kg vücut ağırlığı oral doz halinde uygulanmıştır. Kan örnekleri farmakokinetik parametreleri analiz etmek için toplanmış görünen biyoyararlanım, sadece serbest quercetin düşünülürken 0.54 ± 0.19 , konjuge quercetin dahil 8.6 ± 3.8 ve quercetin metabolitleri dahil 17.0 ± 7.1 bulunmuştur. (Ader ve ark., 2000).

İnsanda yapılan bir araştırmada quercetin, günde üç kez 500 mg uygulanmış ve quercetin aglycone ve metabolitlerin konsantrasyonunu analiz için plazma ve idrar örnekleri alınmış. Rapor edilen ortalama plazma konsantrasyonu, 3.5 saatte üç kez 463ng/mL olmuştur. Quercetin'in oral klerensinin ortalama yarı ömrü (3.5×10^4 L/h) olduğu bildirilmiştir. Quercetin aglycone ve konjuge metabolitlerin idrarla geri kazanımı sırasıyla 0.05 ile 3.6 ve 0.08 ile 2.6 bulunmuştur (Moon ve ark., 2008).

Quercetin oral yoldan verildikten sonra plazmada sadece glukuronlanmış veya sülfat konjugatı olarak bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca, quercetin aglyconunun, kan-beyin bariyerini geçmede daha az etkili olduğu gösterilmiştir (Day ve ark., 2001). Öte yandan, Quercetin konjugatlarının yüksek polarite nedeniyle, kan-beyin bariyerini daha az etkili geçmesi beklenmektedir (Youdim ve ark., 2004; Youdim ve ark., 2003). Bununla birlikte, literatür, bazı glukuronidlerin, aktif taşıma nedeniyle kan-beyin bariyerini etkili bir şekilde geçmesini desteklemiştir (Kroemer ve Klotz, 1992). Yapılan bir araştırmada inflamatur bölgelerinde, quercetin 3-O-glukuronidin β -glukuronidaz ile hücre içi dekonjugasyonunun arttığı gösterilmiştir (Kaweiet ve ark., 2008).

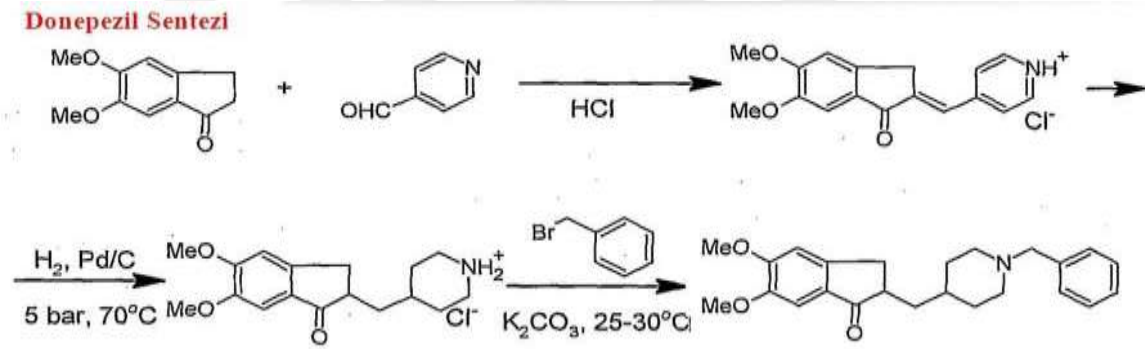
1.3. Donepezil

Donepezil ((RS)-2-[(1-benzil-4-piperidil) metil] -5,6-dimetoksi-2,3-dihidroinden-1on) (Şekil.1.5) spesifik ve geri dönüşümlü bir AchE inhibitörüdür. Beyaz kristalin temel olarak hidroklorür tuzu olarak bulunur, su, metanol, diklorometan, kloroform ve glasiyel asetik asitte çözünür. Amprik formülü $C_{24}H_{29}NO_3HCl$, moleküler ağırlığı 415,95 ve erime noktası $218-220^{\circ}C$ 'dir. Non-kovalent, Dönüşümlü, piperidin yapısında ve ikinci kuşak kolinesteraz inhibitörlerindendir (Md. ve ark., 2014; Mahalingam ve ark., 2017). Türkiye'de günlük dozu 5–10 mg olacak şekilde ruhsat almıştır. Hafif ve orta şiddette Alzheimer tipi demansın semptomatik tedavisinde kullanılır.



Şekil 1.5. Donepezil ve Donepezil 3 boyutlu molekül formülü

Donepezil, merkezi olarak tepkimeye sokulmuş bir asetil kolinesteraz inhibitörüdür. Kortikal asetilkolini arttırmak amacıyla Alzheimer tedavisinde kullanılır. Donepezil sentezi indanon ve piperidin kısımları arasındaki aldolkoncaizasyonve dehidratasyona dayanır. Bu asimetrik hidrojenlenmeden sonra donepezil oluşur (Costanzo ve ark., 2016).



Şekil 1.6. Donepezil sentezi

Alzheimer hastalığının hafif ve orta şiddet tedavisinde kullanılabilecek tek reçeteli ilaçtır. 1996 yılında kullanım için onaylanmıştır (Rogers ve ark.,1996). Donepezilin, hafif-orta Alzheimer hastalığının ilerlemesini yavaşlattığı göstermiştir. Asetilkolin bilgi, düşünmek ve hatırlamak için beynin yeteneğinden kısmen sorumlu görülmektedir. Donepezil kullanmak beyin için bu kimyasal madde miktarını artırır, donepezil sadece nörotransmitter seviyesinde değil, aynı zamanda patogenezinde yer alan hemen hemen tüm aşamalarda moleküler ve hücresel düzeyde etki eder, (Jacobson ve ark., 2008).

Donepezilin standart başlangıç dozu 5 mg'dır sadece günde bir kez verilebilir. Yan etkiler olarak tolere edilebilir ise de bu bir ay sonra 10 mg'a artırılabilir. Donepezil, gerekli olduğu sürece devam edilebilir. Uykusuzluk, bulantı, iştah kaybı, ishal, kas krampları ve kas güçsüzlüğü gibi çeşitli yan etkiler vardır (Sharma, 2019). Alzheimer hastalığı ilerleyici bir durumdur ve sonuçta ölüme yol açabilir. Donepezil Alzheimer hastalığını tedavi etmez

sadece onun ilerlemesini durdurur. Bu ilaç Alzheimer hastalarında bir kişinin geçici bellek kaybını önlemek ve günlük görevlerini gerçekleştirmek için kullanılır.

1.3.1. Donepezilin Farmakolojik özellikleri

Donepezilin klinik çalışmalarda, hastalık ilerlemesinin durdurulmasında potansiyel olarak etkileri olabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle, nörolog, psikiyatri ve birinci basamak aile hekimi Alzheimer hastalarına karşı donepezili önermektedirler. Bununla birlikte, 6-12 aylık kontrollü çalışmalar bilişte ve / veya davranışta az miktarda fayda sağlamıştır. Ayrıca donepezil HCl'ün hafiften ağıra kadar giden birçok klinik tabloda kullanımının uygun ve iyi tolere edilebildiğini birçok nörofarmakolojik, farmakokinetik ve klinik çalışmalar olduğu bilinmektedir.

Donepezilin bilişsel işlev üzerindeki etkilerine bakan plasebo kontrollü çalışmaların sonuçları, ilacı alan hafif ve orta dereceli Alzheimer hastalığı olan kişilerde bilişsel düşüş (nörodejenerasyon) önemli azalmalar olduğunu göstermiştir. Bilişsel düşüşteki bu azalma ve donepezil tedavisi sırasında bilişsel işlevsellik ilacı aldıktan altı hafta sonra belirgin görünmektedir. Ek olarak hastalığın daha ileri ve şiddetli aşamalarında bilişsel düşüşü azaltabileceği ve yardımcı olabileceğini gösteriyor (Feldman ve ark., 2001).

Donepezil'in bilişsel düşüş hızını yavaşlatabilsede ilaç ve diğer ChEI'lerin baş dönmesi ve senkop, bradikardi (anormal yavaşlatılmış kalp hızı), atriyal aritmiler, miyokard enfarktüsü, anjina, nöbetler, atriyoventriküler blok ve ortostatik hipotansiyon yaptığı gösterilmiştir (Rowland ve Harper ve 2007). Bununla birlikte, bu olumsuz etkiler çoğunlukla metabolize edilen donepezil miktarının terapötik dozu büyük ölçüde aştığı durumlarda görülür (Bordier ve ark., 2006).

Bradikardinin genel popülasyonda (her yaşta) oldukça yaygın olduğu ve erkeklerin yaklaşık %15'inin ve kadınların %2'sinin klinik olarak tanımlanmış bradikardi kriterlerini karşıladığı belirtilmektedir (Ostchega ve ark., 2011).

Bradikardi ve aritmi gibi yan etkilerin artmış asetilkolin üretimi veya artmış vagal nörotransmisyon ile tetiklendiği ve kalp atış hızını yavaşlattığı varsayılmaktadır. Bununla birlikte, donepezil Alzheimer hastalığı olan kişiler arasında kalp atış hızı değişkenliğini (HRV) artırarak kardiyak otonom disfonksiyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir (Umegaki ve Khookhor, 2013).

1.3.2. Donepezilin Farmakokinetik Özellikleri

Donepezil, nöronlarda kolinesteraz inhibitörü asetilkolinesteraza karşı ilgili klinik dozlarda yüksek derecede seçiciliğe sahiptir. Plazma ve periferik dokularda bulunan Bütirikolinesteraza karşı düşük bir inhibisyon etkisi vardır (Rogers ve ark., 1996). Yapılan hayvan çalışmalarında donepezilin beyindeki asetilkolinesterazı önemli ölçüde inhibe ettiği fakat çizgili, düz veya kalp kasındaki asetilkolinesterazı çok az inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca donepezilin dokuda seçicili davrandığı belirtilmiştir (Rogers ve ark., 1998). Donepezilin oral biyoyararlanımı %100'dür, bağırsakta iyi emilir ve kan-beyin bariyerini kolayca geçebilir. Donepezilin yarı ömrü yaklaşık 70 saat ve başlangıç dozu günde 5 mg olup, en az 4 hafta kullandıktan sonra günde 10 mg'a yükseltilebilir (Selekler. 2010). Donepezilin emilim oranı ve derecesi gıda alım veya uygulama süresinden etkilenmektedir (Mihara ve ark., 1993). Donepezil proteine bağlanma oranı çok yüksektir, yaklaşık %96 oranında proteine bağlı olarak taşınır. Donepezil %75 albümine ve %21 α -1-asit glikoproteine bağlanır (Tiseo ve ark., 1998'a). Donepezil ilk geçiş metabolizmasında dört ana metabolite dönüşür. Bu metabolitlerden ikisi ve küçük metabolitlerin bir kısmı aktif olarak bilinir. Donepezil, sitokrom P450 izoenzimleri CYP2D6 ve CYP3A4 ile glukuronidasyona uğrar. Metabolizma hızı yavaştır ve doyurulabilir olarak görülmemektedir. Radyo işaretli donepezilin uygulanmasının ardından, plazma radyoaktivitesi temel olarak bozulmamış donepezil (%53) ve 6-Odesmetil donepezil (%11) formunda bulunur. Bu metabolitin *in vitro* ortamda donepezil ile aynı oranda asetilkolinesterazı inhibe ettiği ve plazmada donepezile benzer şekilde %20 oranında bulunduğu rapor edilmiştir (Tiseo ve ark., 1998b). Donepezilin yarı ömrü yaklaşık 70 saattir ve zirve konsantrasyona 3-4 saatte ulaşır (Tiseo ve ark., 1998'a). Eliminasyonu böbrek ve safrada gerçekleşir. Radyo işaretli donepezilin uygulamasını takiben 10 günlük süre içerisinde geri kazanılan toplam radyoaktivite idrarda %57 (%17 bozulmamış ilaç) ve dışkıda %15 (%1 bozulmamış ilaç); %28'i bulunamamıştır (Tiseo ve ark., 1998b; Baysal, 2015).

Alzheimer hastalığında hücre ölümüne neden olan ve hücre kültürü modellerinde nöroprotektif etki çalışmalarında kullanılan üç sitotoksik ortam vardır: oksijen, glukoz yoksunluğu ve ekzojen glutamat.

Donepezilin, primer sıçan kortikal nöronları üzerinde *in vitro* iskemi modelinde sıçan primer kültürlü serebral kortikal nöronlarda oksijen-glukoz yokluğunda yaralanmaya karşı

koruyucu bir etkiye sahip olduğu. Ayrıca bu etkisinin muskarinik kolinerjik sistemden ve nikotinik kolinerjik sistemden bağımsız olduğu ve böylece, iskemik serebrovasküler hastalık ve Alzheimer hastalığında beyin nöron hücrelerinin ilerleyici dejenerasyonuna karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Akasofu ve ark., 2003).

Glutamat ile indüklenmiş toksisiteye karşı donepezilin oksijen ve glukoz yokluğuna karşı olan koruyucu etkisi gibi koruduğu gözlemlenmiştir (Shen ve ark., 2010).

Yapılan bir araştırmada tamamen gelişmiş amiloid patolojisi olan Alzheimer fare modellerine kısa süreli donepezil tedavisi uygulanmış ve bu tedavi edilen farelerde Aβ birikimi tedavi edilmeyen Alzheimerlı farelere göre daha düşük olduğu gösterilmiştir (Easton ve ark., 2013).

Donepezil, hipokolinerjik sıçan modellerinde ACh içeriğini yükseltir. Bir muskarinik reseptör bloker olan scopolamin, postsinaptik muskarinik reseptörü bloke eder ve ayrıca presinaptik reseptörleri bloke ederek kolinerjik sinir terminallerinden ACh salınımını kolaylaştırır. Bu kolaylaştırılmış ACh salınımı, sinir terminallerinde ACh deposunun tükenmesine neden olur. Donepezil uygulaması, skopolamin ile indüklenen bu ACh tükenmesine karşı koyar. Sıçanlarda, serebral korteks, insanlarda Meynert çekirdeği bazalisinin bir analogu olan nükleus basalis magnocellularis'ten (NBM) kolinerjik nöronların innervasyonunu alır. NBM'nin beyin lezyonu, serebral kortekste ACh içeriğini azaltır. Donepezil, sıçanlarda serebral kortekste ACh içeriğini artırır (Sugimoto ve ark., 2002). Sıçanlarınla bir eğitim çalışmasında, sıçanlar önce hafif bölmeden test kutusunun karanlık bölmesine kolayca hareket eder ve egzersiz denemesinde ayak şoku alırlar. Daha sonra fareler, bu görevi öğrenirlerse, tutma denemesinde ayak şokunu önlemek için ışık bölmesinde kalırlar. NBM lezyonu olan sıçanlar, tutma denemesinde ışık bölmesinde uzun süre kalamazlar. Bu çalışma ile Donepezil, nucleus basalis magnocellularis (NBM) lezyonunun denemedeki gecikmenin 0.125 ile 1,0 mg / kg, p.o. dozunda önlenemediği gösterilmiştir (Ogura ve ark., 2000).

Son zamanlarda, yapılan Alzheimer fare modelini kullanan birkaç çalışmada, donepezilin beyin Aβ birikimini ve hipokampal atrofisini azaltabildiği gösterilmiştir.

Bu etkinin en azından kısmen donepezilin klinikte gecikme ve değiştirici gibi etkilerini destekleyebileceği önerilmektedir. Bununla birlikte, donepezilin bu hastalık değiştirici etkileri hala insanlarda bilinmemektedir. Bildiğimiz kadarıyla, donepezilin

serebral A β birikimini değiştirmek için etkisini araştıran *in vivo* görüntüleme çalışması yoktur (Easton ve ark., 2013; Dong ve ark., 2009; Hashimoto ve ark., 2005).

Her ne kadar donepezilin öncelikle semptomatik tedavi için bir ajan olarak görülse de klinik veya preklinik/*in vitro* alışmalar da dahil olmak üzere daha önce yayınlanan donepezil çalışmaları hem kolinerjik hem de kolinerjik olmayan mekanizmalardan olası bir hastalık modifiye edici veya nöroprotektif etkide rol aldığı bildirilmiştir (Zimmermann, 2013; Solntseva ve ark., 2014; Noh ve ark., 2013; Yoshiyama ve ark., 2010).

In vivo veya *in vitro* Alzheimer hastalığı modellerinde yapılan klinik öncesi çalışmalarda, A β toksisitesi glutamatın neden olduğu nörotoksisite nroenflamasyonu ve tau patolojisi ve vasküler patolojisine karşı olmak üzere kolinesteraz inhibisyonundan bağımsız birkaç nöroprotektif donepezil mekanizmasından kaynaklı olduğu gösterilmiştir.

Ayrıca donepezil A β iskemiye karşı koruyucu etkiler de dahil olmak üzere bir dizi glutamat toksisitesi ve hipokampal atrofinin ilerlemesini engelediği gösterilmiştir (Takada-Takatori ve ark., 2009; Solntseva ve ark., 2014; Shen ve ark., 2010; Yoshiyama ve ark., 2010; Akasofu ve ark., 2008).

Kimura ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada sıçan septal nöronlarında donepezilin A β 'yi önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir (0.1, 1 and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LDL akış konsantrasyonları ile değerlendirilen nörotoksisite, ortalama LDH akışını sırasıyla %9,4, %17,4 ve %22,5 oranında azaltmıştır). Bu sonuçlarla donepezilin A β fibril miktarını azaltarak nöroprotektif bir etki yaptığını ve etkinin kolinerjik etkilerinden bağımsız olduğunu belirtmişlerdir (Kimura ve ark., 2005).

Donepezil, nikotinik asetilkolin reseptörler (nAChRs)'nin hem doğrudan hem de dolaylı olarak uyarılmasıyla glutamat kaynaklı nörotoksisiteye karşı koruma sağlayabildiğini rapor edilmiştir. Bu nöroprotektif mekanizmanın donepezil PI3K-Akt yolunu aktive etmesinin, apoptoz ve nitrik oksit üretimini bastırmasından kaynaklı olduğu gösterilmiştir (Takada-Takatori ve ark., 2008).

Ayrı bir çalışmada donepezil nikotinik asetilkolin reseptörleri ve N-metil-D-aspartatın aşağı regülasyon reseptörleri uyararak glutamat toksisitesini azalttığı bildirilmiştir (Shen ve ark., 2010).

Donepezil, $\sigma 1$ reseptörü için yüksek afiniteye sahiptir. Donepezilin A β tarafından bozulan hipokampal uzun süreli güçlenme üzerindeki kurtarma etkisinin $\sigma 1$ -reseptör

agonisti PRE-084 tarafından taklit edildiğini ve σ_1 -reseptör antagonisti haloperidol tarafından ortadan kaldırıldığını bulmuştur (Solntseva ve ark. 2014).

