



**İZOKİNOLİN GRUBU BİR ALKALOİD OLAN ALLOKRİPTOPİNİN
OKSİDATİF STRES KAYNAKLI NÖRAL HASARA KARŞI KORUYUCU
ETKİNLİĞİNİN VE İLAÇ ETKEN MADDESİ OLABİLME
POTANSİYELİNİN İN-VİTRO VE İN-SİLİKO OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Sahra Setenay BARAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2022

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

.....
Sahra Setenay BARAN
27/01/2022

İZOKİNOLİN GRUBU BİR ALKALOİD OLAN ALLOKRIPTOPİNİN OKSİDATİF
STRES KAYNAKLI NÖRAL HASARA KARŞI KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN VE
İLAÇ ETKEN MADDESİ OLABİLME POTANSİYELİNİN İN-VİTRO VE İN-SİLİKO
OLARAK ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Sahra Setenay BARAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2022

ÖZET

Hafıza kaybıyla karakterize edilen Alzheimer hastalığının (AH), prevalansı artmaktadır. Bu sebepten AH'yi hedef alan yeni ilaç adaylarının keşfedilmesi gerekmektedir. Alkaloidlerin nöral koruyucu aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada bir izokinolin alkaloidi olan allokriptopinin AH için ilaç etken maddesi olabilme potansiyelinin *in-vitro* ve *in-siliko* yöntemlerle araştırılarak, nörodejenerasyonda rol alan çoklu yollar üzerindeki etki mekanizmasının ortaya konulması amaçlanmıştır. *İn-vitro* çalışmalarda, allokriptopinin H₂O₂ ile oksidatif strese indüklenen farklılaştırılmış PC12 (fPC12) hücrelerinin lipid peroksidasyonu (MDA), toplam oksidan ve antioksidan seviyeleri (TAS ve TOS), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktiviteleri üzerindeki etkinliği klorometrik ve Elisa yöntemleriyle belirlenmiştir. Asetilkolinesteraz (AChE) inhibitör etkinliği Ellman, qRT-PZR ve western blot hibridizasyon yöntemleri, nöral morfoloji üzerindeki etkisi ise mikroskopik ölçümlerle tespit edilmiştir. *İn-siliko* çalışmalarda ise, allokriptopinin ilaç olabilme potansiyeli ve SOD, KAT, GPx ve AChE enzim inhibitörlerinin bağlanma alanlarıyla etkileşimi belirlenmiştir. Allokriptopinin oksidatif strese indüklenen fPC12 hücrelerinde MDA ve TOS'u baskılayarak ($p<0,05$) ve TAS, SOD, KAT ve GPx aktivitelerini artırarak oksidatif stresi azalttığı ve antioksidan sistemi aktive ettiği saptanmıştır ($p<0,05$). Ayrıca, AChE inhibitör görevi gördüğü aktivite, gen ve protein düzeylerinde belirlenmiştir ($p<0,05$). Nöral morfolojinin korunmasına da katkı sağladığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). En etkili konsantrasyon 120 µg/mL olarak belirlenmiştir. *İn-siliko* olarak, allokriptopinin bağırsak-kan ve kan-beyin bariyerini aşarak nöral sistemde etkin bir ilaç etken maddesi olabileceği ve enzimlerin inhibisyonuyla pro-oksidan aktivite göstermeyeceği tespit edilmiş olup, AChE inhibitör aktivitenin moleküler temelleri aydınlatılmıştır. Oksidatif strese karşı nörokoruyucu etki potansiyeli ilk kez belirlenen allokriptopinin AH gibi nörodejeneratif hastalıklardaki çoklu mekanizmalarla nörokoruyucu etki sağladığı ve ilaç etken maddesi olma potansiyeline sahip olabileceği gösterilmiştir.

Bilim Kodu : 20309
Anahtar Kelimeler : Alzheimer hastalığı, Allokriptopin, AChE inhibitörü, Antioksidan, Nörokoruyucu ilaç adayı, İn-siliko, İn-vitro, Oksidatif stres
Sayfa Adedi : 170
Danışman : Prof. Dr. Belma ASLIM

IN-VITRO AND IN-SILICO INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFICACY OF
ALLOCRYPTOPINE, AN ISOQUINOLINE ALKALOID, AGAINST OXIDATIVE
STRESS-INDUCED NEURAL DAMAGE AND ITS POTENTIAL TO BE A DRUG
ACTIVE INGREDIENT

(M. Sc. Thesis)