Başka bir çalışmada, donepezil A β kaynaklı toksisiteye karşı PRE-084, Takrin, Rivastigmin ve Galantamine göre daha güçlü anti-amnezik ve nöroprotektif etkiler gösterdiğini belirtilmiştir (Meunier ve ark., 2006).

Bir araştırmada Donepezil'in beyin fonksiyonellerini koruduğu gösterilmiştir. Bu deney sonucuna göre plaseboya ortalama bazal seviyelerin %0,5, %24 ve %10,4'lük hafta boyunca bir düşüşle sonuçlandı. Metabolik aktivitenin arttığı beyin bölgeleri plasebo ile karşılaştırıldığında donepezil, orta ve üstün frontal korteksler, premotor beyin bölgeleri, bilinçli hafızaya aracılık eden ve öğrenen alanlar tarafından metabolik aktivitenin arttığı gösterilmiştir (Tune ve ark. 2003).

Ayrıca hipokampal atrofinin ilerlemesini, tedavi edilmeyen hastalara kıyasla yavaşlattığını bildirmişlerdir (Dubois ve ark., 2015; Kim ve ark., 2017).

Donepezilin Alzheimer Hastalığı olan kişilerde farklı doz ve sürelerde uygulanması ve değerlendirilmesi (Çizelge 1.4).

Çizelge 1.4. Donepezil uygulamaları

Çalışma	Uygulama	Sonuçlar
Doody ve ark. (2009)	Donepezil 10 mg·gün ⁻¹ 48 hafta plasebo	Modifiye edilmiş Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale test (ADAS-cog) için tedavi arası farklılıklar anlamlıydı Clinical Dementia Rating–Sum Boxes (CDR-SB) için tedavi arası farklılıklar minimaldi ve anlamlı değildi
Salloway ve ark. (2004)	Donepezil 10 mg·gün ⁻¹ 24 hafta plasebo	Alzheimer's Disease Assessment Scale Cognitive Subscale test (ADAS-cog) toplam farkı ≥ 4 ve ≥ 7 puanları için anlamlıydı
Winblad ve ark. (2006)	Donepezil 3 yıl boyunca 10 mg Plasebo 1 yıl boyunca ardından 2 yıl Donepezil 10 mg	Gottfries-Bråne-Steen Scale, MMSE, Global Deterioration Scale and Progressive Deterioration Scale için gecikmeli başlatma üzerine sürekli tedavi için eğilim veya önemli tedavi farklılıkları
Mohs ve ark. (2001)	Donepezil 54 hafta boyunca 10 mg Plasebo	Donepezil (%41) hastalardan daha fazla plasebo (%56) klinik olarak belirgin fonksiyonel düşüş kriterleri ile karşılaştı. Klinik olarak belirgin fonksiyonel düşüş medyan süre 357 gündü Donepezil ve plasebo için 208 gün
Wallin ve ark. (2007)	Donepezil 5-10 mg·gün ⁻¹	Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale test (ADAS-cog) (0-70) skorundaki ortalama değişim: 8.2 36. ayda Clinician Interview-Based Impression of Change (CIBIC) skoru%30 oranında düzeldi veya değişmedi

1.3.3. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojik Mekanizmaları

Alzheimer hastalığı esas olarak, hücre dışı amiloid plakların birikimi ile karakterize edilir. Bu plaklar yaşlılık plakları olarak bilinir. Amiloid plaklar nöroinflamatuvar değişikliklerin yanı sıra nörofibriler yumaklarla da ilişkilidir, bu da nöronal sağlığın knması için gerekli olan süreçleri: iletişim, metabolizma ve onarımı etkiler. β -Amyloid proteini, Amyloid Precursor-Protein (APP) β ve γ sekretaz enzim tarafından parçalanmasıyla üretilir (Moore ve ark., 2012). Amyloid Precursor-Protein (APP) üç farklı biçimde bulunur: en kısa

izoform, APP695 çoğunlukla nöronlarda eksprese edilirken, diğer iki izoform APP751 ve APP770, astrositler gibi glial hücrelerde eksprese edilir. Amyloid Precursor-Protein (APP) fizyolojik rolü hücre büyümesini ve çoğalmasını teşvik etmektedir. A β plakları, entorhinal korteks, hipokampus, neokorteks, amygdale ve subkortikal alanlar dahil olmak üzere birçok beyin bölgesinde nöron kaybına yol açar (Dawkins ve ark., 2014). Hücrelerde iki farklı enzimatik APP işleme amiloidojenik ve amiloidojenik olmayan yollarla meydana gelir: Amiloidojenik olmayan işleme yolunda, APP Sekretaz tarafından bölünür. APP (sAPP α) ve C-terminal fragmanlarının uzun salgılanmış formlarını verir. Amiloidojenik işleme yolunda, APP β ve γ sekretazlar tarafından bölünür, APP (sAPP β), C-terminal fragmanları ve A β 'ların uzun salgılanmış formlarını verir. A β parçası kimyasal olarak yapışkan yapıcıdır plaklar ve sinapslar yoluyla hücreden hücreye sinyalleri bloke eder ve bu da nöronal hücre ölümüne yol açar (Pool ve ark., 2016).

Nörofibriler yumaklarla (NFT') tau olarak bilinen mikrotübül ile ilişkili proteinlerin hiperfosforilasyonu ile üretilir. Alzheimer Hastalığının bir başka önemli özelliğini temsil eder. Tau proteinlerinin aşırı fosforilasyonu, mikrotübüllere bağlanma yeteneklerini azaltır ve yumaklar (NFT)'lerin oluşumuyla sonuçlanır (Fisher ve ark., 2014). Yumakların hem yoğunluğu hem de nöroanatomik lokalizasyonu Alzheimer hastalığı patogeneğinde önemli belirleyicilerdir. A β , tau proteinlerinin fosforilasyonunu indükler, böylece yumakların (NFT)'lerin oluşumunu tetikler ve oksidatif stresi artırarak, kalsiyumu, homeostaz ve eksitotoksisiteyi değiştirerek nöronal hücre ölümüne neden olur (Stern ve ark., 2002).

A β üretimi ve klerensi arasındaki dengesizlik, özellikle geç başlangıçlı Alzheimer hastalığında A β agregalarının oluşumuna yol açar ve A β klirensi dengesinin bozulması en sık geç başlangıçlı Alzheimer hastalığında görülür. Heparan sülfat proteoglikanlar (HSPG'ler), A metabolizmasını etkileyerek ve A β klerensini azaltarak Alzheimer hastalığı patogeneğinde en kritik olanlardır. Normal koşullar altında, HSPG'ler gelişimde çeşitli önemli fizyolojik fonksiyonları yerine getirir. Bu fonksiyonlar büyüme faktörü sinyalizasyonu, hücre proliferasyonu, adezyon, migrasyon ve homeostazdır. HSPG'ler A β 'ye bağlanır ve agregasyonunu hızlandırır, A β 'nin neden olduğu nörotoksisite ve nöroinflamasyona aracılık eder (Menkeve ark., 2015).

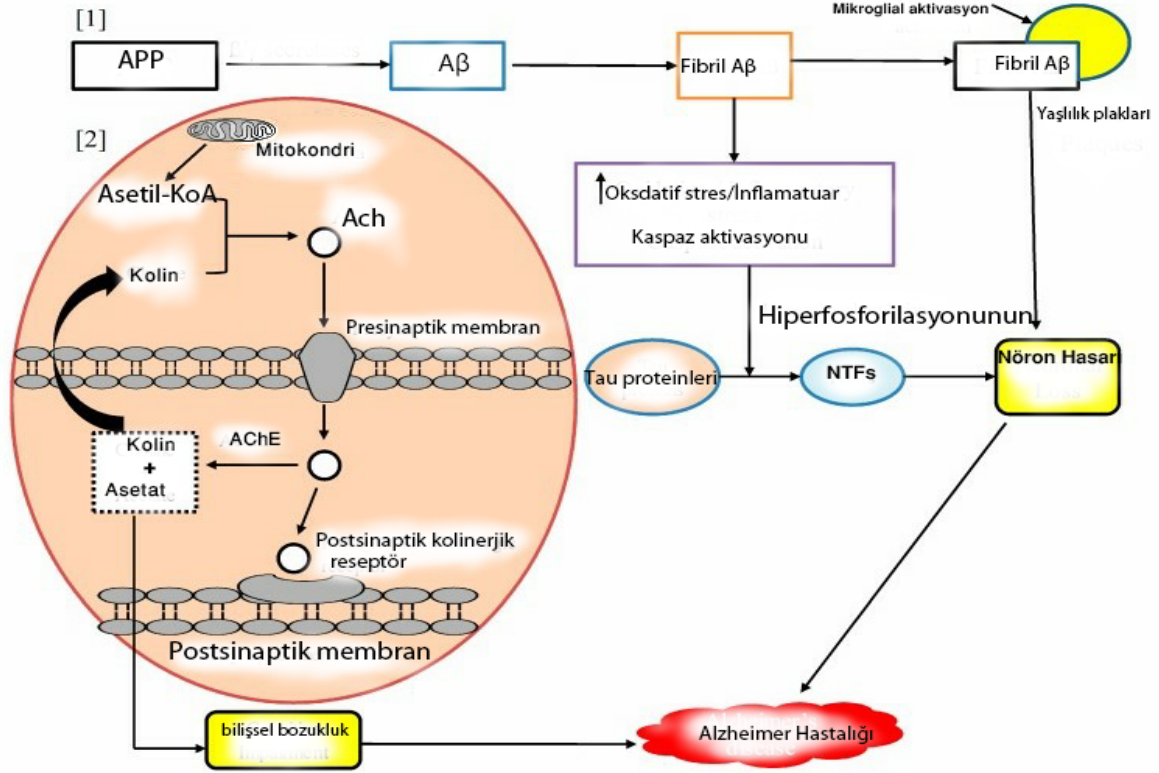
Oksidatif stres sıklıkla Alzheimer hastalığında görülür ve nörodejenerasyona katkıda bulunur. ROS üretimi A β agregalarını tetikler. Hafif bilişsel bozulmaya hastalar genellikle günlük yaşamın enstrümantal aktivitelerinde minimal bir bozukluğu ile bilişsel bozukluk geliştirir ve Alzheimer hastalığının ilk bilişsel ifadesi olabilir (Braillon, 2019). Oksijenaz-1

ve biliverdin redüktaz A gibi proteinlerin fosforilasyonundaki değişikliğin, en kritik antioksidan yolların sinyali etkilediği kaydedildi. Bu durumda mitokondriyal enerjiyle ilgili proteinlerin, Pirüvat dehidrogenaz kompleksi ve Alfa-ketoglutarat dehidrogenaz azalmış aktivitesi ile birlikte olan mitokondriyal hasara yol açar. Hasarlı mitokondri antioksidan savunmasında yetersiz kalır ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyeleri, yüksek üretimi tetiklediğini göstermişlerdir (García-Escudero ve ark., 2013).

Nöroinflamasyon, Alzheimer hastalığı patogenezinde bir işarettir. Beynin doğuştan gelen bağışıklık hücreleri, çoğunlukla yaşlı ve hastalıklı beyinlerde, sistemik olaylara yanıt vermek için hızlıdır. Mikroglia ve astroglia üzerindeki örüntü tanıma reseptörlerine bağlanan yanlış katlanmış ve kümelenmiş proteinler, bir dizi inflamatuvar sitokin ve kemokin salarak bir bağışıklık tepkisini tetikler. Kısa ömürlü oksidatif stresin aksine, kronik iltihaplanma uzun sürelidir ve iltihaplanma araçlarının sürekli salınmasına neden olur (Heneka ve ark., 2015).

Yaşlılıkta plakları çevreleyen mikroglia Alzheimer hastalığında yaygın olarak aktive edilir ve bu da insan lökosit antijen-DR'nin (HLA-DR) up-regülasyonuna neden olur. Ek olarak, inflamatuvar araçların üretimi mikroglial aktivasyona ve nörotoksositeye yol açabilir. Mikroglia, fagositotik aktiviteye sahip olmasına rağmen inflamatuvar sitokinlerin ve çeşitli hücre dışı matris proteinlerinin varlığı nedeniyle fagositoz Aβ'da başarısız olur (Frank-Cannon ve ark., 2009). İleri glikasyon son ürün reseptörleri (RAGE) aktivasyonunun reseptörü, inflamatuvar mediatörlerde ve oksidatif stres artışına tetikleyerek nörodejenerasyona yol açar. Ayrıca RAGE aktivasyonu düzenleyici yolların NF-kB, JAK/STAT gibi aktivasyonuna yol açar (Ray ve ark., 2016).

Asetilkolinerjik, glutamaterjik ve serotonerjik nöronlar Alzheimer hastalığında daha çok etkilenir. Erken histolojik değişiklikler serebral kortekste kolinerjik nörotransmisyon kaybını içerir. İkincisi, hipokampus ile birlikte en yüksek kolinerjik oranı alır ve bu bölgelerdeki kolinerjik nöronların kaybı bilişsel eksikliklere ve hafıza bozukluğuna neden olur. Kolin asetiltransferaz aktivitesi, Alzheimer hastalığında bireylerde büyük ölçüde azalır. Asetil kolinesterazın (AChE), Aβ'nin birikmesini hızlandırdığı da gösterilmiştir (Ahmed ve ark., 2017). Raphe çekirdeğinde serotonerjik nöronların ve lokus coeruleus'ta noradrenerjik nöronların dejenerasyonu, Alzheimer hastalığı ile ilişkili bilişsel semptomlara aracılık eder (Savonenko ve ark., 2012) (Şekil.1.7).



Şekil 1.7. Alzheimer hastalığının patogenezi

Şekil 1.7 de Alzheimer hastalığının patogenezi gösterilmektedir.[1] Amiloid prekürsör proteini (APP) β ve γ sekretazlar ile hidrolize edilir β -amiloid ($A\beta$) fibril $A\beta$ s oluşturmak için toplanır. Fibril $A\beta$ s, oksidatif stresi, enflamatuvar kaskadı ve kaspaz aktivasyonunu düzenler, bu da Tau proteininin nörofibriler düğümleri (NFT'ler) oluşturmak için hiperfosforilasyonuna neden olur ve nihai sonuç nöronal hücre kaybıdır. Sinir plakları oluşturmak üzere biriken aktif mikroglia ile birlikte geniş fibriller, bu da nöronal ve sinaptik kayba yol açar. [2] asetil kolinesteraz (AChE) enzimi, asetilkolin (ACh) degradasyonunu teşvik eder ve sonuç olarak nörotransmitter eksikliği, bilişsel bozulmaya yol açar. Amiloid prekürsör proteini (APP), amiloid beta proteinleri ($A\beta$), nörofibriler yumaklar (NFT'ler), asetilkolin (ACh), asetil kolinesteraz (AChE) (Khan ve ark., 2020).

1.3.4. Alzheimer Hastalığına Terapötik Yaklaşımlar

1.3.4.1. Farmakolojik terapötik yaklaşımlar

Bugün Alzheimer için mevcut olan hiçbir farmakolojik tedavi (ilaç) nöronların hasarını ve tahribatını yavaşlatmaz veya durdurmaz. ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), Alzheimer hastalığının tedavisi için altı ilacı onaylamıştır. Bu ilaçlar: rivastigmin,

galantamin, donepezil, memantin, donepezil ile kombine memantin ve tacrine (ABD'de artık tacrine son verilmiştir). Bu ilaçlar beyindeki nörotransmitter miktarını artırarak semptomları geçici olarak iyileştirir. Bu ilaçların etkinliği kişiden kişiye değişir ve süresi sınırlıdır. Alzheimer hastalığı için etkili tedaviler geliştirme zorluğuna birçok faktör neden olur. Bu faktörler, hayvan modellerinin deneysel bir tedavinin insanlar üzerinde etkili olup olmayacağını güvenilir bir şekilde tahmin edememesini, klinik çalışma alanının yavaş ilerlemesini ve araştırma tedavisinin hastalık ilerlemesini etkileyip etkilemediğini gözlemlemek için gereken zamanın nispeten uzun sürmesidir (Massoud ve Gauthier, 2010).

1.3.4.2. Farmakolojik Olmayan Terepotik Yaklaşımları

Farmakolojik olmayan tedaviler ilaç içermeyen tedavilerdir. Farmakolojik olmayan tedaviler genellikle bilişsel işlevi sürdürme veya iyileştirme, günlük yaşam aktivitelerini gerçekleştirme veya genel yaşam kalitesini sağlama amacıyla kullanılır. Ayrıca, depresyon, ilgisizlik, gezinme, uyku bozuklukları, ajitasyon ve saldırganlık gibi davranışsal semptomları azaltmak amacıyla da kullanılabilirler. Örnekler arasında bilgisayarlı hafıza eğitimi, hatırlamayı kolaylaştırmanın bir yolu olarak sevdiği müzikleri dinleme ve uyku bozukluklarını azaltmak için özel aydınlatma gibi uygulamalar yer almaktadır. Mevcut farmakolojik tedavilerde olduğu gibi, farmakolojik olmayan tedaviler de Alzheimer semptomlarına neden olan ve hastalığı ölümcül yapan nöronların hasarını ve tahribatını yavaşlatmaz veya durdurmaz. Randomize kontrollü çalışmalar test edilen farmakolojik olmayan tedavilerin gözden geçirilmesi ve meta-analizleri, bazılarının Alzheimer olan insanlar için faydalı olduğu bulunmuştur. Bunlar arasında bilişsel uyarım ve aerobik egzersizin olumlu etkileri olduğu ortaya çıkmıştır (Farina ve ark., 2014).

Quercetin'in nöroprotektif etkisi, donepezil ile kombine edildiğinde artırılabilir veya sinerjik olabilir. Bu bulgu, muhtemelen donepezilin daha az yan etkisi ile Alzheimer hastalıklarının yönetiminde terapötik bir yaklaşım olabilir. Quercetin ve donepezilin oksidatif hasara karşı etkisi için glioblastoma hücrelerinin kullanılması önemlidir. Quercetin ve donepezilin U-118 MG hücre hattı üzerinde H_2O_2 hasarına karşı koruyucu etkileri konusunda yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın hedefi; quercetin ve donepezili kombine ederek H_2O_2 'nin belli bir konsantrasyon aralığında U-118 MG hücreleri üzerindeki oluşturduğu oksidatif hasara karşı koruyucu etkilerini araştırmaktır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan cihazlar

Güvenlik Kabini; Laminar Flow, Biosafety Cabinet Class II

İnkübatör; CO₂ inkübatörü (%5 CO₂, %95 nem ve 37°C), Thermo Scientific Heracell 150 L

Etüv; MMM Medcenter Einrichtungen GmbH Ecocell

Floresan invert mikroskop; Axio Vert.A1 mikroskop (ZEISS)

Plak okuyucu; BioTek ELX 800

EVE Otomatik hücre sayacı; NanoEnTek

Santrifüj; Nüve NF800R

Pipet pompası; Brand Accu-jet® pro

Pipetler (0,5-2 µl, 0,5-100 µl, 50-200 µl, 2001000 µl, 1-5 ml); Gilson®

Hassas Terazî; AND HR-250 AZ marka (0,0001 g 'a duyarlı

Vorteks; Heidolph

Manyetik karıştırıcı; Wise Shake Feedback SHO

Buzdolabı; ±4°C Arçelik

Derin Dondurucu; -20°C Arçelik

Derin Dondurucu; -86°C ESCO

2.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmaya uygun olarak kullanılan kimyasal maddeler ilgili tabloda listelenmiştir (Çizelge 2.1.2).