Sahra Setenay BARAN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

January 2022

ABSTRACT

The prevalence of Alzheimer's disease (AD), which causes memory loss, is increasing. Therefore, new drug candidates are needed to be discovered. Alkaloids are known to have neuroprotective activities. This study was aimed to investigate the potential of allocryptopine, an isoquinoline alkaloid, to be a drug active ingredient for AD by *in-vitro* and *in-silico* methods. In *in-vitro* studies, the effect of allocryptopine on total oxidative and antioxidant status (TOS and TAS), lipid peroxidation (MDA), and superoxide dismutase (SOD), catalase (KAT) and glutathione peroxidase (GPx) on differentiated PC12 cells induced to oxidative stress by H₂O₂ were investigated via chlorometric and Elisa methods. The acetylcholinesterase (AChE) inhibition activity of allocryptopine was investigated using Ellman, qRT-PCR and Western blot hybridization. Additionally, its effect on neural morphological was determined by microscopic examination. In *in-silico* studies, the ADME-T properties, and interactions of allocryptopine with the binding sites of the inhibitors of SOD, KAT, GPx and AChE enzymes were calculated using Schrodinger Software. Allocryptopine reduced oxidative stress by suppressing MDA and TOS, and increasing TAS, SOD, KAT and GPx activities ($p<0.05$). Allocryptopine has also shown AChE inhibition effect ($p<0.05$) and contributed to the preservation of neural morphology ($p<0.05$). Furthermore, it could be a drug candidate, and forms weak and unstable interactions with antioxidant enzymes, but establishes strong and stable bonds and interactions with the AChE inhibitory binding domain. The neuroprotective effect of allocryptopine on these multi mechanisms that play a role in neurodegenerative diseases (NDs), such as AD, showed it could have the potential as a drug candidate for NDs.

Science Code : 20309

Key Words : Alzheimer's disease, Allocryptopine, Anti-AChE, Antioxidant, In-silico, In-vitro, Neuroprotective drug candidate, Oxidative stress

Page Number : 170

Supervisor : Prof. Dr. Belma ASLIM

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca danışmanım olan ve tüm bu süreçlerde bilgi birikimi ve tecrübeleri ile bana yol göstererek, ilgi alanıma uygun araştırma olanakları sağlayan danışmanım Prof. Dr. Belma ASLİM başta olmak üzere gerek akademik gerekse hayat tecrübesi ile bana destek olan hocalarım Öğr. Gör. Serap NİĞDELİOĞLU DOLANBAY ve Dr. Seda ŞİRİN'e, özellikle COVID-19 dönemindeki anlayışlı ve yardım sever tavırları için laboratuvar arkadaşlarım Merve İÇİN ve Abdullah DEMİR'e ve eğlenceli halleri ile lab günlerini şenlendiren Buse DENGİZE çok teşekkür ederim.

Beni her zaman meslektaş gibi hissettiren, çalışmış ve tanışmış olmaktan büyük keyif aldığım hocam Dr. Yusuf ŞİMŞEK'e de hesaplamalı biyoloji konusundaki akademik gelişimimdeki desteklerinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim. Sevecen ve yardım sever tavırlarıyla kimyasal madde ihtiyacında bana yardımcı olan Prof. Dr. Zekiye SULUDERE, Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL ve Doç. Dr. Şevin GÜNEY hocalarıma da bir kez daha teşekkür ederim. Ayrıca, *in-siliko* hesaplamalarımı gerçekleştirdiğim Schrödinger programının lisansını sağladığı Gazi Üniversitesi Bilgi İşlem birimine teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, tüm bu süreç boyunca sıcacık sevgileri, kalpten inançları ve koşulsuz destekleri için sevgili ailem başta olmak üzere, öz teyzem olsa ancak bu kadar severim dediğim Ayşin ÖZCAN'a, Berk ZORLUTUNA ve kıymetli ailesine sonsuz teşekkür, minnet ve sevgilerimle..

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
2.1. Alzheimer Hastalığı	5
2.2. Alzheimer Hastalığındaki Genetik Faktörler ve Mekanizması	6
2.3. Oksidatif Stres ve Oksidatif Stres İlişkili Nöron Hasarı	8
2.4. Oksidatif Stres ve Alzheimer Hastalığının Ana Patobiyolojisi.....	11
2.4.1. Oksidatif stres kaynaklı plak ve protein agregasyonu	11
2.5. Oksidatif Strese Bağlı Kolinerjik Aktivitenin Bozulması.....	14
2.6. Kolinerjik Aktivitenin Alzheimer Hastalığı ile İlişkisi	15
2.7. Alzheimer Hastalığında Nörit Gelişimi ve Nöral Morfoloji	16
2.8. Nörodejenerasyona Aracılık Eden Nöral Ölüm Yolakları	18
2.8.1. Apoptozis.....	18
2.8.2. Nekrozis.....	18
2.8.3. Otofaji	19
2.8.4. Ferroptozis	19
2.9. Alzheimer Hastalığının Patolojisi ile Nöral Hücrel Ölüm Arasındaki İlişki	20