Çizelge 2.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Adı	Firma Adı
Quercetin	(Sigma-Aldrich)
Donepezil	(Sigma-Aldrich)
Dimetil sülfoksit (DMSO)	(Merck)
Fosfat Tampon çözelti	(Gibco)
U-118 MG	(ATCC)
Tripsin	(Gibco)
Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM)	(Gibco)
Penisilin/Streptomisin	(Gibco)
Fetal Bovine Serum (FBS)	(Gibco)
L-Glutamin	(Gibco)
Etanol	(Delta)
Hidrojen Peroksit	(Sigma-Aldrich)
(XTT)2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid tuzu)	(Sigma-Aldrich)
Tripan Mavisi (%0,5)	(Biological Industries)

2.2. Metot

2.2.1. Hücre kültürü uygulamaları

Hücre kültürü çalışmaları denemelerinde kullanılmak üzere Glioblastoma (U-118 MG) hücreleri kullanılmıştır. Kültür uygulamaları Glioblastoma (U-118 MG) hücrelerinin çoğaltılmasını, pasajlanmasını, dondurulmasını, çözülmesini ve sayılarak istenen flask ya da plaklara ekilmesini kapsamaktadır.

2.2.1.1. Glioblastoma (U-118 MG) hücre serisi

Biz çalışmamızda quercetin ve donepezilin nöroprotektif aktivitesini incelemek için Glioblastoma (U-118 MG) tümör hücrelerini kullandık. Çalışmamızda U-118 MG tümör hücre hattını seçmemizin birkaç nedeni vardır. Çalışmamızda deneysel seri sayısının fazla olması nedeniyle çok sayıda hücreye ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak oksidatif stres gibi hücre ölümünün yüksek olduğu modellerde birincil nöron hücrelerinin sayısı yeterli değildir. Bu nedenle, çok sayıda çizgiye ve çok sayıda hücreye ihtiyaç duyulduğundan, oksidatif stres içeren çalışmalarda nöron kanseri hücre dizileri kullanılmaktadır ve bu hücreleri kullanan literatürde çalışmalar mevcuttur (Gugnani ve ark., 2018; Jantas ve ark., 2021; González-Sarrias ve ark., 2017).

Kaynağı: Glioblastoma (U-118 MG) hücre serisi (50 yaşında Kafkaslı bir erkek beyni), J. Ponten ve arkadaşları tarafından 1966'dan 1969'a kadar malign gliomalarından türetilen bir dizi hücre soyundan üretilmiştir.

Özellikleri: Glioblastoma (U-118MG) hücre serisi yüksek glikozlu Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle'ın ortamında (DMEM-(Gibco) %5 CO₂'lik nemli bir atmosferde ve 10 % fetal sığır serumu (Gibco) ve penicillin-streptomycin (pen-strep) ile desteklenerek 37°C'de tutulmuştur (Van den Hengel ve ark., 2013).

2.2.2.2. Hücrelerin pasajlanması (Subculturing)

- ✓ İlk kez çözölen hücreler 25 cm² flasklara 5 mL büyüme ortamı içerisinde ekildi.
- ✓ Hücreler %80-90 yoğunluğa (confluent) ulaştıktan sonra 75 cm² flasklarda 15 mL büyüme ortamı içerisinde pasajlandı ve denemeler için bu flasklarda çoğaltıldı.
- ✓ Tüm deneyler 96 kuyucuklu plaklarda gerçekleştirildi. Hücrelerin büyüme ortamı üç dört günde bir yeni büyüme ortamı ile değiştirildi.
- ✓ Hücreler doyumlağa ulaştıklarında 1:4 ya da 1:5 oranında seyreltilerek pasajlandı.

2.2.2.3. Hücrelerin toplanması

- ✓ Flaskların içerisindeki büyüme ortamı atıldı.
- ✓ Flasklar steril PBS ile yıkandı.
- ✓ 25 cm² flask için 1-2 mL, 75 cm² flask için 3-5 mL önceden 37°C 'ye ısıtılmış tripsin/EDTA ilave edildi.
- ✓ Flasklar inkübatörde 4-5 dakika bekletildi.

- ✓ Flaskların yüzeyinden ayrılan hücreler 15 ml'lik tüplerde toplandı.
- ✓ Tüplere 5'er mL büyüme ortamı ilave edildi. Pellet istenen miktarda, önceden 37°C 'ye getirilmiş büyüme ortamı içerisinde süspanse edildi.
- ✓ Hücre süspansiyonu sayılabilir, seyreltilerek flasklara ya da plaklara pasajlanabilir duruma geldi.
- ✓ Dondurulacak hücre süspansiyonuna 1:1 oranında soğuk %80 FBS ve %20 DMSO ilave edildi.
- ✓ Bu şekilde tüpteki son konsantrasyonlar: %40 FBS, %10 DMSO ve %50 büyüme ortamı bulunmaktadır.
- ✓ Elde edilen süspansiyon cryo tüplere paylaştırılarak -20°C 'ye kaldırıldı.
- ✓ -20°C 'de bir saat bekletildikten sonra cryo tüpler 3-4 hafta içerisinde çözülecekse -80°C 'ye, uzun süre saklanacaksa sıvı nitrojene kaldırıldı.

2.2.2.4. Hücrelerin çözülmesi

- ✓ Sıvı nitrojende bekletilen hücreler gerekli olduğunda çözülerek kullanıldı.
- ✓ Sıvı nitrojen ya da -80 °C 'den alınan cryo tüpler hızla 37 °C 'de çözüldü.
- ✓ 4°C'nin üzerindeki DMSO hücrelere toksik etki gösterdiğinden dolayı 37°C'de hücreleri çözdürürken hızlı bir şekilde çalışıldı.
- ✓ Tüp içerisindeki süspansiyon 15 ml'lik tüplere aktarıldı ve üzerine 10 mL önceden 37 °C 'ye getirilmiş büyüme ortamı ilave edildi.
- ✓ Tüp 1300 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
- ✓ Süpernatant atıldı.
- ✓ Pelet 6 mL büyüme ortamında süspanse edildi ve 2 adet 25 cm²flaska paylaştırıldı.
- ✓ Flasklar, 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nem içeren etüve alınarak inkübasyona bırakıldı.

2.2.2.5. Hücrelerin sayılması

Yapılacak tüm denemelerde belirli sayıda hücrenin flasklara ekilmesi için hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Yöntemin prensibi, membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin tripan mavisi boyasını hücre içine almaları ve ölü hücre olarak değerlendirilmeleri veya membran bütünlüğünü koruyan

hücrelerin ise membrandan boya geçişine izin vermemelerine dayanmaktadır (Mosmann, 1983). Canlı hücreler mitokondri organelinde enerji üretimi yapabildiklerinden dolayı hücre membranından giren boya maddesini aktif taşımayla hücre dışına çıkartarak, renksiz görülür ve ölü hücreler ise mitokondri organelinde metabolik enerji ihtiyacını yerine getirememekte hücre membranından geçen boya maddesini absorblar, hücre dışına çıkartamaz aktif taşıma için enerji ihtiyaçlarını karşılayamadıklarından mavi renkte görülürler. U-118 MG hücre süspansiyonundan 50 µl alınarak eppendorf tüpe aktarıldı ve üzerine 50 µl %0,5 tripan mavisi boyası ilave edilerek iyice karışması sağlandı.

- ✓ U-118 MG hücre serisinde hücre canlılığı tespit edildi. Tripan mavisi ile boyanan hücre süspansiyonundan 10 µl örnek alındı, distile su ile temizlenen Neubauer hemositometresinin lamındaki sayım odacığına konuldu.
- ✓ Işık mikroskopunda 20X oküler kullanılarak dört karede hücre sayımı gerçekleştirildi.
- ✓ Tripan mavisi boyasını içine alıp mavi renkte görünen hücreler ölü, boyayı metabolize edip parlak görünen hücreler ise canlı olarak değerlendirildi.
- ✓ Hücre sayısı /ml= Ortalama sayım değeri x seyreltme faktörü x 10^4
Formülünden bir hücre süspansiyonunun bir mililitresindeki hücre sayısı belirlendi
- ✓ Hücre süspansiyonu seyreltilerek istenen konsantrasyonda hücre süspansiyonu elde edilerek ekim yapıldı (Özkaya, 2009).

2.2.2.6. Hücre hatlarında H₂O₂ ile hasar modelinin oluşturulması

U-118 MG hücre serisi üzerinde hidrojen peroksit (H₂O₂) oksidatif stres kaynağı olarak uygulandı. U-118 MG hücre ekimi 96'luk plaklara her kuyucuğa yaklaşık 10.000/100µl gelecek şekilde hücre ekimi yapıldı. U-118 MG hücrelerinin uygun hücre serisi oluşturuldu.

Çalışmada H₂O₂ (62.5-1000µM) serileri hazırlandı daha sonra dilüye edilen hücre serisine ilave edildi. 103µl %30'luk H₂O₂ üzerine 10 ml DMEM eklenerek 10^{-1} M H₂O₂ çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan ana stok çözeltiden seyreltilerek 62.5, 125, 250, 500 ve 1000 µM H₂O₂ nin farklı konsantrasyonları hazırlandı. U-118 MG hücreleri H₂O₂ nin farklı konsantrasyonları ile 20 saat inkübasyona bırakıldı ve İnkübasyon sürelerinin ardından XTT(2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid tuzu) analiz yöntemi ile hücre canlılığı değerlendirildi (Şekil 2.1) (Dinç ve ark., 2017).



Şekil 2.1. U-118 MG hücre hattı üzerinde H₂O₂ uygulama

2.2.2.7. Donepezil ve Quercetin stok çözeltilerinin hazırlanması

Donepezil stok çözeltisi: Donepezilden 4,16 mg tartılarak 10 ml distile su içinde çözüldükten sonra oluşturulan 10⁻³ M'lık stok çözelti DMEM ile seyreltilerek 1,3 ve 9 µM 3 farklı konsantrasyonda donepezil çözeltisi hazırlandı.

Quercetin stok çözeltisi: 3,03 mg quercetin tartılarak 1ml DMSO içinde çözüldükten sonra oluşturulan 10⁻² M'lık stok çözelti, DMEM ile seyreltilerek quercetin 10,30 ve 90 µM farklı konsantrasyonlardaki çözeltisi hazırlandı.

2.2.2.8. H₂O₂ ile Donepezil ve Quercetin stok çözeltilerinin hazırlanması

Donepezilden 4,16 mg tartılarak 10 ml distile su içinde çözüldükten sonra oluşturulan 10⁻³ M'lık stok çözelti 250 µM H₂O₂ ile seyreltilerek 1,3 ve 9 µM'lık 3 farklı konsantrasyonlarda çözeltisi hazırlandı. Quercetinden 3,03 mg tartılarak 1ml DMSO içinde çözüldükten sonra oluşturulan 10⁻² M'lık stok çözelti 250 µM H₂O₂ ile seyreltilerek 10,30 ve 90 µM'lık 3 farklı konsantrasyonlarda çözeltisi hazırlandı.

2.2.2.9. U-118 MG hücrelerinde Donepezil ve Quercetin etkilerinin ayrı ayrı değerlendirilmesi

U-118 MG hücre ekimi: 96'lık plaklarda uygun hücre serisi oluşturuldu ilk uygulamada besiyerleri değişimi yapılarak 4 saat süre ile %5 CO₂ ve %95 hava içeren etüv içerisinde, 37 °C 'de 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

Oluşturulan U-118 MG hücre serisi plaklarındaki besiyeri aspire edilerek yerine donepezilin etksi için 1,3 ve 9 µM'lık konsantrasyonlardan 100 er µl ilave edilerek 20 saat

süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sürelerinin ardından XTT (2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid tuzu) analiz yöntemi ile hücre canlılığı değerlendirildi.

Quercetin'in etksi için oluşturulan U-118 MG hücre serisi plaklarındaki besiyeri aspire edilerek yerine 10, 30 ve 90 μM quercetinden 100'er μl ilave edilerek 20 saat süre ile inkübasyonabrakıldı. İnkübasyon sürelerinin ardından XTT(2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid tuzu) analiz yöntemi ile hücre canlılığı değerlendirildi.

2.2.2.10. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi Donepezil ve Quercetin etkisinin değerlendirilmesi

Donepezil hasar öncesi etkinliğinin belirlenmesi için 96 kuyucuklu plağa eşit sayıda hücreler bırakıldı. Ardından hücre kontrol, besiyerikontrol ve donepezilin 1, 3 ve 9 μM 'lık dozlarından 100'er μl eklenerek hücreler 1 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyon süresinin sonunda ortamdaki çözelti aspire edilerek yerine H_2O_2 ile hazırlanan donepezilin 1, 3 ve 9 μM 'lık dozlarından 100'er μl uygulanark hücreler 20 saat süre ile inküba edildi. Daha sonra 50 μM XTT solüsyonu 4 saat inkübe edilerek hücre canlılığı 450 nm dalga boyunda değerlendirildi.

Quercetin önce uygulamasının etkinliğinin belirlenmesi amacıyla 96 kuyucuklu plağa eşit sayıda hücreler konuldu. Ardından hücre kontrol, besiyeri kontrol quercetin'in 10, 30 ve 90 μM 'lık dozlarından 100'er μl uygulanarak, hücreler 1 saat süre inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyon sonunda ortamdaki çözelti aspire edilerek yerine H_2O_2 ile Quercetin'in 10, 30 ve 90 μM 'lık 3 farklı dozundan 100'er μl 20 saat süre ile inkübe edildi. 50 μM XTT solüsyonu 4 saat inkübe edilerek hücre canlılığı 450 nm dalga boyunda değerlendirildi.

2.2.2.11. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu sonrası Donepezil ve Quercetin'in ayrı ayrı etkisinin değerlendirilmesi

H_2O_2 nun ilk uygulamasında 96'lık plaklarda U-118 MG hücrelerinin uygun hücre serisi oluşturuldu. 250 μM 'lık H_2O_2 çözeltisinden 100'er μl uygulanarak 1 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyon sonunda ortamdaki çözelti aspire edilerek yerine H_2O_2 ile hazırlanan donepezilin 1, 3 ve 9 μM 3 farklı dozundan 100'er μl konularak 20 saat süre ile inkübasyon yapıldı. Daha sonra 50 μM XTT solüsyonunda 4 saat inkübe edilerek hücre canlılığı 450 nm dalga boyunda değerlendirildi.

Quercetin'in değerlendirilmesi için H_2O_2 'nin ilk uygulanmasında 96'lık plaklara U-118 MG hücrelerinin uygun hücre serisi oluşturuldu. 250 μM 'lık H_2O_2 çözeltisinden 100'er μl uygulanarak 1 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyon sonunda ortamdaki çözelti aspire edilerek yerine H_2O_2 ile hazırlanan quercetin'in 10, 30 ve 90 μM 3 farklı dozundan 100'er μl ilave edilerek 20 saat süre ile inkübasyon yapıldı. Daha sonra 50 μM XTT solüsyonunda 4 saat inkübe edilerek hücre canlılığı 450 nm dalga boyunda değerlendirildi.

2.2.2.12. U-118 MG hücrelerinde Donepezil ve Quercetin'in etkisinin birlikte değerlendirilmesi

Donepezil ve quercetin birlikte uygulanmasının etkinliğini belirlemek için, 96 oyuklu bir plakaya eşit sayıda hücre yerleştirildi. Daha sonra hücre kontrol, donepezilin 1, 3 ve 9 μM 'lık dozları ile quercetin'in 10, 30 ve 90 μM 'lık dozları birlikte uygulanarak 20 saat inkübe edildi. Daha sonra hücre canlılığı için 450 nm dalga boyunda 50 μM XTT çözeltisinde 4 saat süreyle inkübe edilerek değerlendirildi.

2.2.2.12.1. Donepezil ve Quercetin'in Birlikte Uygulanmasının Oksidatif Hasar ncesi U-118 MG Hücre Canlılığı zerine etkileri

Donepezil ve quercetin birlikte uygulanmasının oksidatif hasardan önce etkinliğini belirlemek için, 96 oyuklu bir plakaya eşit sayıda hücre yerleştirildi. Daha sonra hücre kontrol, besiyeri kontrol, donepezilin 1, 3 ve 9 μM 'lık dozları ile quercetin'in 10, 30 ve 90 μM 'lık dozları birlikte uygulanarak 1 saat süreyle inkübe edildi. 1 saatlik inkübasyondan sonra ortamdaki solüsyon aspire edildi ve H_2O_2 ile hazırlanan donepezilin 1, 3 ve 9 μM dozu ve quercetin'in 10, 30 ve 90 μM dozları birlikte uygulanarak 20 saat inkübe edildi. Daha sonra hücre canlılığı için 450 nm dalga boyunda 50 μM XTT çözeltisinde 4 saat süreyle inkübe edilerek değerlendirildi.

2.2.2.12.2. Oksidatif Hasar Sonrası U-118 MG Hücrelerinde Quercetin ve Donepezilin Birlikte Uygulanmasının Değerlendirilmesi

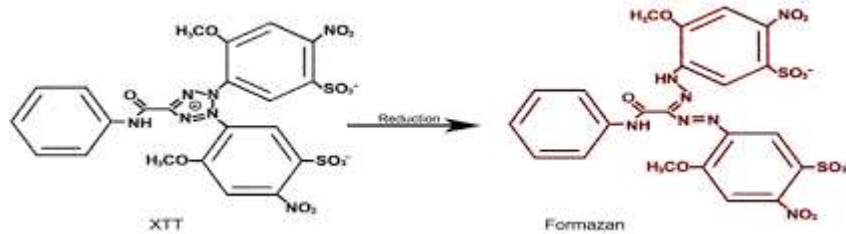
H_2O_2 'nin uygulanması için, önce 96 oyuklu plakalarda U118 MG hücre hattı hazırlandı. 250 μM H_2O_2 1 saat süreyle uygulandı. 1 saatlik inkübasyon süresinin sonunda besiyerindeki solüsyon aspire edildi ve H_2O_2 ile hazırlanan donepezilin 1, 3 ve 9 μM dozları ile quercetin'in 10, 30 ve 90 μM dozlarından oluşan stok solüsyondan ilave edilerek 20 saat inkübe edildi. Inkbasyonun tamamlanmasından sonra 50 μM XTT solüsyonunda 4 saat inkübe edildi, ardından hücre canlılığı 450 nm dalga boyunda değerlendirildi.

2.2.2.13. Hücre Proliferasyon Canlılık Testi II (XTT)

Canlılık testi farklı konsantrasyonlardaki donepezil ve quercetin U-118 MG hüce hattı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Bu çalışmada günümüzde en yaygın olarak kullanılan XTT yöntemi tercih edilmiştir.

XTT (2,3-bis [2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid tuzu) testi canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından bir tetrazolyum tuzunun bir formazan ürününe çevrilmesi (Şekil 2.2), ortaya çıkan bu ürün miktarının spektrofotometrede kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanan hızlı ve güvenilir bir yöntemdir (Riss ve ark.,2016).Bu amaçla hücreler 96-kuyucuklu plaklara her bir kuyucukta 1×10^4 hücre olacak şekilde DMEM besiyeri ortamına ekilir ve kültüre edilir.24 saat sonra plakların içindeki besiyeri uzaklaştırılarak ve kuyucuklara etkisi donepezil ve quercetin fenolred içermeyen DMEM içerisinde dilüe edilerek hücrelere 24 saat boyunca uygulanır. Kültür süresinin dolmasıyla hücrelere XTT (Cell Proliferation Kit II (XTT) çözeltisinden 50 μ M eklenip 4 saat bekletilir ve süre sonunda 450nm dalga boyundaki absorbans değerleri mikropilaka okuyucu ile saptanır. Donepezil veya quercetin içeren kuyucuklardan (kontrol hücreleri) okunan absorbans değeri %100 kabul edilir ve diğer örneklerin absorbanslarından canlılık değeri buna göre hesaplanır.

$$\text{Yüzde Canlılık} = [\text{Örnek ABS ortalama} / \text{Kontrol ABS ortalama}] \times 100$$



Şekil 2.2 XTT ‘in formazan kristaline dönüşüm reaksiyonu.

İstatistiksel analiz

Verilerin değerlendirilmesinde değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Hücre canlılığının gruplar arasındaki farklılığının incelenmesinde One-Way Anova (tek yönlü varyans analizi) yöntemi uygulandı. Çoklu karşılaştırmalar için Tukey HSD, Tamhane T2 ve Dunnett testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edildi. İstatistik parametreleri $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ile ifade edildi. Verilerin değerlendirmesinde IBM SPSS versiyon 22 (IBM SPSS for Windows version 22, IBM Corporation, Armonk, New York, United States) paket programından yararlanıldı.

3. BULGULAR

3.1. Hücre Kültürü Uygulamaları

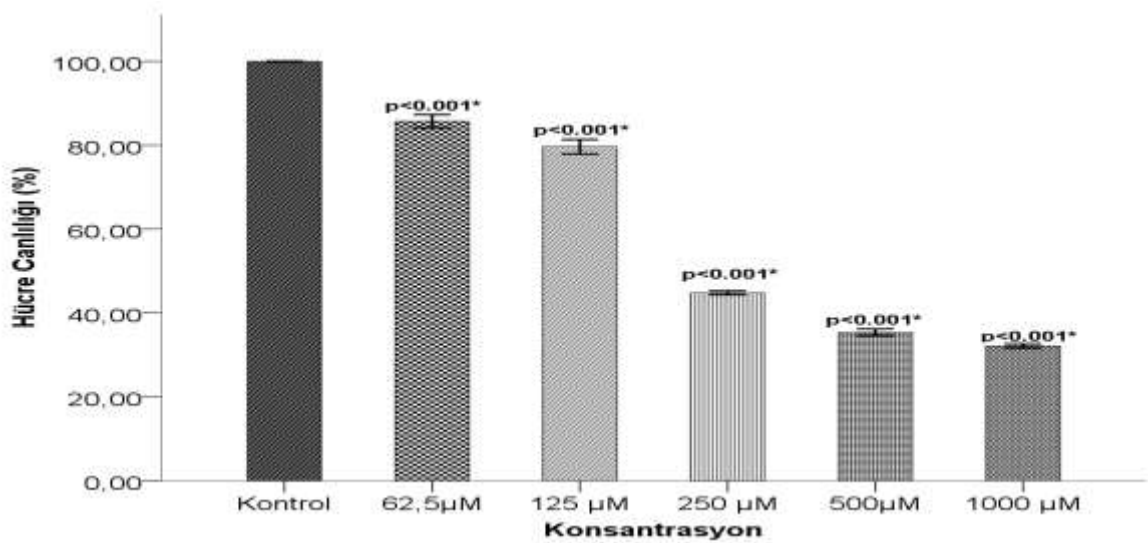
3.1.1. Hücre hatlarında H₂O₂ ile hasar modelinin oluşturulması

U-118 MG hücrelerinde hasar modelinin oluşturulması kullanılan hidrojen peroksit (62.5 ile 1000 µM) konsantrasyon bağımlı olarak hücre ölümünü artırdı (Şekil 3.1). %50-60 arasında hücre ölümü oluşturan hidrojen peroksit konsantrasyonu (250 µM) bundan sonraki deneylerde hücre hasar modeli oluşturulması için kullanıldı (p<0.001) (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. U-118 MG H₂O₂ ile oluşturulan hasar modelinde istatistiksel sonuçlar

Konsantrasyon	Mean±SD	F	P
Kontrol	100,00±0,00		
62,5µM	85,72±4,40 ^a		
125 µM	79,64±4,88 ^a		
250 µM	44,78±1,28 ^a	785,656	P<0.001*
500µM	35,39±2,17 ^a		
1000 µM	32,15±1,41 ^a		

Konsantrasyon:H₂O₂; One-Way Anova; Post-hoc: Tukey test; α:0,05; *Konsantrasyon düzeyleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı; a kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı, F: Anova testi teorik değeri, p: olasılık değeri.



Şekil 3.1. U-118 MG hücrelerinde hidrojen peroksitin hücre canlılığı üzerine etkisi

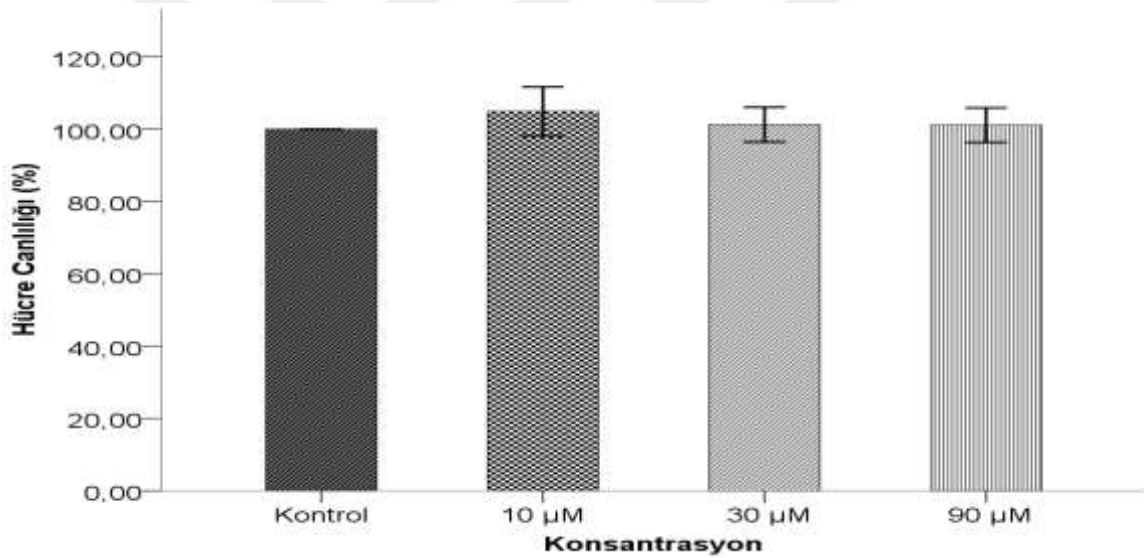
3.1.2. U-118 MG Hücrelerinde quercetin'in etkisinin değerlendirilmesi

Nöroprotektif ajan olarak kullanılması planlanan quercetin, U-118 MG hücrelerinde hücre hasarı oluşturulmadan tek başına farklı konsantrasyon uygulandığında, hücre canlılığı üzerine istatistiksel anlamlı bir etki oluşturmadi (Çizelge 3.2 ve şekil 3.2).

Çizelge 3.2. U-118 MG Hücre hattına quercetin'in yalnız uygulaması

	Mean±SD	F	P
Kontrol	100,00±0,00		
Quercetin 10 µM	104,89±6,78	1,578	0,217
Quercetin 30 µM	101,25±4,80		
Quercetin 90 µM	101,11±4,77		

Konsantrasyon:H₂O₂; One Way Anova: Post-hoc; Tukey HSD Test, Dunnett Test; α:0.05



Şekil 3.2. U-118 MG hücrelerinde quercetin'in hücre canlılığına etkisi

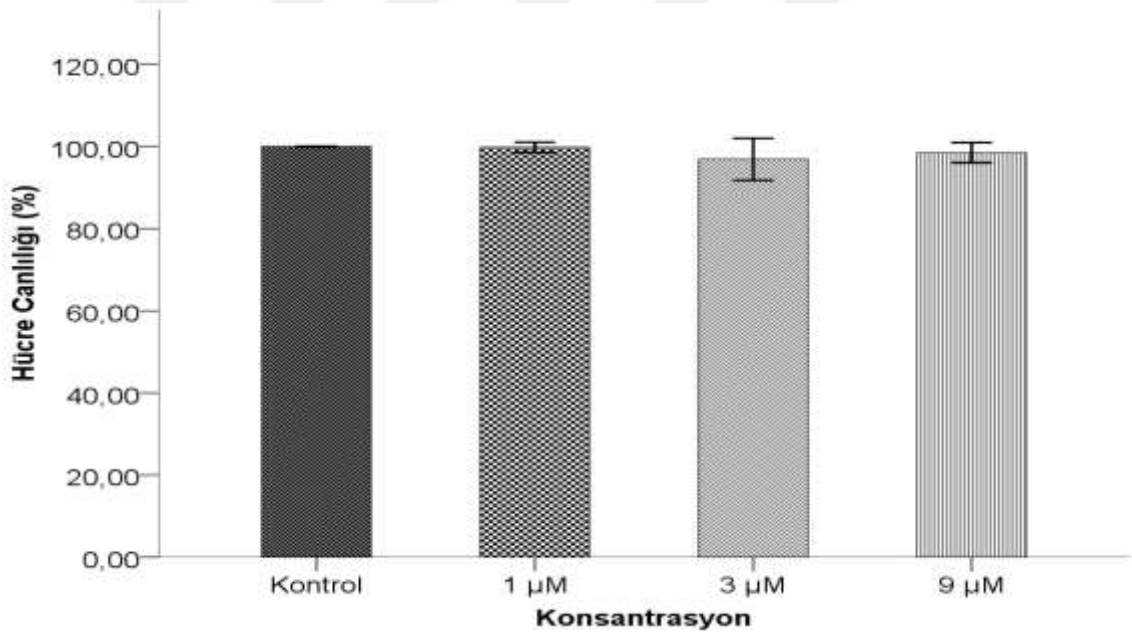
3.1.3. U-118 MG hücrelerinde donepezil uygulamasının değerlendirilmesi

Asetilkolinesteraz inhibitörleri olarak kullanılması planlanan donepezil, U-118 MG hücrelerinde hücre hasar oluşturulmadan tek başına farklı konsantrasyon uygulandığında, hücre canlılığı üzerine istatistiksel anlamlı bir etki oluşturmadi (Çizelge 3.3 ve şekil 3.3).

Çizelge 3.3. U-118 MG üzerine donepezil uygulamasının istatistiksel sonuçları

	Mean±SD	F	P
Kontrol	100,00±0,00		
Donepezil 1 µM	99,78±1,24	1,987	0,139
Donepezil 3 µM	96,86±5,11		
Donepezil 9 µM	98,46±2,47		

Konsantrasyon:H₂O₂; One Way Anova: Post-hoc; Tukey HSD Test, Dunnett Test; α:0.05



Şekil 3.3. U-118 MG hücrelerinde donepezilin hücre canlılığına etkisi

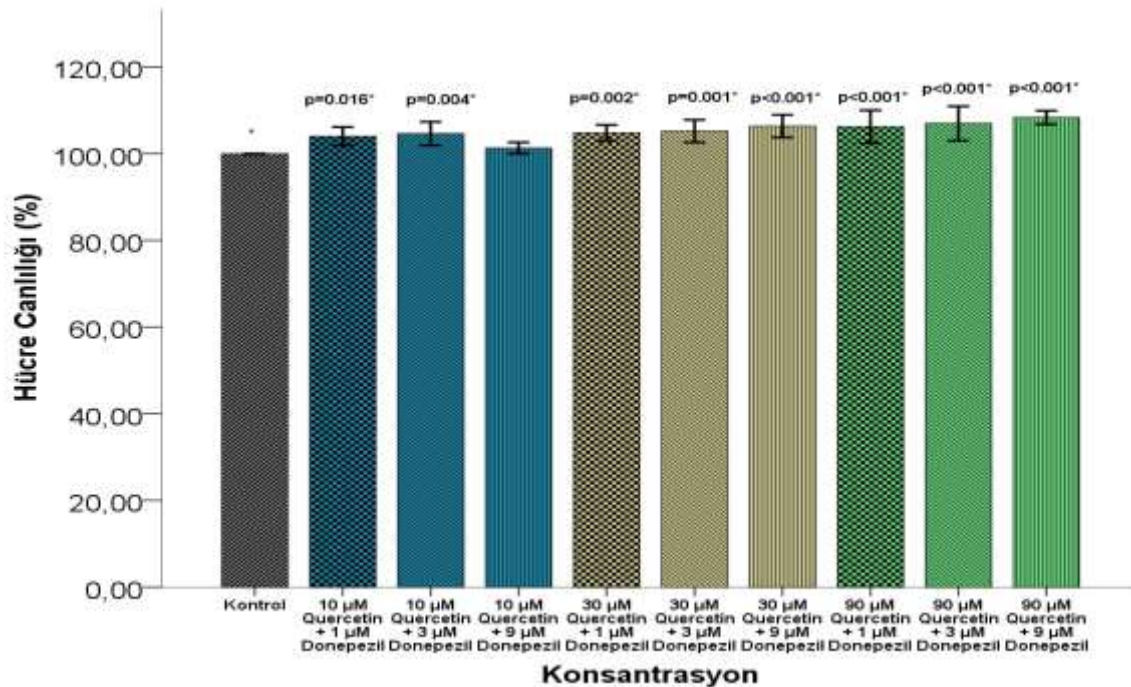
3.1.4. U-118 MG hücrelerinde quercetin ve donepezilin birlikte uygulanmasının değerlendirilmesi

Quercetin ile donepezil, U-118 MG hücrelerinde hücre hasar oluşturulmadan birlikte farklı konsantrasyonlarda uygulandıklarında, hücre canlılık düzeylerini %2 ile %9 arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırdı (Çizelge 3.4 ve şekil 3.4).

Çizelge 3.4. U-118 MG quercetin ve donepezil birlikte uygulamasının istatistiksel sonuçları

	Mean±SD	F	P
Kontrol	100,00±0,00	8,107	P<0.001*
10 µM Quercetin + 1 µM Donepezil	104,00±2,14 ^a		
10 µM Quercetin + 3 µM Donepezil	104,64±2,71 ^a		
10 µM Quercetin + 9 µM Donepezil	101,31±1,31 ^a		
30 µM Quercetin + 1 µM Donepezil	104,80±1,86 ^a		
30 µM Quercetin + 3 µM Donepezil	105,21±2,59 ^a		
30 µM Quercetin + 9 µM Donepezil	106,37±2,62 ^a		
90 µM Quercetin + 1 µM Donepezil	106,21±3,82 ^a		
90 µM Quercetin + 3 µM Donepezil	106,97±3,96 ^a		
90 µM Quercetin + 9 µM Donepezil	108,35±1,57 ^a		

One Way Anova: Post-hoc; Tukey HSD Test, Dunnett Test; α :0.05; *Konsantrasyon düzeyleri arasındaki farklılık anlamlı



Şekil 3.4. U-118 MG hücrelerinde donepezilin ile quercetin hücre canlılığına etkisi

3.1.5. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi quercetin etkisinin değerlendirilmesi

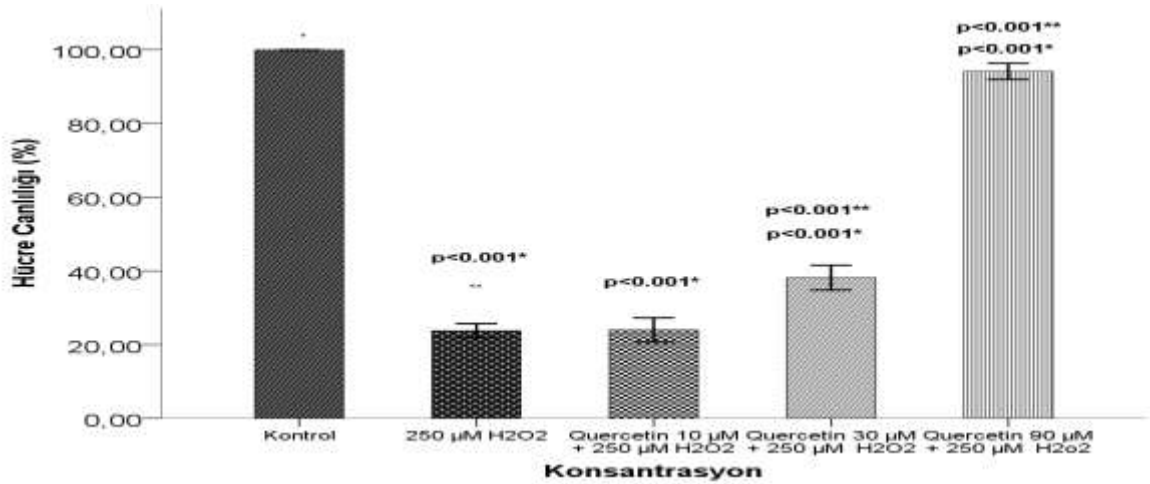
Nöroprotektif ajan olarak kullanılan quercetin, U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi tek başına farklı konsantrasyonlarda uygulandığında, hidrojen peroksitin oluşturduğu yaklaşık %75 hücre ölümünü konsantrasyon bağımlı ve istatistiksel anlamlı olarak azalttı ($p<0.001$) (Çizelge 3.5, Şekil 3.5).