	Sayfa
2.10. Alzheimer Hastalığındaki Tedavi Yaklaşımları	22
2.10.1. AChE inhibitörleri	22
2.10.2. N-metil-D-aspartat reseptör antagonisti	23
2.10.3. A β antikor tedavisi.....	24
2.11. Alzheimer Hastalığına Yönelik İlaç Geliştirme Çalışmaları ve Hedefleri.....	25
2.11.1. Alzheimer hastalığı için farmakokinetik hedefler	26
2.11.2. Alzheimer hastalığı için farmakodinamik hedefler	30
2.11.3. Alzheimer hastalığında için geliştirilmekte olan tedaviler	35
2.12. İlaç Keşif ve Geliştirme Çalışmalarında <i>İn-Siliko</i> Yaklaşımlar	36
2.12.1. Alzheimer hastalığına yönelik geliştirilen ilaçlarda <i>in-siliko</i> yaklaşımlar	38
2.13. Alzheimer Hastalığının Tedavisinde Kullanılan Alternatif Bitkisel Sekonder Metabolitler.....	40
2.13.1. Bitkisel ilaç adayı olarak polifenoller	41
2.13.2. Bitkisel ilaç adayı olarak terpenoidler	42
2.13.3. Bitkisel ilaç adayı olarak alkaloidler	42
2.14. İzokinolin Alkaloidleri ve Alzheimer Üzerindeki Etkileri.....	43
2.15. Allokriptopinin Genel Özellikleri	45
2.15.1. Allokriptopinin kimyasal özellikleri.....	45
2.15.2. Allokriptopinin biyolojik sistemler üzerindeki etkileri	45
3. MATERYAL METOT	49
3.1. Materyal	49
3.1.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan gereçler	49
3.1.2. <i>İn-siliko</i> çalışmalarda kullanılan gereçler	49
3.2. Metot	50
3.2.1. PC12 hücrelerinin geliştirilmesi ve farklılaştırılması	50

	Sayfa
3.2.2. Allokriptopinin PC12 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi	50
3.2.3. Deney modelinin oluşturulması	51
3.2.5. Oksidatif hasar ve antioksidan çalışmaları	52
3.2.6. AChE aktivite ve ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi	55
3.2.4. fPC12 hücrelerindeki morfolojik değişimin mikroskopik takibi.....	58
3.2.7. Verilerin değerlendirilmesi	59
3.2.8. Ligandların hazırlanması	59
3.2.9. Allokriptopinin farmakokinetik özelliklerinin belirlenmesi	60
3.2.10. Proteinlerin hazırlanması	60
3.2.11. Proteinlerin aktif bölgesinin kenetlenme hesapları için hazırlanması ...	61
3.2.12. Moleküler kenetlenme hesaplamaları	61
3.2.13. Simülasyon sistemlerinin hazırlanması	61
3.2.14. Moleküler dinamik simülasyon	61
4. BULGULAR	63
4.1. <i>İn-vitro</i> Çalışmalara ait Bulguları	63
4.1.1. Allokriptopinin PC12 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi	63
4.1.2. Allokriptopinin H ₂ O ₂ ile indüklenmiş PC12 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi	64
4.1.3 Allokriptopinin lipit peroksidasyonu üzerindeki etkisi	66
4.1.4. Allokriptopinin toplam oksidan ve antioksidan kapasite üzerindeki etkisi	67
4.1.5. Allokriptopinin süperoksit dismutaz enzimi üzerindeki etkisi	69
4.1.6. Allokriptopinin katalaz enzimi üzerindeki etkisi.....	70
4.1.7. Allokriptopinin glutatyon peroksidaz enzimi üzerindeki etkisi.....	71
4.1.8. Allokriptopinin asetilkolin esterase enziminin aktivitesinin üzerindeki etkisinin Ellman yöntemi ile değerlendirilmesi	73

Sayfa

4.1.9. Allokriptopinin asetilkolin esterase enziminin mRNA ifade düzeyi üzerindeki etkisi	74
4.1.10. Allokriptopinin asetilkolin esterase enziminin protein ifade düzeyi üzerindeki etkisi	75
4.1.11. Allokriptopinin fPC12 hücrelerinin morfolojileri üzerindeki etkisi	77
4.2. <i>İn-siliko</i> Çalışmalara ait Bulgular	79
4.2.1. Allokriptopinin farmakokinetik özelliklerinin ve ilaç olabilme potansiyeli	79
4.2.2. Allokriptopinin süperoksit dismutaz enzimi ile etkileşiminin modellenmesi	84
4.2.3. Allokriptopinin katalaz enzimi ile etkileşiminin modellenmesi	88
4.2.4. Allokriptopinin glutatyon peroksidaz enzimi ile etkileşiminin modellenmesi	94
4.2.4. Allokriptopinin AChE enzimi ile etkileşiminin modellenmesi	99
5. TARTIŞMA	105
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	130
KAYNAKLAR	135
EKLER.....	161
EK-1. Allokriptopin-SOD kompleksinin RMSD, RMSF değerleri ve toplam etkileşim haritası	162
EK-2. Allokriptopin-KAT kompleksinin RMSD, RMSF değerleri ve toplam etkileşim haritası	163
EK-3 Allokriptopin-GPx kompleksinin RMSD, RMSF değerleri ve toplam etkileşim haritası	165
EK-4. Allokriptopin-AChE kompleksinin RMSD, RMSF değerleri ve toplam etkileşim haritası	167
ÖZGEÇMİŞ	169

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Klinik olarak kullanılan AChE inhibitörleri ve özellikleri	23
Çizelge 2.2. Alkaloid grupları ve AH patolojisi üzerindeki etkileri	43
Çizelge 2.3. İzokinolin grubu alkaloidlerin nörokoruyucu etki mekanizması	44
Çizelge 2.4. Allokriptopinin terapötik aktivitesi ve mekanizmaları	46
Çizelge 3.1. Çalışmadaki uygulama grupları	52
Çizelge 3.2. GPx enzim aktivitesinin tayininde kullanılan kimyasallar	55
Çizelge 3.3. AChE enzim aktivitesinin tayininde kullanılan kimyasallar	56
Çizelge 3.4. Allokriptopinin olası konformasyonları	60
Çizelge 4.1. Allokriptopinin PC12 hücrelerinin % hücre canlılığı üzerine etkisi.	64
Çizelge 4.2. Allokriptopinin H ₂ O ₂ ile AH modeline indüklenen PC12 hücrelerinin % hücre canlılığı üzerine etkisi.	65
Çizelge 4.3. Allokriptopinin fPC12 hücreleri üzerindeki etkisinin morfolojik analizi...	79
Çizelge 4.4. Allokriptopinin farmakokinetik özellikleri ve ilaç olabilme potansiyelinin tahmini	85

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. AH'ye neden olan genler ve bu genlerin risk durumu.....	7
Şekil 2.2. ROS'un hücrel makromoleküller üzerindeki etkisi.....	8
Şekil 2.3. Oksidatif stresin AH patogenezindeki etkisi	9
Şekil 2.4. Lipit peroksidasyonunun üç ana aşaması.	10
Şekil 2.5. APP'nin işlendiği amiloidojenik ve amiloidojenik olmayan yollar.....	12
Şekil 2.6. Oksidatif stres ile indüklenen tau aracılı nörodejenerasyon	13
Şekil 2.7. Kolinerjik iletimin şematik gösterimi.....	15
Şekil 2.8. AChE, Aβ ve tau arasındaki çoklu ilişki.	16
Şekil 2.9. Oksidatif stresin neden olduğu nöral morfolojik değişimler.	17
Şekil 2.10. Oksidatif stres ile indüklenen AH'deki ana ölüm yolları.	21
Şekil 2.11. Memantin etki mekanizması.....	24
Şekil 2.12. Aducanumab'ın uygulanışı ve moleküler etki mekanizması.....	25
Şekil 2.13. Birinci savunma hattı antioksidanlar ve görevleri	33
Şekil 2.14. AChE inhibitörlerinin etki mekanizması.	34
Şekil 2.15. AH'ye yönelik terapötiklerinin hedeflerin son beş yıldaki değişimi.....	35
Şekil 2.16. AH tedavisine yönelik klinik deneylerde ile araştırılan ajanlar.....	36
Şekil 2.17. <i>İn-siliko</i> ilaç keşif ve geliştirmede çalışmalarının süreci ve yöntemleri.....	37
Şekil 2.18. Bilgisayar destekli ilaç keşif çalışmalarındaki yaklaşımlar.	38
Şekil 2.19. AChE enziminin moleküler yapısı ve ACh hidrolizinin kimyasal temelleri.	39
Şekil 2.20. Doğal AChE inhibitörlerinin enzimin üzerindeki bağlanma bölgeleri.....	40
Şekil 2.21. Fitokimyasalların sınıflandırılması.....	41
Şekil 2.22. İzokinolin grubu alkaloidlerin temel kimyasal yapısı.	43
Şekil 2.23. Allokriptopinin yapısı.....	45
Şekil 4.1. Allokriptopinin lipit peroksidasyonu üzerine etkisi	67

Şekil	Sayfa
Şekil 4.2. Allokriptopinin TOS, TAS ve OSI üzerindeki etkisi.....	68
Şekil 4.3. Allokriptopinin SOD enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.	70
Şekil 4.4. Allokriptopinin KAT enzim aktivitesi üzerindeki etkisi	71
Şekil 4.5. Allokriptopinin GPx enzim aktivitesi üzerindeki etkisi	73
Şekil 4.6. Allokriptopinin H ₂ O ₂ ile indüklenen AChE enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.....	74
Şekil 4.7. Allokriptopinin H ₂ O ₂ ile indüklenen AChE mRNA ifadesi üzerindeki etkisi	75
Şekil 4.8. Allokriptopinin H ₂ O ₂ ile indüklenen AChE proteinin ifadesi üzerindeki etkisi.....	76
Şekil 4.9. Allokriptopin izomerlerinin 3B yapısı.....	80
Şekil 4.10. Allokriptopinin SOD enzim inhibitörü bağlanma alanı ile etkileşim haritası.....	85
Şekil 4.11. R izomeri ile SOD enzimi arasındaki etkileşimler.	88
Şekil 4.12. Allokriptopinin KAT enzim inhibitörünün bağlanma alanı ile etkileşiminin haritası.	90
Şekil 4.13. S izomeri ile KAT enzimi arasındaki etkileşimler.	93
Şekil 4.14. R izomeri ile KAT enzimi arasındaki etkileşimler.	94
Şekil 4.15. Allokriptopinin GPx enzim inhibitörü bağlanma alanı ile etkileşim haritası.....	95
Şekil 4.16. S izomeri ile GPx enzimi arasındaki etkileşimler.....	97
Şekil 4.17. R izomeri ile GPx enzimi arasındaki etkileşimler.	98
Şekil 4.18. Allokriptopin AChE enzim inhibitörü bağlanma alanı ile etkileşim haritası.....	100
Şekil 4.19. S izomeri ile AChE enzimi arasındaki etkileşimler.....	102
Şekil 4.20. R izomeri ile AChE enzimi arasındaki etkileşimler	103