Çizelge 3.5. Oksidatif hasar oluşum öncesi quercetin hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri

	Mean±SD	F	P
Kontrol	100,00±0,00 ^{b, c}	1877,619	P<0.001*
250 µM H₂O₂	23,78±1,95 ^a		
Quercetin 10 µM + 250 µM H₂O₂	23,98±3,30 ^a		
Quercetin 30 µM + 250 µM H₂O₂	38,18±3,37 ^{a, b, c, e}		
Quercetin 90 µM + 250 µM H₂O₂	94,14±2,16 ^{a, b, c, d}		

Konsantrasyon: Quercetin Last: H₂O₂; One Way Anova: Post-hoc; Tukey HSD Test, Dunnett Test; $\alpha:0.05$;

*Konsantrasyon düzeyleri arasındaki farklılık anlamlı; ^aKontrol grubu ile farklılık anlamlı, ^b 250 µM H₂O₂ grubu ile farklılık anlamlı; ^c Quercetin 10 µM + 250 µM H₂O₂ grubu ile farklılık anlamlı; ^d Quercetin 30 µM + 250 µM H₂O₂ grubu ile farklılık anlamlı; ^e Quercetin 90 µM + 250 µM H₂O₂ grubu ile farklılık anlamlı



Şekil 3.5. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi quercetin hücre canlılığına etkisi

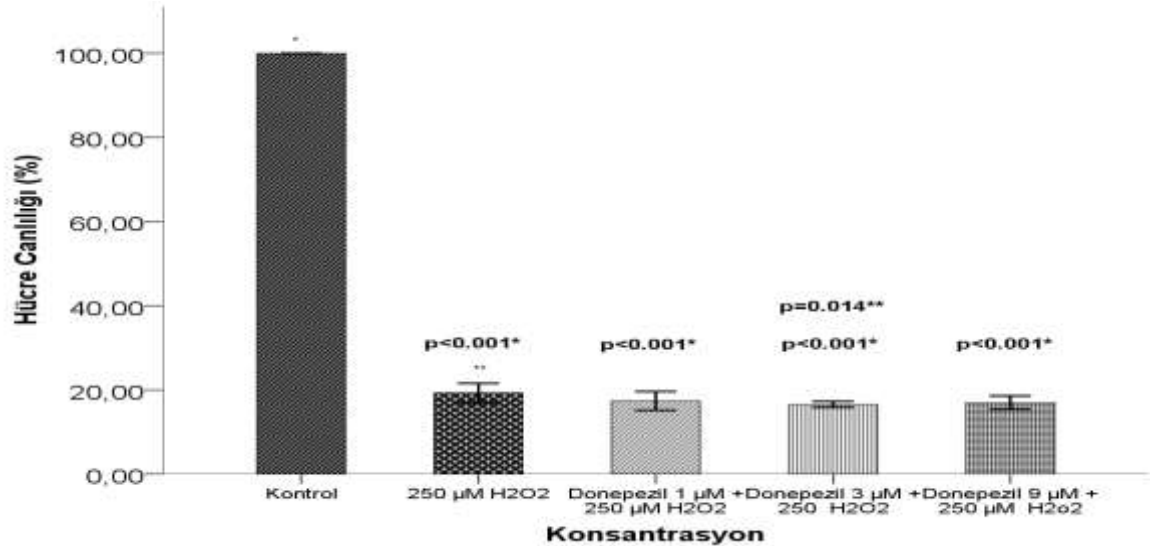
3.1.6. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi donepezilin etkisinin değerlendirilmesi

Asetilkolinesteraz inhibitörleri olarak kullanılan donepezil, U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi tek başına farklı konsantrasyonlarda uygulandığında, hidrojen peroksitin oluşturduğu yaklaşık %80 hücre ölümünü etkisini bütün uygulama konsantrasyonlarında engellemedi (Çizelge 3.6, Şekil 3.6).

Çizelge 3.6. Oksidatif hasar oluşum öncesi donepezilinin hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri

	Mean±SD	F	P
Kontrol	100,00±0,00	4123,217	P<0.001*
250 µM H ₂ O ₂	19,29±2,25 ^a		
Donepezil 1 µM + 250 µM H ₂ O ₂	17,38±2,23 ^a		
Donepezil 3 µM +250 µM H ₂ O ₂	16,54±0,72 ^{a, b}		
Donepezil 9 µM +250 µM H ₂ O ₂	16,96±1,63 ^a		

Konsantrasyon: First: Donepezil, Last: H₂O₂; One Way Anova: Post-hoc; Tukey HSD Test, Dunnett Test; α:0.05; *Konsantrasyon düzeyleri arasındaki farklılık anlamlı; ^aKontrol grubu ile farklılık anlamlı, ^b 250 µM H₂O₂ grubu ile farklılık anlamlı; ^c Donepezil 1 µM + 250 µM H₂O₂ grubu ile farklılık anlamlı; ^d Donepezil 3µM + 250 µM H₂O₂ grubu ile farklılık anlamlı; ^e Donepezil 9 µM + 250 µM H₂O₂ grubu ile farklılık anlamlı



Şekil 3.6. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi donepezilin hücre canlılığına etkisi

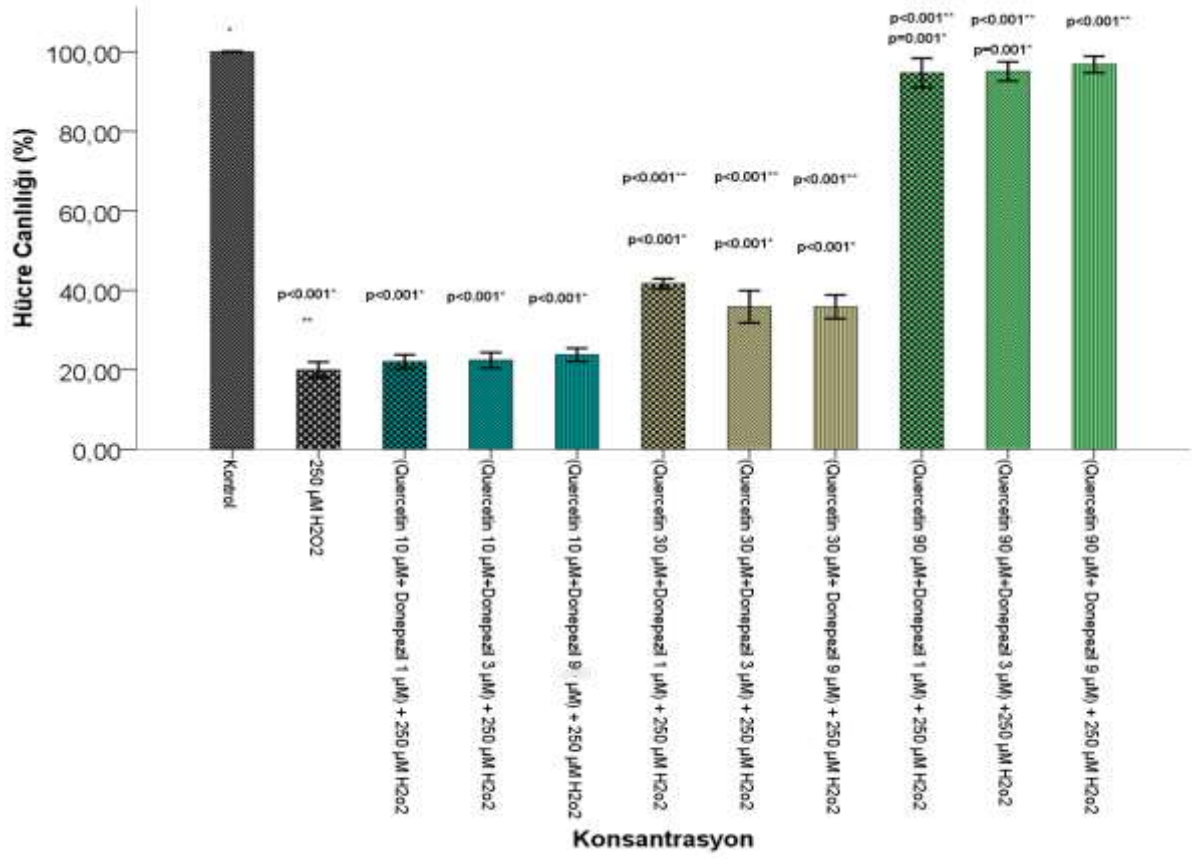
3.1.7. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi quercetin ile donepezilin birlikte uygulamasının etkisinin değerlendirilmesi

Quercetin ile donepezil, U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi birlikte farklı konsantrasyonlarda uygulandığında, hidrojen peroksitin oluşturduğu yaklaşık %80 hücre ölümünü istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttı ($p<0.001$) (Çizelge 3.7, Şekil 3.7).

Çizelge 3.7. Oksidatif hasar oluşum öncesi quercetin ile donepezilin birlikte uygulaması hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri

	Mean±SD	F	P
Kontrol	100,00±0,00	1676,917	P<0.001*
250 µM H₂O₂^a	19,95±1,99		
(Quercetin 10 µM+Donepezil 1 µM) + 250 µM H₂O₂^a	22,04±1,74		
(Quercetin 10 µM+Donepezil 3 µM) + 250 µM H₂O₂^a	22,40±1,95		
(Quercetin 10 µM+Donepezil 9 µM) + 250 µM H₂O₂^a	23,75±1,67		
(Quercetin 30 µM+Donepezil 1 µM) + 250 µM H₂O₂^{a, b}	41,66±1,24		
(Quercetin 30 µM+Donepezil 3 µM) + 250 µM H₂O₂^{a, b}	35,84±4,06		
(Quercetin 30 µM+Donepezil 9 µM) + 250 µM H₂O₂^{a, b}	35,84±2,97		
(Quercetin 90 µM+Donepezil 1 µM) + 250 µM H₂O₂^{a, b}	94,71±3,66		
(Quercetin 90 µM+Donepezil 3 µM) +250 µM H₂O₂^{a, b}	95,09±2,42		
(Quercetin 90 µM+Donepezil 9 µM) + 250 µM H₂O₂^{a, b}	96,82±2,09		

One Way Anova: Post-hoc; Tukey HSD Test, Dunnett Test; $\alpha:0.05$; *Konsantrasyon düzeyleri arasındaki farklılık anlamlı; ^aKontrol grubu ile farklılık anlamlı, ^b250 µM H₂O₂ grubu ile farklılık anlamlı



Şekil 3.7. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi quercetin ile donepezilin birlikte uygulamasının hücre canlılığına etkisi

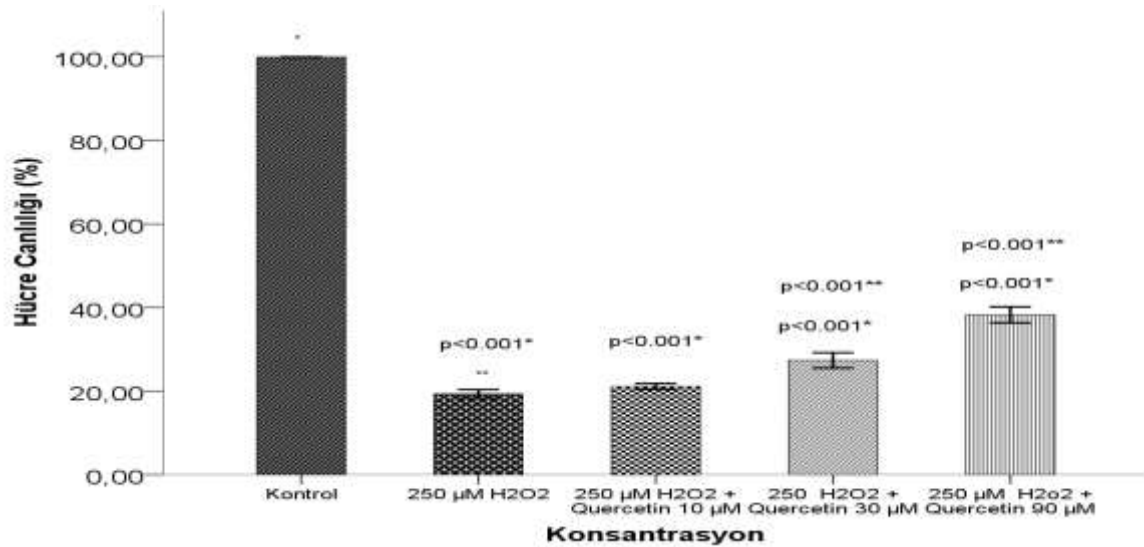
3.1.8. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu sonrası quercetin'in etkisinin değerlendirilmesi

Nöroprotektif ajan olarak kullanılan quercetin, U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum sonrası tek başına farklı konsantrasyonlarda uygulandığında, hidrojen peroksitin oluşturduğu yaklaşık %80 hücre ölümünü konsantrasyon bağımlı ve istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttı ($p<0.001$) (Çizelge 3.8, Şekil 3.8).

Çizelge 3.8. Oksidatif hasar oluşum sonrası quercetin'in hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri

	Mean±SD	F	P
Kontrol	100,00±0,00 ^{b,c,d,e}	5284,669	P<0.001*
250 µM H₂O₂	19,32±1,03 ^{d, e}		
250 µM H₂O₂+Quercetin 10 µM	21,11±0,70 ^{a, d,e}		
250 µM H₂O₂+Quercetin 30 µM	27,37±1,85 ^{a, b,c,e}		
250 µM H₂O₂ + Quercetin 90 µM	38,28±1,90 ^{a, b,c,d}		

Konsantrasyon: First: H₂O₂, Last: quercetin; One Way Anova: Post-hoc; Tukey HSD Test, Dunnett Test; $\alpha:0.05$; *Konsantrasyon düzeyleri arasındaki farklılık anlamlı; ^aKontrol grubu ile farklılık anlamlı, ^b 250 µM H₂O₂ grubu ile farklılık anlamlı; ^c 250 µM H₂O₂+Quercetin 10 µM grubu ile farklılık anlamlı; ^d 250 µM H₂O₂+Quercetin 30 µM grubu ile farklılık anlamlı; ^e 250 µM H₂O₂ + Quercetin 90 µM grubu ile farklılık anlamlı



Şekil 3.8. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu sonrası quercetin'in hücre canlılığına etkisi

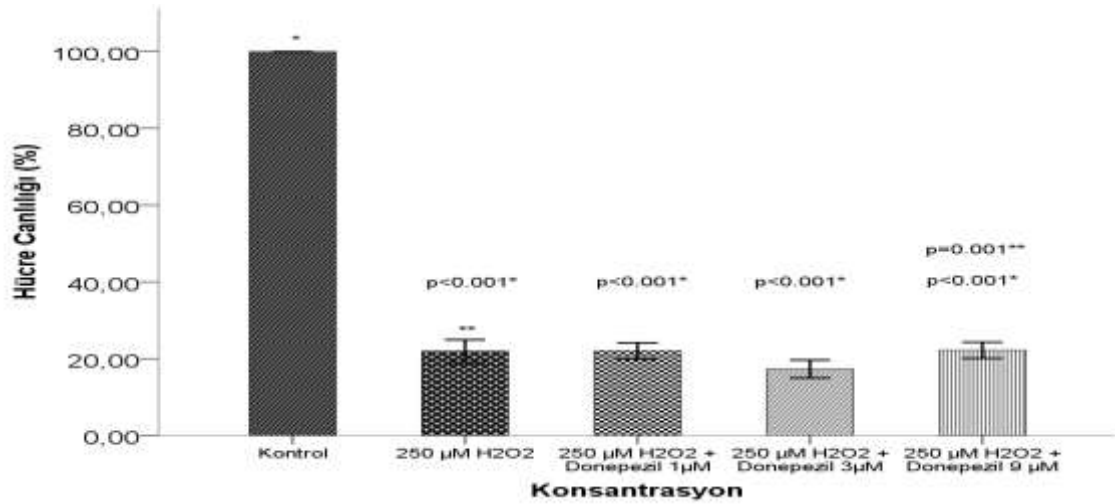
3.1.9. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu sonrası donepezilin etkisinin değerlendirilmesi

Asetilkolinesteraz inhibitörleri olarak kullanılan donepezil, U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum sonrası tek başına farklı konsantrasyonlarda uygulandığında, hidrojen peroksitin oluşturduğu yaklaşık %80 hücre ölümünü bütün uygulama konsantrasyonlarında engellemedi (Çizelge 3.9, Şekil 3.9).

Çizelge 3.9 Oksidatif hasar oluşumu sonrası donepezilin hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri

	Mean±SD	F	P
Kontrol	100,00±0,00 ^{b,c,d,e}	2158,638	P<0.001*
250 µM H₂O₂	21,93±2,99 ^{a, d}		
250 µM H₂O₂ + Donepezil 1µM	22,02±2,13 ^{a, d}		
250 µM H₂O₂ + Donepezil 3µM	17,30±2,34 ^{a, b,c,e}		
250 µM H₂O₂ + Donepezil 9 µM	22,19±2,09 ^{a,d}		

Konsantrasyon: First: H₂O₂, Last: quercetin; One Way Anova: Post-hoc; Tukey HSD Test; Dunnett Test; α :0.05; *Konsantrasyon düzeyleri arasındaki farklılık anlamlı; ^aKontrol grubu ile farklılık anlamlı; ^b 250 µM H₂O₂ grubu ile farklılık anlamlı; ^c 250 µM H₂O₂ + Donepezil 1µM grubu ile farklılık anlamlı; ^d 250 µM H₂O₂ + Donepezil 3µM grubu ile farklılık anlamlı; ^e 250 µM H₂O₂ + Donepezil 9 µM grubu ile farklılık anlamlı



Şekil 3.9. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu sonrası donepezilin hücre canlılığına etkisi

3.1.10. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum sonrası quercetin ile donepezilin birlikte etkisinin değerlendirilmesi

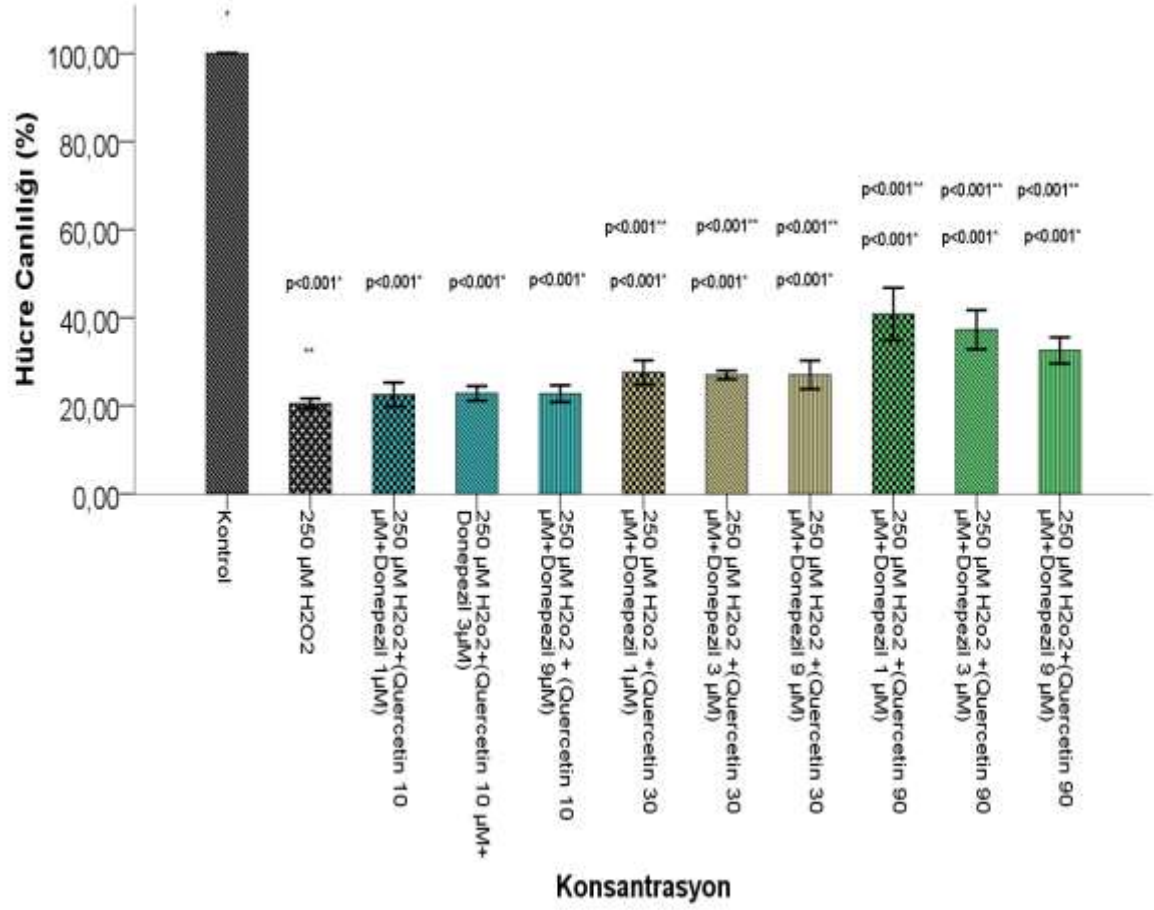
Quercetin ile donepezil, U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum sonrası birlikte farklı konsantrasyonlarda uygulandığında, hidrojen peroksidin oluşturduğu yaklaşık %80 hücre ölümünü istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttı ($p<0.001$) (Çizelge 3.10, Şekil 3.10).