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Allokriptopinin fPC12 hücrelerinin morfolojisi üzerindeki etkisi.....	78



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
α	Alfa
Å	Angström
β	β
>	Büyüktür
Δ	Delta
°	Derece
γ	Gama
κ	Kappa
<	Küçüktür
$\leq$	Küçük veya eşittir
°C	Santigrat derece
%	Yüzde
Dk	Dakika
g	Gram
kDa	Kilodalton
μg	Mikrogram
$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
μmol hidrojen peroksit eşdeğeri/mg	Mikromol hidrojen peroksit eşdeğeri/miligram
$\mu\text{mol/L}$	Mikromol/litre
μmol troloks eşdeğeri/mg	Mikromol troloks eşdeğeri/miligram
M	Molar
mg	Miligram
mg/L	Miligram/litre
mL	Mililitre

Simgeler**mM****mmol/L****mol/L****nM*****p*****pH****ps****rpm****IC₅₀****Açıklamalar**

Nanomolar

mmol/L

mol/L

Mikrometre

Olasılık

Hidrojenin gücü

Fentosaniye

Dakikadaki devir sayısı

%50 inhibisyondan sorumlu konsantrasyon

Kısaltmalar**Açıklamalar****2B**

2 boyutlu

3B

3 boyutlu

AH

Alzheimer hastalığı

Ach

Asetilkolin

AChE

Asetilkolinesteraz

Akt

Protein kinaz B

AMP

Aktive edici protein kinaz

Apaf-1

Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1

APH-1

Ön farenks defektif -1

ApoE

Apolipoproteininin polimorfik alelleridir

APP

Amiloid prekürsör proteininin

Aβ

Amiloid-Beta

BACE-1

β-sekretaz-1

BCA

Bisikoninik Asit

BDNF

Beyin-türevli nörotrofik faktör

Kcal/mol

Kilokalori/mol

Ca⁺²

Kalsiyum

Caco-2

Kolonrektal adenokarsinom

CAS

Katalitik aktif bölge

CDK

Sikline bağımlı kinaz

Kısaltmalar**Açıklamalar****ChAT**

Kolin asetiltransferaz

CNS

Öngörülen merkezi sinir sistemi aktivitesi

CO₂

Karbondioksit

Cu-Zn SOD

Bakır-çinko süperoksit dismutaz

CYP450

Sitokrom P450

DMSO

Dimetil sülfoksit

DTNB

5,5'-Ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit

EDMA-T

Emilim, dağılım, metabolizma, atılım-toksosite

ERK

Hücre dışı sinyalle düzenlenen protein kinaz

fPC12

Farklılaştırılmış PC12

GPx

Glutasyon peroksidaz

GPx4

Glutasyon peroksidaz-4

GSK-3 β

Glikojen sentaz kinaz 3-beta

H₂O₂

Hidrojen peroksit

hERG

Ether-a-go-go ilişkili gen

HP

Hidrofobik Cep

IgG1

İmmünoglobulin gama 1

JNK

c-Jun N-terminal kinaz

K⁺

Potasyum

KAT

Katalaz

KBB

Kan-beyin bariyeri

MD

Moleküler dinamik

MDA

Malondialdehit

Mg⁺²

Magnezyum

MLKL

Karışık soy kinaz alanı proteini

MSS

Merkezi sinir sistemi

mTOR

Rapamisin protein kompleksi

MTT

Difeniltetrazolyumbromid

Na⁺

Sodyum

NBT

Nitroblue tetrazolium

NCSTN

Nicastrin

NFY

Nörofibriler yumaklar

Kısaltmalar**Açıklamalar****NF-κB**

Nükleer faktör kappa beta

NGF

Nöral gelişim faktörü

NMDA

N-metil-D-aspartik asit

NT

Nörotrofin

OD

Optik density

OSI

Oksidatif stres indeksi

P53

Tümör protein 53

PAS

Periferik anyonik bölge

PBS

Fosfat tamponu

PDB

Protein Data Bank

PEN-1

Presenilin

RIPK1/3

Reseptörle etkileşime giren kinaz proteini 1/3

RİPA

Radyo-immünopresipitasyon

RMSD

Kök-ortalama-kare sapma

RMSF

Kök-ortalama-kare dalgalanması

ROS

Reaktif oksijen türleri

rtvFG

Reaktif fonksiyonel grupların sayısı

SOD

Süperoksit dismutaz

TAS

Toplam antioksidan seviyesi

TBA

Tiyobarbitürik asit

TL

Türk lirası

TNF

Tümör nekroz faktörü

TOS

Toplam oksidan seviyesi

VPS34

Vakuolar protein sıralaması 34

XP

Extra precision

Zn⁺²

Çinko

1. GİRİŞ

Nörodejeneratif hastalıklar sinir sisteminin yapısal ve fonksiyonel işlevsizliği sonucu nöronların kaybı ile karakterize edilen hastalıklardır (Hussain ve diğerleri, 2018b). Alzheimer hastalığı (AH) %50-70 oranlarıyla dejeneratif değişimlere bağlı olarak gelişen demans hastalıklarının başında gelmektedir ve genellikle 60 yaş üzeri kişilerde görülmektedir (Akyar and Akdemir, 2009; Alzheimer's Dement., 2020). 60 yaş ve üzerindeki nüfusun 2050'li yıllara kadar dünya genelinde 2080,5 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (Fereshtehnejad ve diğerleri, 2019). Küresel nüfusun gittikçe daha fazla yaşlanması ile birlikte, hafıza, kognisyon kaybı ve hareket bozukluklarına neden olan bu hastalığın prevalansının da artması beklenmektedir. Nüfusun yaşlanması ve prevalansı artması ile 2020 yılında 305 milyar dolar olduğu tahmin edilen hastalığın maliyetinin de yıllık bir trilyon doların üzerine çıkması öngörülmektedir (Marasco, 2020). Diğer yandan, AH süreç boyunca gittikçe ilerleyen ve kötüleşen semptomları nedeniyle bakım desteğine ihtiyaç duyulan bir hastalıktır. Bu bakım sorunu hastaların yanı sıra, aile üyeleri ve bakım veren kişilerin sağlık ve sosyal yaşantıları üzerinde de olumsuz etkilere neden olmaktadır (Akyar and Akdemir, 2009; Kotradyová, 2018; Verulava ve diğerleri, 2018). Dahası, şuan yetişkinlerde önde gelen ölüm nedenleri arasında beşinci sırada olan AH'nin, 20 yıl içinde en yaygın ikinci ölüm nedeni olabileceği öngörülmektedir (Durães ve diğerleri, 2018; Marasco, 2020). Tüm bunlara ve uzun yıllardır süre gelen araştırmalara karşın, AH'ye neden olan faktörler ve patofizyolojisi hakkında yalnızca birkaç hipotez bulunmaktadır. Bu hipotezlerden biri oksidatif stres hipotezidir. Bu hipoteze göre, pro-oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengesizlik durumu olarak tanımlanan oksidatif stres membran yapısının ve geçirgenliğinin bozulmasına, nörotransmitter ve reseptör proteinlerde fonksiyon kaybına ve hücrel makro moleküllerde biyokimyasal değişimlere neden olmaktadır. Bu nedenle hem nörodejenerasyon sürecinin başlamasına hem de giderek ağırlaşmasına aracılık ettiği düşünülmektedir (Teixeira ve diğerleri, 2019; Tönnies and Trushina, 2017). Başlıca hipotezlerden bir diğeri ise en çok ilgiyi gören ve tedavi için en umut verici hipotez olarak tanımlanan kolinerjik hipotezdir (Jiang ve diğerleri, 2017). Bu hipotez, nöronlardaki kolinerjik haberleşme yollarında görev alan enzimlerin sentezindeki, pre-sinaptik salınımındaki ve post-sinaptik olarak alımındaki işlevsizliklerin AH oluşumuna ve gelişimine katkıda bulunduğunu savunmaktadır (Garcimartín ve diğerleri, 2017; Sims ve diğerleri, 2003).

Bunların dışında, AH'nin ana biyobelirtici olarak kabul gören amiloid-beta ($A\beta$) ve tau ile ilgili hipotezler de plak ve protein agregatlarının nöronlar için toksik olan organize makro yapıların oluşumuna neden olarak, nöral ölüme aracılık ettiğini savunmaktadır (Graham ve diğerleri, 2017). Dahası, oksidatif stres, antioksidan ve kolinerjik yolaklardaki kayıplar ve nöral morfolojik değişim AH'nin yanı sıra diğer nörodejeneratif hastalıkların patolojisinde görülen nöronlardaki dejenerasyon ve ölüm süreçlerinin ortak mekanizmalarıdır (Jiang ve diğerleri, 2017).

Diğer yandan, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmış ve klinik olarak AH için kullanılmakta olan mevcut tedaviler ise galantamin, donepezil ve rivastigmin gibi asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörleri, memantin gibi N-metil-D-aspartat (NMDA) antagonisti ve aducanumab gibi $A\beta$ antikorudur (İnternet 1; Petch and Bressington, 2021). Fakat bu ilaçların uzun vadedeki güvenliği ve etkinliği hala tam olarak açık değildir (Fleck, 2021; Graham ve diğerleri, 2017). Üstelik birçok yan etkilerine rağmen yalnızca semptomların hafifletilmesini sağlamak amacı ile palyatif tedavi olarak uygulanmaktadırlar (Selkoe, 2019). Bu sebepten, AH'ye yönelik yeni tedavi arayışları hem klinik hem de pre-klinik olarak sürmektedir. 2021 raporlarına göre AH için klinik olarak araştırılmaya devam edilen 28'i faz 3 aşamasında, 74'ü faz 2 aşamasında ve 24'ü faz 1 aşamasında olan 126 ajan bulunmaktadır ve bu ajanlar ile çoğunlukla inflamasyon, sinaptik plastisite, $A\beta$ ve Tau gibi AH patobiyolojisindeki mekanizmalardan biri hedeflenmektedir (Cummings ve diğerleri, 2021). Ancak AH'ye yönelik tedavilerin geliştirilmesinde %99'un üzerinde bir başarısızlık oranının söz konusu olduğu bilinmektedir (Conrado ve diğerleri, 2020; Cummings ve diğerleri, 2019). Bu sebepten tek bir patolojinin yerine yüksek ve çoklu etki potansiyeli sayesinde farklı mekanizmaları düzenleyebilen (polifarmakolojik) yeni ilaç adayların keşfine yönelik çalışmalar büyük öneme sahiptir (Habtemariam, 2019).