Çizelge 3.10 Oksidatif hasar oluşum sonra quercetin ile donepezilin birlikte uygulamasının hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri

	Mean±SD	F	P
Kontrol	100,00±0,00	1676,917	P<0.001*
250 µM H₂O₂^a	19,95±1,99		
250 µM H₂O₂+(Quercetin 10 µM+Donepezil1 µM)	22,04±1,74		
250 µM H₂O₂+(Quercetin 10 µM Donepezil 3 µM)	22,40±1,95		
250 µM H₂O₂+(Quercetin 10 µM Donepezil 90 µM)	23,75±1,67		
250 µM H₂O₂+(Quercetin 30 µM Donepezil 1 µM)	41,66±1,24		
250 µM H₂O₂+(Quercetin 30 µM Donepezil 3 µM)	35,84±4,06		
250 µM H₂O₂+(Quercetin 30 µM Donepezil 9 µM)	35,84±2,97		
250 µM H₂O₂+(Quercetin 90 µM Donepezil 1 µM)	94,71±3,66		
250 µM H₂O₂+(Quercetin 90 µM Donepezil 3 µM)	95,09±2,42		
250 µM H₂O₂+(Quercetin 90 µM Donepezil 9 µM)	96,82±2,09		

One Way Anova: Post-hoc; Tukey HSD Test, Dunnett Test; $\alpha:0.05$; *Konsantrasyon düzeyleri arasındaki farklılık anlamlı;

^aKontrol grubu ile farklılık anlamlı, ^b250 µM H₂O₂ grubu ile farklılık anlamlı



Şekil 3.10. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum sonrası quercetin ile donepezilin birlikte uygulaması hücre canlılığına etkisi

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında asetilkolinesteraz inhibitörü donepezilin, U-118 MG glioblastoma hücre hattında oksidatif hasar oluşturulmadan ve oluşturduktan sonra tek başına ve nöroprotektif özelliği olan quercetin ile birlikte kullanılmasının hücre canlılığı üzerine olan olumlu veya olumsuz etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmadan elde ettiğimiz bulgular; Asetilkolinesteraz inhibitörleri olarak kullanılan donepezil, U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşturulmadan ve oluşturduktan sonra tek başına farklı konsantrasyon uygulandığında, hücre canlılığı üzerine olumlu veya olumsuz bir etki oluşturmamıştır. Ama donepezil ile quercetin birlikte farklı konsantrasyonlarda oksidatif hasar oluşturulmadan ve oluşturduktan sonra uygulandıklarında, hücre canlılığı üzerine istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olumlu etkiler oluşturmıştır.

Quercetin'in yapılan çeşitli *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarda oksidatif stresi ve nöroinflamasyonu azaltarak nöronal hücreleri koruduğu gösterilmiştir (Dong ve ark., 2014; Costa ve ark., 2016). Ayrıca quercetin'in transgenik Alzheimer hastası farelerde bilişsel ve duygusal işlevleri koruduğu gösterilmiştir (Sabogal-Guáqueta ve ark., 2015). Kortikal hücrede glutamat ile oksidatif hasar oluşturmamadan önce quercetin 25 ile 50 μ M konsantrasyonlarda uygulandığında nöroprotektif etki oluşturduğu gösterilirken, 100 μ M'ları aşan konsantrasyonlarda toksik olduğun rapor edilmiştir (Jakubowicz-Gil ve ark., 2008).

Titanyum dioksit nanopartiküllerine karşı quercetin'in koruyucu etkisinin değerlendirildiği çalışmada, quercetin'in ön tedavi olarak uygulanmasının testis dokusundaki oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (Khorsandi ve ark.,2017).

P19 nöron hücrelerine 24 saat boyunca quercetin 3–150 μ M konsantrasyonlarda uygulamış ve sonra hücreler 24 saat boyunca 1.5 mM H₂O₂ maruz bırakılmış ve quercetin'in hücrelerin canlılığını koruduğu ve hücrelerin apoptoza gitmesini engellediği gösterilmiştir (Jazvinščak Jembrek ve ark.,2012).

PC12 hücrelerine 1, 10, 20, 50, 100 μ M quercetin 24 ve 48 saat uygulandıktan sonra hücreler 24 saat boyunca 6-hidroksidopamine (6-OHDA) maruz bırakılmış ve hücre canlılıkları incelendiğinde 6-OHDA ile beraber quercetin verilen gruplarda 6-OHDA verilen gruba göre daha yüksek hücre canlılığı saptanmıştır (Wang ve ark.,2021). Bu tez çalışmamızda gösterdiğimiz, quercetin'in U-118 MG hücrelerinde hidrojen peroksit ile

oksidatif hasar oluşturmada önce 10, 30 ve 90 µM konsantrasyonlarda uygulandığında gösterdiği hücre canlılığı üzerine olan olumlu etkileri, yukardaki çalışma sonuçları ile uyumlu gözükmemektedir.

Donepezil, Alzheimer hastalığının tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kolinesteraz inhibitörüdür. Donepezil, semptomatik bir tedavi olarak kolinerjik sistem üzerinde etki gösterir ve Alzheimer hastalığının ilerleme hızını azaltabilir. Donepezil asetilkolinesteraz inhibisyonu yaparak beyindeki kolinerjik reseptörlerin daha yüksek uyarılmasına neden olan sinaptik aralıktaki asetilkolin (ACh) seviyesini artırır (Racchi ve ark.,2004; Kim ve ark., 2017; Baakman ve ark.,2019).

Neuroblastoma (SH-SY5Y) hücre hattında okadaik asit ile oluşturulan oksidatif hasara karşı donepezil düşük konsantrasyonlarda maksimum nöroprotektif etki gösterirken yüksek konsantrasyonlarda ise nöroprotektif etki azalmıştır. Donepezil oluşturduğu nöroprotektif etki kolinesterazı inhibe ettiği mekanizma ile doğrudan ilişkili görünmemektedir (Arias ve ark.,2005).

Kortikal nöron hücrelerinde donepezil 1-10 µM konsantrasyonlarda, glutamat ile oluşturulan oksidatif stres hasarında nöroprotektif etki göstermiştir (Takada ve ark.,2003; Noh ve ark., 2013).

Bu tez çalışmamızda elde ettiğimiz, donepezilin U-118 MG hücrelerinde hidrojen peroksit ile oksidatif hasar öncesi ve hasar sonrası 1,3 ve 9 µM konsantrasyonlarda uygulandığında hücre canlılığı üzerine olumlu veya olumsuz etki oluşturmaması yukardaki çalışmalarla uyumlu görünmemektedir. Donepezilin nöroprotektif etkilerinin çalışmalar arasındaki değişiklikleri kullanılan doz aralığına ve hücre hattı farklılıklarına bağlı olabilir.

Bu tez çalışması ile donepezilin tek başına *in-vitro* şartlarda nöroprotektif etki oluşturmadağı ama quercetin ile birlikte uygulandığında, konsantrasyon bağımlı nöroprotektif etki oluşturduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu elde edilen *in-vitro* sonuçlar donepezil ve quercetin kombinasyonunun nörodejeneratif hayvan modellerinde denenmesi için yeterli görünmemektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bulgularımıza göre *in-vitro* şartlar altında donepezilin, quercetin ile birlikte kullanılmasının oksidatif stresin neden olduğu hücresel hasara karşı koruyucu olduğu, donepezilin klinik olarak tek başına kullanılmasının yararına göre quercetin ile birlikte kullanılmasının Alzheimer gibi nörodejenaratif hastalıklarda daha etkili sonuçları olabileceği kanatine varılmıştır.

Çalışmamızdan çıkarılabilecek sonuçlar;

- Quercetin diyet takviyesi olarak kullanıldığı için quercetin n rodejenatif hastalıkların önlenmesi ve ilerlemesine karşı bir potansiyeli olduğunu düşünmekteyiz. Quercetin kan beyin bariyerinden geçişinin geliştirilmesi sağlanırsa, nörodejenaratif hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek bir ilaç adayı olabilir. Yaptığımız bu tez çalışması, quercetin moleküler ve farmakolojik özelliklerini gelettirmek için daha fazla klinik öncesi ve klinik çalışmaların yapılmasına ışık tutabilir.
- Donepezilin, quercetin ile birlikte deneysel kullanılması, oksidatif stres kaynaklı hücresel hasara karşı g    nöroprotektif etkiler göstermesine neden olmuştur. Elde edilen *in-vitro* sonuçlar donepezil ve quercetin kombinasyonun nörodejeneratif hayvan modellerinde denenmesi için yeterli görünmektedir.

KAYNAKLAR

- Ader, P., Wessmann, A., & Wolffram, S. (2000). Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(7), 1056-1067.
- Ahmed, T., Zahid, S., Mahboob, A., & Mehpara Farhat, S. (2017). Cholinergic system and post-translational modifications: an insight on the role in Alzheimer's disease. *Current neuropharmacology*, 15(4), 480-494.
- Akaike, A. (2006). Preclinical evidence of neuroprotection by cholinesterase inhibitors. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, 20, S8-S11.
- Akan, Z., & Garip, A. I. (2013). Antioxidants may protect cancer cells from apoptosis signals and enhance cell viability. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(8), 4611-4614.
- Akasofu, S., Kimura, M., Kosasa, T., Sawada, K., & Ogura, H. (2008). Study of neuroprotection of donepezil, a therapy for Alzheimer's disease. *Chemico-biological interactions*, 175(1-3), 222-226.
- Akasofu, S., Kosasa, T., Kimura, M., Kubota, A. (2003). Protective effect of donepezil in a primary culture of rat cortical neurons exposed to oxygenglucose deprivation. *European journal of pharmacology*, 472 (1-2), 57-63.
- Aliev, G., Obrenovich, M. E., Reddy, V. P., Shenk, J. C., Moreira, P. I., Nunomura, A., ... & Perry, G. (2008). Antioxidant therapy in Alzheimer's disease: theory and practice. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 8(13), 1395.
- Alok, S.; Jain, S.K.; Verma, A.; Kumar, M.; Mahor, A.; Sabharwal, M. Herbal antioxidant in clinical practice: A review. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2014, 4, 78–84.
- Altın, A., Atalay, H., & Bilal, T. (2017). Bir antioksidan olarak E vitamini. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 6(3), 149-157.
- Andres, S., Pevny, S., Ziegenhagen, R., Bakhiya, N., Schäfer, B., Hirsch-Ernst, K. I., & Lampen, A. (2018). Safety aspects of the use of quercetin as a dietary supplement. *Molecular nutrition & food research*, 62(1), 1700447.
- Ansari, M. A., Abdul, H. M., Joshi, G., Opii, W. O., & Butterfield, D. A. (2009). Protective effect of quercetin in primary neurons against A β (1–42): relevance to Alzheimer's disease. *The Journal of nutritional biochemistry*, 20(4), 269-275.
- Arias E, Gallego-Sandín S, VillarroyaM, García AG, LópezMG (2005). Unequal neuroprotection afforded by the acetylcholinesterase inhibitors galantamine, donepezil, and rivastigmine in SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 1346–1353.
- Arredondo, F., Echeverry, C., Abin-Carriquiry, J. A., Blasina, F., Antúnez, K., Jones, D. P., ... & Dajas, F. (2010). After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(5), 738-747.

- Askari, G., Ghiasvand, R., Feizi, A., Ghanadian, S. M., & Karimian, J. (2012). The effect of quercetin supplementation on selected markers of inflammation and oxidative stress. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 17(7), 637.
- Aslankoç R, Demirci D, İnan Ü, Yıldız M, Öztürk A, Çetin M, Savran EŞ, Yılmaz B. The Role Of Antioxidant Enzymes İn Oxidative Stress - Superoxide Dismutase (Sod), Catalase (Cat) And Glutathione Peroxidase (Gpx). *Med J SDU* 2019; 26(3): 362-369.
- Athiroh, N., Permatasari, N., Sargowo, D., & Widodo, M. A. (2014). Antioxidative and blood pressure-lowering effects of *Scurrula atropurpurea* on deoxycorticosterone acetate–salt hypertensive rats. *Biomarkers and Genomic Medicine*, 6(1), 32-36.
- Atri, A. (2019, April). Current and future treatments in Alzheimer's disease. In *Seminars in neurology* (Vol. 39, No. 02, pp. 227-240). Thieme Medical Publishers.
- Aydemir, B., & SARI, E. K. (2009). Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 2(2), 56-60.
- Baakman, A. C., Alvarez-Jimenez, R., Loewen, G., de Kam, M. L., Broekhuizen, K., Hilt, D. C., & Groeneveld, G. J. (2019). No synergistic effect of subtherapeutic doses of donepezil and EVP-6124 in healthy elderly subjects in a scopolamine challenge model. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 5, 89-98.
- Baradaran, A., Nasri, H., & Rafieian-Kopaei, M. (2014). Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 19(4), 358.
- Barcelos, G. R. M., Grotto, D., Serpeloni, J. M., Angeli, J. P. F., Rocha, B. A., de Oliveira Souza, V. C., ... & Knasmüller, S. (2011). Protective properties of quercetin against DNA damage and oxidative stress induced by methylmercury in rats. *Archives of toxicology*, 85(9), 1151-1157.
- Bavithra, S., Selvakumar, K., Kumari, R. P., Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P., & Arunakaran, J. (2012). Polychlorinated biphenyl (PCBs)-induced oxidative stress plays a critical role on cerebellar dopaminergic receptor expression: ameliorative role of quercetin. *Neurotoxicity research*, 21(2), 149-159.
- Baysal, İ. (2015). Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılmak Üzere Donepezil Yüklü Plga-B-Peg Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Beyne Hedeflendirilmesi.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World allergy organization journal*, 5(1), 9-19.
- Bordier, P., Garrigue, S., Lanusse, S., Margaine, J., Robert, F., Gencel, L., & Lafitte, A. (2006). Cardiovascular effects and risk of syncope related to donepezil in patients with Alzheimer's disease. *CNS drugs*, 20(5), 411-417.
- Bouaziz, A. (2018). Screening of the antioxidant and hypotensive activities of some medicinal plants in relation to their polyphenolic contents (Doctoral dissertation).

- Braillon, A. (2019). Practice guideline update summary: Mild cognitive impairment: Report of the guideline development, dissemination, and implementation subcommittee of the American Academy of Neurology.
- Cai, X., Fang, Z., Dou, J., Yu, A., & Zhai, G. (2013). Bioavailability of quercetin: problems and promises. *Current medicinal chemistry*, 20(20), 2572-2582.
- Calabró, V., Litterio, M. C., Fraga, C. G., Galleano, M., & Piotrkowski, B. (2018). Effects of quercetin on heart nitric oxide metabolism in l-NAME treated rats. *Archives of biochemistry and biophysics*, 647, 47-53.
- Cankurtaran, M. (2005). Yaşlılık, yaşlanma mekanizmaları, antiaging ve yaşam tarzı değişiklikleri. 7. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi. Antalya.
- Caruana, M., Cauchi, R., & Vassallo, N. (2016). Putative role of red wine polyphenols against brain pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Frontiers in nutrition*, 3, 31.
- Chen, Tzu-Ying, "Brain Bioavailability Of Polyphenols: Implications For Delivery Of Brain Health Benefits" (2013). Open Access Dissertations. 194.
- Chen, Y. W., Chou, H. C., Lin, S. T., Chen, Y. H., Chang, Y. J., Chen, L., & Chan, H. L. (2013). Cardioprotective effects of quercetin in cardiomyocyte under ischemia/reperfusion injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Coles, L. S. (2000). Quercetin: a review of clinical applications. *Natural medicine Online*.
- Costa, L. G., Garrick, J. M., Roquè, P. J., & Pellacani, C. (2016). Mechanisms of neuroprotection by quercetin: counteracting oxidative stress and more. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Costanzo, P., Cariati, L., Desiderio, D., Sgammato, R., Lamberti, A., Arcone, R., ... & Oliverio, M. (2016). Design, synthesis, and evaluation of donepezil-like compounds as AChE and BACE-1 inhibitors. *ACS medicinal chemistry letters*, 7(5), 470-475.
- Cruz-Correa, M., Shoskes, D. A., Sanchez, P., Zhao, R., Hylind, L. M., Wexner, S. D., & Giardiello, F. M. (2006). Combination treatment with curcumin and quercetin of adenomas in familial adenomatous polyposis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 4(8), 1035-1038.
- Dal Belo, C. A., Lucho, A. P. D. B., Vinadé, L., Rocha, L., Seibert França, H., Marangoni, S., & Rodrigues-Simioni, L. (2013). In vitro antiophidian mechanisms of *Hypericum brasiliense* choisy standardized extract: quercetin-dependent neuroprotection. *BioMed research international*, 2013.
- Das, S., Mandal, A. K., Ghosh, A., Panda, S., Das, N., & Sarkar, S. (2008). Nanoparticulated quercetin in combating age related cerebral oxidative injury. *Current aging science*, 1(3), 169-174.
- David, A.V.A., Arulmoli, R., & Parasuraman, S. (2016). Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacognosy reviews*, 10(20), 84.

- David, A.V.A.; Arulmoli, R.; Parasuraman, S. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacogn. Rev.* 2016, 10, 84.
- Davinelli, S., Sapere, N., Zella, D., Bracale, R., Intrieri, M., & Scapagnini, G. (2012). Pleiotropic protective effects of phytochemicals in Alzheimer's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012.
- Davis, J. M., Murphy, E. A., & Carmichael, M. D. (2009). Effects of the dietary flavonoid quercetin upon performance and health. *Current sports medicine reports*, 8(4), 206-213.
- Davis, J.M.; Murphy, E.A.; Carmichael, M.D. Effects of the dietary flavonoid quercetin upon performance and health. *Curr. Sports Med. Rep.* 2009, 8, 206–213.
- Dawkins, E., & Small, D. H. (2014). Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 129(5), 756-769.
- Day, A. J., Mellon, F., Barron, D., Sarrazin, G., Morgan, M. R., & Williamson, G. (2001). Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free radical research*, 35(6), 941-952.
- de Lira Mota, K. S., Dias, G. E. N., Pinto, M. E. F., Luiz-Ferreira, Â., Monteiro Souza-Brito, A. R., Hiruma-Lima, C. A., ... & Batista, L. M. (2009). Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules*, 14(3), 979-1012.
- Delibaş, N., & Özçankaya, R. (1995). Serbest radikaller. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 2(3).
- Dinc, E., Ayaz, L., & Kurt, A. H. (2017). Protective effect of combined caffeic acid phenethyl ester and bevacizumab against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human RPE cells. *Current eye research*, 42(12), 1659-1666.
- Dong, H., Yuede, C. M., Coughlan, C. A., Murphy, K. M., & Csernansky, J. G. (2009). Effects of donepezil on amyloid- β and synapse density in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Brain research*, 1303, 169-178.
- Dong, Y. S., Wang, J. L., Feng, D. Y., Qin, H. Z., Wen, H., Yin, Z. M., ... & Li, C. (2014). Protective effect of quercetin against oxidative stress and brain edema in an experimental rat model of subarachnoid hemorrhage. *International journal of medical sciences*, 11(3), 282.
- Doody, R. S., Ferris, S. H., Salloway, S., Sun, Y., Goldman, R., Watkins, W. E., ... & Murthy, A. K. (2009). Donepezil treatment of patients with MCI: a 48-week randomized, placebo-controlled trial. *Neurology*, 72(18), 1555-1561.
- Dubois, B., Chupin, M., Hampel, H., Lista, S., Cavado, E., Croisile, B., ... & Ait Ameur, A. (2015). Donepezil decreases annual rate of hippocampal atrophy in suspected prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 11(9), 1041-1049.
- Easton, A., Sankaranarayanan, S., Tanghe, A., Terwel, D., Lin, A. X., Hoque, N., ... & Bristow, L. (2013). Effects of sub-chronic donepezil on brain A β and cognition in a mouse model of Alzheimer's disease. *Psychopharmacology*, 230(2), 279-289.

- El-Horany, H. E., El-latif, R. N. A., ElBatsh, M. M., & Emam, M. N. (2016). Ameliorative effect of quercetin on neurochemical and behavioral deficits in rotenone rat model of Parkinson's disease: modulating autophagy (quercetin on experimental Parkinson's disease). *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 30(7), 360-369.
- Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*, 37(4), 277-285.
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 38(12), 1103-1111.
- Ergin, M. 2015. Toplam Antioksidan Kapasiteyi Ölçen Yöntemlerin Karşılaştırılması. Doktora Tezi. Atatürk Eğitim vVe Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Bölümü Uzmanlık Tezi. Ankara.
- Farhadi, F., Khameneh, B., Iranshahi, M., & Iranshahy, M. (2019). Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. *Phytotherapy research*, 33(1), 13-40.
- Farina, F., Lambert, E., Commeau, L., Lejeune, F. X., Roudier, N., Fonte, C., ... & Neri, C. (2017). The stress response factor daf-16/FOXO is required for multiple compound families to prolong the function of neurons with Huntington's disease. *Scientific reports*, 7(1), 1-15.
- Farina, N., Rusted, J., & Tabet, N. (2014). The effect of exercise interventions on cognitive outcome in Alzheimer's disease: a systematic review. *International Psychogeriatrics*, 26(1), 9-18.
- Feldman, H., Gauthier, S., Hecker, J., Vellas, B., Subbiah, P., & Whalen, E. (2001). A 24-week, randomized, double-blind study of donepezil in moderate to severe Alzheimer's disease. *Neurology*, 57(4), 613-620.
- Figueira, I., Menezes, R., Macedo, D., Costa, I., & Nunes dos Santos, C. (2017). Polyphenols beyond barriers: a glimpse into the brain. *Current neuropharmacology*, 15(4), 562-594.
- Fisher, G. G., Stachowski, A., Infurna, F. J., Faul, J. D., Grosch, J., & Tetrick, L. E. (2014). Mental work demands, retirement, and longitudinal trajectories of cognitive functioning. *Journal of occupational health psychology*, 19(2), 231.
- Frank-Cannon, T. C., Alto, L. T., McAlpine, F. E., & Tansey, M. G. (2009). Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases?. *Molecular neurodegeneration*, 4(1), 47.
- Fusi, F., Trezza, A., Tramaglino, M., Sgaragli, G., Saponara, S., & Spiga, O. (2020). The beneficial health effects of flavonoids on the cardiovascular system: focus on K⁺ channels. *Pharmacological Research*, 104625.
- Gan, L., & Johnson, J. A. (2014). Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(8), 1208-1218.

- Gansukh, E., Nile, A., Kim, D. H., Oh, J. W., & Nile, S. H. (2021). New insights into antiviral and cytotoxic potential of quercetin and its derivatives—a biochemical perspective. *Food chemistry*, 334, 127508.
- García-Escudero, V., Martín-Maestro, P., Perry, G., & Avila, J. (2013). Deconstructing mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.
- García-Mediavilla, V., Crespo, I., Collado, P. S., Esteller, A., Sánchez-Campos, S., Tuñón, M. J., & González-Gallego, J. (2007). The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *European journal of pharmacology*, 557(2-3), 221-229.
- Gibellini, L., Pinti, M., Nasi, M., Montagna, J. P., De Biasi, S., Roat, E., ... & Cossarizza, A. (2011). Quercetin and cancer chemoprevention. Evidence-based complementary and alternative medicine, 2011.
- Gill, S. S., Anjum, N. A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D. K., Ahmad, I., ... & Tuteja, N. (2013). Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70, 204-212.
- Goñi, F., Herline, K., Peyser, D., Wong, K., Ji, Y., Sun, Y., ... & Wisniewski, T. (2013). Immunomodulation targeting of both A β and tau pathological conformers ameliorates Alzheimer's disease pathology in TgSwDI and 3xTg mouse models. *Journal of neuroinflammation*, 10(1), 914.
- González-Sarriás, A., Núñez-Sánchez, M. A., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2017). Neuroprotective effects of bioavailable polyphenol-derived metabolites against oxidative stress-induced cytotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(4), 752-758.
- Groot, C., Hooghiemstra, A. M., Raijmakers, P. G. H. M., Van Berckel, B. N. M., Scheltens, P., Scherder, E. J. A., ... & Ossenkoppele, R. (2016). The effect of physical activity on cognitive function in patients with dementia: a meta-analysis of randomized control trials. *Ageing research reviews*, 25, 13-23.
- Guardia, T., Rotelli, A. E., Juarez, A. O., & Pelzer, L. E. (2001). Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il farmaco*, 56(9), 683-687.
- Gugnani, K. S., Vu, N., Rondón-Ortiz, A. N., Böhlke, M., Maher, T. J., & Pino-Figueroa, A. J. (2018). Neuroprotective activity of macamides on manganese-induced mitochondrial disruption in U-87 MG glioblastoma cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 340, 67-76.
- Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical chemistry*, 41(12), 1819-1828.
- Halliwell B. 1999. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.* 31(4), 261-272.

- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1989). Production of hydroxyl radicals in living systems. *Free Radicals Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford, 31.
- Han, M., Song, Y., & Zhang, X. (2016). Quercetin suppresses the migration and invasion in human colon cancer Caco-2 cells through regulating toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B pathway. *Pharmacognosy magazine*, 12(Suppl 2), S237.
- Hashemzaei, M. (2017). Delarami Far A, Yari A, Heravi RE, Tabrizian K, Taghdisi SM, Sadegh SE, Tsarouhas K, Kouretas D, Tzanakakis G, et al. Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. *Oncol Rep*, 38, 819-828.
- Hashimoto, M., Kazui, H., Matsumoto, K., Nakano, Y., Yasuda, M., & Mori, E. (2005). Does donepezil treatment slow the progression of hippocampal atrophy in patients with Alzheimer's disease. *American Journal of Psychiatry*, 162(4), 676-682.
- Hatori, Y., Kubo, T., Sato, Y., Inouye, S., Akagi, R., & Seyama, T. (2020). Visualization of the Redox Status of Cytosolic Glutathione Using the Organelle-and Cytoskeleton-Targeted Redox Sensors. *Antioxidants*, 9(2), 129.
- Hayakawa, M., Itoh, M., Ohta, K., Li, S., Ueda, M., Wang, M. X., ... & Kobori, M. (2015). Quercetin reduces eIF2 α phosphorylation by GADD34 induction. *Neurobiology of Aging*, 36(9), 2509-2518.
- Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., ... & Herrup, K. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14(4), 388-405.
- Heo, H. J., & Lee, C. Y. (2004). Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25), 7514-7517.
- Ho, L., Ferruzzi, M. G., Janle, E. M., Wang, J., Gong, B., Chen, T. Y., ... & Percival, S. S. (2013). Identification of brain-targeted bioactive dietary quercetin-3-O-glucuronide as a novel intervention for Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*, 27(2), 769-781.
- Hou, Y., Aboukhatwa, M. A., Lei, D. L., Manaye, K., Khan, I., & Luo, Y. (2010). Anti-depressant natural flavonols modulate BDNF and beta amyloid in neurons and hippocampus of double TgAD mice. *Neuropharmacology*, 58(6), 911-920.
- Hu, P., Wang, M., Chen, W. H., Liu, J., Chen, L., Yin, S. T., ... & Ruan, D. Y. (2008). Quercetin relieves chronic lead exposure-induced impairment of synaptic plasticity in rat dentate gyrus in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 378(1), 43-51.
- Ishige, K., Schubert, D., & Sagara, Y. (2001). Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(4), 433-446.
- Ishisaka, A., Ichikawa, S., Sakakibara, H., Piskula, M. K., Nakamura, T., Kato, Y., ... & Terao, J. (2011). Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(7), 1329-1336.

- Jacobson, S. A., & Sabbagh, M. N. (2008). Donepezil: potential neuroprotective and disease-modifying effects. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 4(10), 1363-1369.
- Jakubowicz-Gil, J., Rzeski, W., Zdzisinska, B., Dobrowolski, P., & Gawron, A. (2008). Cell death and neuronal arborization upon quercetin treatment in rat neurons. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 68(2), 139.
- Janeiro, P., & Brett, A. M. O. (2004). Catechin electrochemical oxidation mechanisms. *Analytica chimica acta*, 518(1-2), 109-115.
- Jantan, I., Ahmad, W., & Bukhari, S. N. A. (2015). Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials. *Frontiers in plant science*, 6, 655.
- Jantas, D., Malarz, J., Le, T. N., & Stojakowska, A. (2021). Neuroprotective properties of kempferol derivatives from *Maesa membranacea* against oxidative stress-induced cell damage: An association with cathepsin D inhibition and PI3K/Akt activation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10363.
- Jazvinščak Jembrek, M., Vuković, L., Puhović, J., Erhardt, J., & Oršolić, N. (2012). Neuroprotective effect of quercetin against hydrogen peroxide-induced oxidative injury in P19 neurons. *Journal of molecular neuroscience*, 47(2), 286-299.
- Jiménez-Aliaga, K., Bermejo-Bescós, P., Benedí, J., & Martín-Aragón, S. (2011). Quercetin and rutin exhibit antiamyloidogenic and fibril-disaggregating effects in vitro and potent antioxidant activity in APP^{sw} cells. *Life sciences*, 89(25-26), 939-945.
- Kalyanaraman, B. (2013). Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox biology*, 1(1), 244-257.
- Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016). Serbest radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1).
- Katerji, M., Filippova, M., & Duerksen-Hughes, P. (2019). Approaches and methods to measure oxidative stress in clinical samples: Research applications in the cancer field. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.
- Kawai, Y., Nishikawa, T., Shiba, Y., Saito, S., Murota, K., Shibata, N., ... & Terao, J. (2008). Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 9424-9434.
- Kaynar, M. Y., Sanus, G. Z., Hnimoglu, H., Kacira, T., Kemerdere, R., Atukeren, P., ... & Tanriverdi, T. (2008). Expression of hypoxia inducible factor-1 α in tumors of patients with glioblastoma multiforme and transitional meningioma. *Journal of Clinical Neuroscience*, 15(9), 1036-1042.
- Kennedy, M. A., Moffat, T. C., Gable, K., Ganesan, S., Niewola-Staszewska, K., Johnston, A., ... & Zarembek, V. (2016). A signaling lipid associated with Alzheimer's disease promotes mitochondrial dysfunction. *Scientific reports*, 6, 19332.

- Khan, H., Ullah, H., Aschner, M., Cheang, W. S., & Akkol, E. K. (2020). Neuroprotective Effects of Quercetin in Alzheimer's Disease. *Biomolecules*, 10(1), 59
- Khan, M. T. H., Orhan, I., Şenol, F. S., Kartal, M., Şener, B., Dvorská, M., ... & Šlapetová, T. (2009). Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chemico-Biological Interactions*, 181(3), 383-389.
- Khorsandi, L., Orazizadeh, M., Moradi-Gharibvand, N., Hemadi, M., & Mansouri, E. (2017). Beneficial effects of quercetin on titanium dioxide nanoparticles induced spermatogenesis defects in mice. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(6), 5595-5606.
- Kim, H., Park, B. S., Lee, K. G., Choi, C. Y., Jang, S. S., Kim, Y. H., & Lee, S. E. (2005). Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of β -amyloid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(22), 8537-8541.
- Kim, S. H., Kandiah, N., Hsu, J. L., Suthisisang, C., Udommongkol, C., & Dash, A. (2017). Beyond symptomatic effects: potential of donepezil as a neuroprotective agent and disease modifier in Alzheimer's disease. *British journal of pharmacology*, 174(23), 4224-4232.
- Kimura, M., Akasofu, S., Ogura, H., & Sawada, K. (2005). Protective effect of donepezil against A β (1-40) neurotoxicity in rat septal neurons. *Brain research*, 1047(1), 72-84.
- Kolaç, T., Gürbüz, P., & Yetiş, G. (2017). Doğal ürünlerin fenolik içeriği ve antioksidan özellikleri. *İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi*, 5(1), 26-42.
- Kumar, S. (2014). The importance of antioxidant and their role in pharmaceutical science-a review. *Asian journal of research in chemistry and pharmaceutical sciences*, 1(1), 27-44.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Lakroun, Z., Kebieche, M., Lahouel, A., Zama, D., Desor, F., & Soulimani, R. (2015). Oxidative stress and brain mitochondria swelling induced by endosulfan and protective role of quercetin in rat. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(10), 7776-7781.
- Lamson, D. W., & Brignall, M. S. (2000). Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*, 5(3), 196-208.
- Lavie, L. (2015). Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia—revisited—the bad ugly and good: implications to the heart and brain. *Sleep medicine reviews*, 20, 27-45.
- Lesjak, M., Beara, I., Simin, N., Pintać, D., Majkić, T., Bekvalac, K., ... & Mimica-Dukić, N. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *Journal of Functional Foods*, 40, 68-75.

- Li, N., Sun, C., Zhou, B., Xing, H., Ma, D., Chen, G., & Weng, D. (2014). Low concentration of quercetin antagonizes the cytotoxic effects of anti-neoplastic drugs in ovarian cancer. *PLoS One*, 9(7).
- Li, X., Wang, H., Gao, Y., Li, L., Tang, C., Wen, G., ... & Fan, Y. (2016). Quercetin induces mitochondrial biogenesis in experimental traumatic brain injury via the PGC-1 α signaling pathway. *American journal of translational research*, 8(8), 3558.
- Lv, C., Hong, T., Yang, Z., Zhang, Y., Wang, L., Dong, M., ... & Meng, Y. (2012). Effect of quercetin in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced mouse model of Parkinson's disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- Magalingam, K. B., Radhakrishnan, A., Ramdas, P., & Haleagrahara, N. (2015). Quercetin glycosides induced neuroprotection by changes in the gene expression in a cellular model of Parkinson's disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, 55(3), 609-617.
- Mahalingam, V., Vijayabaskar, S., Kalaivani, R. A., & Somanathan, T. (2017). Analytical method development and validation for the analysis of donepezil hydrochloride and its related substances using ultra performance liquid chromatography. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 10(8), 2743-2749.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
- Massoud, F., & Gauthier, S. (2010). Update on the pharmacological treatment of Alzheimer's disease. *Current neuropharmacology*, 8(1), 69-80.
- Mazen S. 2016. Ğnsan Safen Veninde Hidrojen Peroksit ile Oluğturulan Oksidatif Stres ve Doksisisiklinin Vasküler Yanıtlar Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. izmir.
- Md, S., Ali, M., Ali, R., Bhatnagar, A., Baboota, S., & Ali, J. (2014). Donepezil nanosuspension intended for nose to brain targeting: in vitro and in vivo safety evaluation. *International journal of biological macromolecules*, 67, 418-425.
- Menke, A., Casagrande, S., Geiss, L., & Cowie, C. C. (2015). Prevalence of and trends in diabetes among adults in the United States, 1988-2012. *Jama*, 314(10), 1021-1029.
- Mešćić Macan, A., Gazivoda Kraljević, T., & Raić-Malić, S. (2019). Therapeutic perspective of vitamin C and its derivatives. *Antioxidants*, 8(8), 247.
- Meunier, J., Ieni, J., & Maurice, T. (2006). The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid β 25-35 peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the σ 1 receptor. *British journal of pharmacology*, 149(8), 998-1012.
- Middleton, E. (1998). Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. In *Flavonoids in the living system* (pp. 175-182). Springer, Boston, MA.
- Mihara, M., Ohnishi, A., Tomono, Y., Hasegawa, J., Shimamura, Y., Yamazaki, K., & Morishita, N. (1993). Pharmacokinetics of E2020, a new compound for Alzheimer's

- disease, in healthy male volunteers. *International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology*, 31(5), 223-229.
- Mohs RC, Doody RS, Morris JC, Ieni JR, Rogers SL, Perdomo CA et al. (2001). A 1-year, placebo-controlled preservation of functions survival study of donepezil in AD patients. *Neurology* 57: 481–488.
- Moon, Y. J., Wang, L., DiCenzo, R., & Morris, M. E. (2008). Quercetin pharmacokinetics in humans. *Biopharmaceutics & drug disposition*, 29(4), 205-217.
- Moore, B. D., Chakrabarty, P., Levites, Y., Kukar, T. L., Baine, A. M., Moroni, T., ... & Golde, T. E. (2012). Overlapping profiles of A β peptides in the Alzheimer's disease and pathological aging brains. *Alzheimer's research & therapy*, 4(3), 18.
- Moskaug, J. Ø., Carlsen, H., Myhrstad, M., & Blomhoff, R. (2004). Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. *Mechanisms of ageing and development*, 125(4), 315-324.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Navarro-Yepes J, Zavala-Flores L, Anandhan A, Wang F, Skotak M, Chandra N, Li M, Pappa A, Martinez-Fong D, Del Razo L M, Quintanilla-Vega B, Franco R. 2014. Antioxidant gene therapy against neuronal cell death. *Pharmacol Ther*, 142: 206–230.
- Navarro-Yepes, J., Burns, M., Anandhan, A., Khalimonchuk, O., Del Razo, L. M., Quintanilla-Vega, B., ... & Franco, R. (2014). Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. *Antioxidants & redox signaling*, 21(1), 66-85.
- Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A., & Yar, M. S. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European journal of medicinal chemistry*.
- Noh MY, Koh SH, Kim Y, Kim HY, Cho GW, Kim SH (2009). Neuroprotective effects of donepezil through inhibition of GSK-3 activity in amyloid-beta-induced neuronal cell death. *J Neurochem* 108: 1116–1125.
- Noh, M. Y., Koh, S. H., Kim, S. M., Maurice, T., Ku, S. K., & Kim, S. H. (2013). Neuroprotective effects of donepezil against A β 42-induced neuronal toxicity are mediated through not only enhancing PP 2 A activity but also regulating GSK-3 β and n AChR s activity. *Journal of neurochemistry*, 127(4), 562-574.
- Novza, Y. A., & Popova, E. M. (2016). Flavonoids: chemistry and biological activities. *Проблеми екологічної біотехнології*, (1).
- Nunes XP, Silva F S, Almeida G J, Tolentino de Lima J, Ribeiro L A A, Quintans Júnior L G, Filho G M B. 2012. Biological oxidations and antioxidant activity of natural products in: *Phytochemicals as nutraceuticals – global approaches to their role in nutrition and health*. Dr Venketeshwer Rao (Ed.), InTech, ISBN: 978-953-51-0203-8, pp:1-20.