Hem onaylanmış ve kullanılmakta olan, hem de farklı faz aşamaları ile araştırılmaya devam eden tedavilerdeki başarısızlık, polifarmakolojik etkilere sahip bitkisel bileşiklere olan ilginin artırmasına neden olmuştur (Obulesu ve Rao, 2019). Sentetik moleküllere göre daha etkin ve daha güvenli bir alternatif olduğu düşünülen bitkisel bileşiklerin $A\beta$ ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu, lipit peroksidasyonu, AChE aktivasyonu gibi patolojileri ve bu patolojiler sonucu tetiklenen nöral dejenerasyon ve ölüm yolaklarının aktivasyonunu engelleyebildiği bilinmektedir (Hussain ve diğerleri, 2018a; Obulesu ve Rao, 2019).

Diğer yandan, kabul gören ve AChE inhibitörü olarak kullanılan ilaçlardan rivastigminin ve galantamin de bitkisel kaynaklı bileşiklerdir. Rivastigminin *Physostigma venenosum*'dan izole edilen ve sekonder bir metabolit olan fizostigminin alkaloidinin sentetik bir türevidir (Pinho ve diğerleri, 2013). Galantamin ise *Galanthus woronowii*'den izole edilen izokinolin grubuna ait bir alkaloiddir. Özellikle galantaminin çoklu etki mekanizması (N-reseptörlerinin allosterik bir modülasyonu ve nörotransmitter salınımının artırılması) ve oral kullanım sonrası yüksek emilimi nedeniyle AH tedavisinde en çok tercih edilen ilaç olduğu raporlanmıştır (Korabecny ve diğerleri, 2015). Galantaminin yanı sıra diğer izokinolin grubu alkaloidlerin de nörodejenerasyon ile ilişkili oksidatif strese karşı koruma, antioksidan sistem ve kolinerjik yolak başta olmak üzere pek çok mekanizma üzerinde nörofarmakolojik etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Chlebek ve diğerleri, 2016; Girdhar ve diğerleri, 2015). Bu alkaloidlerden biri de allokriptopindir. Allokriptopinin AH tedavisi için temel kriter olarak görülen AChE inhibisyonu üzerinde güçlü bir etkiye sahip olduğu raporlanış olmakta birlikte (Orhan ve Şener, 2006; Şener ve Orhan, 2005), inhibitör potansiyeli hakkında ileri düzeyde araştırmaların bulunmadığı ve ayrıca AH metabolizması üzerindeki etkinliğinin de ortaya konulmadığı görülmektedir. Yapılan literatür araştırmasına göre alkaloidlerin, özellikle de izokinolin grubu alkaloidlerin, nörodejeneratif hastalıklarda etkin bir ilaç adayı olabileceği üzerinde durulurken, aynı grup içerisinde yer alan allokriptopinin anti-bakteriyel, anti-viral, anti-fungal, anti-parazitik, anti-kanser, anti-aritmik, anti-hepatositik, anti-anjiyojenik ve anti-AChE gibi farklı biyolojik aktiviteleri ortaya konulmuş olmasına rağmen AH gibi nörodejeneratif hastalıklardaki potansiyelinin ve etki mekanizmasının tam olarak ortaya konulduğu herhangi bir araştırma bulunmadığı dikkat çekmiştir.

Bu yüksek lisans tezi ile;

- 1) İzokinolin grubu bir alkaloid olan allokriptopinin nöral koruyucu etkisinin *in-vitro* ve *in-siliko* olarak araştırılarak, AH'de ilaç etken maddesi olabilme potansiyelinin ortaya konulması,
- 2) Allokriptopinin oksidatif hasara bağlı nöron hücre ölümleri üzerindeki nöral koruyucu etkisinin araştırılması,
- 3) Oksidatif strese bağlı oluşturulan AH modelinde allokriptopinin oksidan sistem, lipid peroksidasyonu ve antioksidan mekanizmalar üzerindeki nöral koruyucu etkisinin belirlenmesi,