- Ogura, H., Kosasa, T., Kuriya, Y., & Yamanishi, Y. (2000). Donepezil, a centrally acting acetylcholinesterase inhibitor, alleviates learning deficits in hypocholinergic models in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 22(2), 89-95.
- Ono, K., Yoshiike, Y., Takashima, A., Hasegawa, K., Naiki, H., & Yamada, M. (2003). Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 87(1), 172-181.
- Ossola, B., Kääriäinen, T. M., & Männistö, P. T. (2009). The multiple faces of quercetin in neuroprotection. *Expert opinion on drug safety*, 8(4), 397-409.
- Osthege, Y. (2012). Resting pulse rate reference data for children, adolescents, and adults: United States, 1999-2008 (No. 41). US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics.
- Özkaya, A. B. (2009). Hct-116 kolon kanser hücre hattında yeşil çay etken maddesi olan (-)-epigallocatekin-3 gallat'ın apoptoz üzerine etkisinin incelenmesi (Doctoral dissertation, DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5.
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Med Cell Longev* 2: 270–278.
- Peng, Z. F., Strack, D., Baumert, A., Subramaniam, R., Goh, N. K., Chia, T. F., ... & Chia, L. S. (2003). Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. *Phytochemistry*, 62(2), 219-228.
- Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., Jimenez, R., Santos-Buelga, C., & Osuna, A. (2009). Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacological Reports*, 61(1), 67-75.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 4(2), 89.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., ... & Bitto, A. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.
- Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F., & Chiarotto, E. (2004). Oxidative stress and cell signalling. *Current medicinal chemistry*, 11(9), 1163-1182.
- Pool, L. R., Weuve, J., Wilson, R. S., Bültmann, U., Evans, D. A., & De Leon, C. F. M. (2016). Occupational cognitive requirements and late-life cognitive aging. *Neurology*, 86(15), 1386-1392.
- Prater, M. R., Lauderbach, C. L., Liang, C., & Holladay, S. D. (2008). Placental oxidative stress alters expression of murine osteogenic genes and impairs fetal skeletal formation. *Placenta*, 29(9), 802-808.

- Pratheeshkumar, P., Son, Y. O., Divya, S. P., Wang, L., Turcios, L., Roy, R. V., ... & Zhang, Z. (2017). Quercetin inhibits Cr (VI)-induced malignant cell transformation by targeting miR-21-PDCD4 signaling pathway. *Oncotarget*, 8(32), 52118.
- Quecan, B. X., Santos, J. T., Rivera, M. L., Hassimotto, N. M., Almeida, F. A., & Pinto, U. M. (2019). Effect of quercetin rich onion extracts on bacterial quorum sensing. *Frontiers in Microbiology*, 10, 867.
- Racchi, M., Mazzucchelli, M., Porrello, E., Lanni, C., & Govoni, S. (2004). Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacological research*, 50(4), 441-451.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*, 2014.
- Ray, R., Juranek, J. K., & Rai, V. (2016). RAGE axis in neuroinflammation, neurodegeneration and its emerging role in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 62, 48-55.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.
- Richetti, S. K., Blank, M., Capiotti, K. M., Piato, A. L., Bogo, M. R., Vianna, M. R., & Bonan, C. D. (2011). Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 217(1), 10-15.
- Rishitha, N., & Muthuraman, A. (2018). Therapeutic evaluation of solid lipid nanoparticle of quercetin in pentylenetetrazole induced cognitive impairment of zebrafish. *Life sciences*, 199, 80-87.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Assay guidance manual: cell viability assays. Sittampalam, GS, Gal-Edd, N., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Bejcek, B., Glicksman, M., Inglese, J., Lemmon, 51, 1À23.
- Rogers, S. L., & Friedhoff, L. T. (1996). The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a US multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 7(6), 293-303.
- Rogers, S. L., Farlow, M. R., Doody, R. S., Mohs, R., & Friedhoff, L. T. (1998). A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Neurology*, 50(1), 136-145.
- Rowland, J. P., Rigby, J., Harper, A. C., & Rowland, R. (2007). Cardiovascular monitoring with acetylcholinesterase inhibitors: a clinical protocol. *Advances in Psychiatric Treatment*, 13(3), 178-184.
- Ruotolo, R., Calani, L., Brighenti, F., Crozier, A., Ottonello, S., & Del Rio, D. (2014). Glucuronidation does not suppress the estrogenic activity of quercetin in yeast and human breast cancer cell model systems. *Archives of biochemistry and biophysics*, 559, 62-67.

- Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S., & Russo, G. L. (2012). The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochemical pharmacology*, 83(1), 6-15.
- Sabogal-Guáqueta, A. M., Munoz-Manco, J. I., Ramírez-Pineda, J. R., Lamprea-Rodriguez, M., Osorio, E., & Cardona-Gómez, G. P. (2015). The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. *Neuropharmacology*, 93, 134-145.
- Sachdeva, S., Pant, S. C., Kushwaha, P., Bhargava, R., & Flora, S. J. (2015). Sodium tungstate induced neurological alterations in rat brain regions and their response to antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 82, 64-71.
- Salloway, S., Ferris, S., Kluger, A., Goldman, R., Griesing, T., Kumar, D., & Richardson, S. (2004). Efficacy of donepezil in mild cognitive impairment: a randomized placebo-controlled trial. *Neurology*, 63(4), 651-657.
- Sandhir, R., & Mehrotra, A. (2013). Quercetin supplementation is effective in improving mitochondrial dysfunctions induced by 3-nitropropionic acid: implications in Huntington's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1832(3), 421-430.
- Sasaki, N., Toda, T., Kaneko, T., Baba, N., & Matsuo, M. (2003). Protective effects of flavonoids on the cytotoxicity of linoleic acid hydroperoxide toward rat pheochromocytoma PC12 cells. *Chemico-biological interactions*, 145(1), 101-116.
- Seifried, H. E., Anderson, D. E., Fisher, E. I., & Milner, J. A. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of nutritional biochemistry*, 18(9), 567-579.
- Selekler, K. (2010). Alois alzheimer ve alzheimer hastalığı. *Türk Geriatri Dergisi*, 13(3), 9-14.
- Sen S and Chakraborty R. 2011. The role of antioxidants in human health. In: *Oxidative stress: Diagnostics, prevention, and therapy (ACS symposium series)*. Silvana A, Hepel M, editors. Washington DC: American Chemical Society, Chap1, pp. 1–37.
- Sharma, K. (2019). Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics. *Molecular medicine reports*, 20(2), 1479-1487.
- Shen, H., Kihara, T., Hongo, H., Wu, X., Kem, W. R., Shimohama, S., ... & Sugimoto, H. (2010). Neuroprotection by donepezil against glutamate excitotoxicity involves stimulation of $\alpha 7$ nicotinic receptors and internalization of NMDA receptors. *British journal of pharmacology*, 161(1), 127-139.
- Shimmyo, Y., Kihara, T., Akaike, A., Niidome, T., & Sugimoto, H. (2008). Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: structure–activity relationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1780(5), 819-825.
- Shirai, M., Kawai, Y., Yamanishi, R., Kinoshita, T., Chuman, H., Terao, J., ... & Chuman, H. (2006). Effect of a conjugated quercetin metabolite, quercetin 3-glucuronide, on

lipid hydroperoxide-dependent formation of reactive oxygen species in differentiated PC-12 cells. *Free radical research*, 40(10), 1047-1053.

Silva, J. P., Gomes, A. C., & Coutinho, O. P. (2008). Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells. *European Journal of Pharmacology*, 601(1-3), 50-60.

Sohal, R. S. (2002). Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(1), 37-44.

Solntseva EI, Kapai NA, Popova OV, Rogozin PD, Skrebitsky VG (2014). The involvement of sigma1 receptors in donepezil-induced rescue of hippocampal LTP impaired by beta-amyloid peptide. *Brain Res Bull* 106: 56–61.

Solntseva, E. I., Kapai, N. A., Popova, O. V., Rogozin, P. D., & Skrebitsky, V. G. (2014). The involvement of sigma1 receptors in donepezil-induced rescue of hippocampal LTP impaired by beta-amyloid peptide. *Brain research bulletin*, 106, 56-61.

Sousa T, Afonso J, Carvalho F and Albino-Teixeira A. 2012. Lipid peroxidation and antioxidants in arterial hypertension. In: *Lipid Peroxidation*. Intech, Open Access Publisher, ISBN:980-953-307-143-0, Academic Press, Volume 1, Chap: 17, pp: 345-392.

Stavric B. Role of chemopreventers in human diet. *Clin. Biochem.* 27(5):319-332. (1994)

Stern, Y. (2002). What is cognitive reserve? Theory and research application of the reserve concept. *Journal of the international neuropsychological society*, 8(3), 448-460.

Suganthi, N., Devi, K. P., Nabavi, S. F., Braidy, N., & Nabavi, S. M. (2016). Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: Focusing on the mechanisms of actions. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 892-908.

Sugimoto, H., Iimura, Y., Yamanishi, Y., & Yamatsu, K. (1995). Synthesis and structure-activity relationships of acetylcholinesterase inhibitors: 1-benzyl-4-[(5, 6-dimethoxy-1-oxoindan-2-yl) methyl] piperidine hydrochloride and related compounds. *Journal of medicinal chemistry*, 38(24), 4821-4829.

Sugimoto, H., Ogura, H., Arai, Y., Iimura, Y., & Yamanishi, Y. (2002). Research and development of donepezil hydrochloride, a new type of acetylcholinesterase inhibitor. *The Japanese journal of pharmacology*, 89(1), 7-20.

Takada, Y., Yonezawa, A., Kume, T., Katsuki, H., Kaneko, S., Sugimoto, H., & Akaike, A. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection by donepezil against glutamate neurotoxicity in rat cortical neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(2), 772-777.

Takada-Takatori, Y., Kume, T., Ohgi, Y., Izumi, Y., Niidome, T., Fujii, T., ... & Akaike, A. (2008). Mechanism of neuroprotection by donepezil pretreatment in rat cortical neurons chronically treated with donepezil. *Journal of neuroscience research*, 86(16), 3575-3583.

Takada-Takatori, Y., Kume, T., Izumi, Y., Ohgi, Y., Niidome, T., Fujii, T., ... & Akaike, A.

- (2009). Roles of nicotinic receptors in acetylcholinesterase inhibitor-induced neuroprotection and nicotinic receptor up-regulation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(3), 318-324.
- Takashima, M., Horie, M., Shichiri, M., Hagihara, Y., Yoshida, Y., & Niki, E. (2012). Assessment of antioxidant capacity for scavenging free radicals in vitro: a rational basis and practical application. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(7), 1242-1252.
- Tamer, L., Polat, G., Eskandari, G., Ercan, B., & Atik, U. (2012). Serbest radikaller. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1(1), 52-58.
- Tangney, C. C., & Rasmussen, H. E. (2013). Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. *Current atherosclerosis reports*, 15(5), 324.
- Tanumihardjo, S. A. (Ed.). (2012). *Carotenoids and human health*. Springer Science & Business Media.
- Tiseo, P. J., Perdomo, C. A., & Friedhoff, L. T. (1998). Metabolism and elimination of ¹⁴C-donepezil in healthy volunteers: a single-dose study. *British journal of clinical pharmacology*, 46 (Suppl 1), 19.
- Tiseo, P. J., Rogers, S. L., & Friedhoff, L. T. (1998). Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of donepezil HCl following evening administration. *British journal of clinical pharmacology*, 46(Suppl 1), 13.
- Tune, L., Tiseo, P. J., Ieni, J., Perdomo, C., Pratt, R. D., Votaw, J. R., ... & Hoffman, J. M. (2003). Donepezil HCl (E2020) maintains functional brain activity in patients with Alzheimer disease: results of a 24-week, double-blind, placebo-controlled study. *The American journal of geriatric psychiatry*, 11(2), 169-177.
- Umegaki, H., & Khookhor, O. (2013). The response of the autonomic nervous system to the cholinesterase inhibitor, donepezil. *Neuroendocrinology Letters*, 34(5), 383-7.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- Van den Hengel, S. K., Balvers, R. K., Dautzenberg, I. J. C., Van Den Wollenberg, D. J. M., Kloezeman, J. J., Lamfers, M. L., ... & Hoeben, R. C. (2013). Heterogeneous reovirus susceptibility in human glioblastoma stem-like cell cultures. *Cancer gene therapy*, 20(9), 507-513.
- Vásquez-Garzón, V. R., Arellanes-Robledo, J., Garcia-Roman, R., Aparicio-Rautista, D. I., & Villa-Treviño, S. (2009). Inhibition of reactive oxygen species and pre-neoplastic lesions by quercetin through an antioxidant defense mechanism. *Free radical research*, 43(2), 128-137.
- Wallin AK, Andreasen N, Eriksson S, Båtsman S, Nasman B, Ekdahl A et al. (2007). Donepezil in Alzheimer's disease: what to expect after 3 years of treatment in a routine clinical setting. *Dement Geriatr Cogn Disord* 23: 150–160.

- Wang, D. M., Li, S. Q., Wu, W. L., Zhu, X. Y., Wang, Y., & Yuan, H. Y. (2014). Effects of long-term treatment with quercetin on cognition and mitochondrial function in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurochemical research*, 39(8), 1533-1543.
- Wang, W. W., Han, R., He, H. J., Li, J., Chen, S. Y., Gu, Y., & Xie, C. (2021). Administration of quercetin improves mitochondria quality control and protects the neurons in 6-OHDA-lesioned Parkinson's disease models. *Aging (Albany NY)*, 13(8), 11738.
- Warren, C. A., Paulhill, K. J., Davidson, L. A., Lupton, J. R., Taddeo, S. S., Hong, M. Y., ... & Turner, N. D. (2009). Quercetin may suppress rat aberrant crypt foci formation by suppressing inflammatory mediators that influence proliferation and apoptosis. *The Journal of nutrition*, 139(1), 101-105.
- West, S., & Bhugra, P. (2015). Emerging drug targets for A β and tau in Alzheimer's disease: a systematic review. *British journal of clinical pharmacology*, 80(2), 221-234.
- Wiendl, H., Elger, C., Förstl, H., Hartung, H. P., Oertel, W., Reichmann, H., & Schwab, S. (2015). Gaps between aims and achievements in therapeutic modification of neuronal damage ("neuroprotection"). *Neurotherapeutics*, 12(2), 449-454.
- Winblad, B., Wimo, A., Engedal, K., Soininen, H., Verhey, F., Waldemar, G., ... & Schindler, R. (2006). 3-year study of donepezil therapy in Alzheimer's disease: effects of early and continuous therapy. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 21(5-6), 353-363.
- Xiao, X., Shi, D., Liu, L., Wang, J., Xie, X., Kang, T., & Deng, W. (2011). Quercetin suppresses cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis through inactivation of P300 signaling. *PloS one*, 6(8).
- Yamada, T., Egashira, N., Imuta, M., Yano, T., Yamauchi, Y., Watanabe, H., & Oishi, R. (2010). Role of oxidative stress in vinorelbine-induced vascular endothelial cell injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(1), 120-127.
- Yang, B., Kotani, A., Arai, K., & Kusu, F. (2001). Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials. *Analytical sciences*, 17(5), 599-604.
- Yang, F., Song, L., Wang, H., Wang, J., Xu, Z., & Xing, N. (2015). Quercetin in prostate cancer: Chemotherapeutic and chemopreventive effects, mechanisms and clinical application potential. *Oncology reports*, 33(6), 2659-2668.
- Ye, Z. W., Zhang, J., Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2015). Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850(8), 1607-1621.
- Yoshiyama, Y., Kojima, A., Ishikawa, C., & Arai, K. (2010). Anti-inflammatory action of donepezil ameliorates tau pathology, synaptic loss, and neurodegeneration in a tauopathy mouse model. *Journal of Alzheimer's Disease*, 22(1), 295-306.
- Youdim, K. A., Dobbie, M. S., Kuhnle, G., Proteggente, A. R., Abbott, N. J., & Rice-Evans, C. (2003). Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. *Journal of neurochemistry*, 85(1), 180-192.

- Youdim, K. A., Qaiser, M. Z., Begley, D. J., Rice-Evans, C. A., & Abbott, N. J. (2004). Flavonoid permeability across an in situ model of the blood–brain barrier. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(5), 592-604.
- Zhang, X. D., Liu, X. Q., Kim, Y. H., & Whang, W. K. (2014). Chemical constituents and their acetyl cholinesterase inhibitory and antioxidant activities from leaves of *Acanthopanax henryi*: potential complementary source against Alzheimer's disease. *Archives of pharmacal research*, 37(5), 606-616.
- Zhu, M., Han, S., & Fink, A. L. (2013). Oxidized quercetin inhibits α -synuclein fibrillization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(4), 2872-2881.
- Zimmermann, M. (2013). Neuronal AChE splice variants and their non-hydrolytic functions: redefining a target of AChE inhibitors. *British journal of pharmacology*, 170(5), 953-967.