- 4) Allokriptopinin oksidatif hasara bağlı AH ana belirtici olan AChE enzimi üzerindeki inhibitör etkisinin araştırılması ve bu etki ile oksidatif hasar ve antioksidan mekanizma arasındaki ilişkinin ortaya konulması,
- 5) Oksidatif hasara bağlı nöral morfolojik değişimler üzerinde allokriptopinin nöral morfoloji koruyucu etkisinin araştırılarak, nöral morfolojik hasar ve bu hasarın korunması ile antioksidan aktivite ve AChE inhibisyon mekanizmaları arasındaki ilişkinin ortaya konulması,
- 6) Allokriptopinin, *in-siliko* yöntemler ile, vücuttaki emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite profilinin tahmin edilerek, güvenli nöral koruyucu ilaç etken veya destek maddesi olma potansiyelinin ortaya konulması,
- 7) Allokriptopinin oksidatif stres/antioksidan mekanizma ve AChE aktivasyonu/inhibisyonu üzerindeki etkisinin olası moleküler temellerinin bilgisayar destekli moleküler modelleme yöntemleri ile ortaya konulması ve bu bulguların *in-vitro* sonuçlar ile ilişkilendirilerek, *in-vitro* sonuçların desteklenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçlar doğrultusunda allokriptopinin AH gibi nörodejeneratif hastalıklara yönelik etkin bir ilaç etken maddesi olabilme potansiyelinin oksidatif stres ve antioksidan mekanizmanın yanı sıra AChE ve nöral morfoloji korunumu gibi farklı yollardaki çoklu mekanizmalar üzerinden *in-vitro* ve *in-siliko* olarak ortaya konulması ve bu mekanizmalar üzerindeki etkisinin birbiri ile ilişkisinin araştırılarak aydınlatılması hedeflenmiştir. Ayrıca, AH’de etkin olan bazı yolların aynı zaman da AH benzeri farklı nörodejeneratif hastalıklarda da etkin yollar olması sebebi ile, allokriptopinin diğer nörodejeneratif hastalıklarda nörokoruyucu ajan olarak kullanılabilecek etken madde olma potansiyelinin ortaya konulması da tezin ikincil hedefidir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Alzheimer Hastalığı

AH sinir sistemindeki yapısal ve fonksiyonel işlevsizliğe bağlı olarak gelişen, nöron ve sinaptik bağlantıların kaybı ile karakterize edilen bir nörodejeneratif hastalıktır (Hussain ve diğerleri, 2018b). Başlangıçta konuşma ve gezinme güçlüğü gibi hareket bozuklukları ve hafif bilişsel kayıplar ile ortaya çıkan AH, progresif bir hastalıktır. Süreç boyunca gittikçe kötüleşen patolojisi nedeniyle ağır bilişsel kayıplar başta olmak üzere davranışsal bozukluklara, öz bakım eksikliğine ve günlük yaşam aktivitelerini yönetilememesine neden olmaktadır (Graham ve diğerleri, 2017; Hussain ve diğerleri, 2018a). AH %50-70 sıklık oranıyla dejeneratif değişimlere bağlı olarak gelişen demans hastalıklarının başında gelmektedir (Akyar ve Akdemir, 2009; Dement., 2020). Genellikle 60 yaş üzeri hastalığı olarak bilinmesine rağmen, nadiren de olsa 30-40 yaş aralığındaki bireylerde de görülebilmektedir. Ancak, artan yaş ile birlikte hastalığın patolojisinin yanı sıra ortaya çıkma riski de artmaktadır. Öyle ki 85 yaşın üzerindeki bireyler için AH riskinin %50'nin üzerinde olduğu ifade edilmiştir (Cheignon ve diğerleri, 2018; İnternet 2).

Dünya genelindeki 60 yaş ve üzeri nüfusun 2050'li yıllara kadar 962,3'ten 2080,5 milyona ulaşacağı ve her geçen yıl bu hastalıktan muzdarip olan bireylerin sayısının da artan nüfus ve ortalama yaş oranı ile birlikte artacağı tahmin edilmektedir (Fereshtehnejad ve diğerleri, 2019). Öyle ki, 2050'li yıllarda dünya üzerinde 100 milyondan fazla insanın, günümüzdekinin neredeyse 3 katı, AH'den muzdarip olacağı öngörülmektedir (Cummings ve diğerleri, 2019). Dahası, günümüzde yetişkinlerde önde gelen ölüm nedenleri arasında beşinci sırada olan AH'nin, 20 yıl içinde en yaygın ikinci ölüm nedeni olabileceği öngörülmektedir (Durães ve diğerleri, 2018; Marasco, 2020). Diğer yandan AH küresel bir sağlık sorunu olmanın ötesinde ekonomik ve sosyal olarak da ciddi bir problemdir. AH'nin önlenmesi, teşhisi, tedavisi ve tüm bu süreçlerin yönetilmesi hem sağlık sistemleri hem de hasta yakınları için büyük bir ekonomik yüküdür. Ülkemiz için 2016 yılında erken evredeki bir AH'nin yıllık toplam maliyeti 11.410,10 TL, orta evredeki AH'nin 34.381,15 TL ve ileri evredeki AH'nin ise 61.268,67 TL olarak raporlanmıştır (Eroymak ve Yiğit, 2017). Dünya genelinde ise 2020 yılında bu maliyetin 305 milyar dolar olduğu, nüfusun yaşlanması ve hastalık prevalansının artması ile bu miktarın yıllık bir trilyon doların üzerine çıkabileceği tahmin edilmektedir (Marasco, 2020). Ayrıca, AH süreç boyunca gittikçe ilerleyen ve

kötüleſen semptomları nedeniyle bakım desteğine ihtiyaç duyulan bir hastalıktır. Bu bakım sorunu hastaların yanı sıra, aile üyeleri ve bakım veren kiſilerin sağlık ve sosyal yaſantıları üzerinde de olumsuz etkilere neden olmaktadır (Akyar ve Akdemir, 2009; Kotradyová, 2018). Bu kiſiler de bel ve boyun fıtığı, sinir sıkıſması gibi bedensel sağlık sorunlarının yanı sıra anksiyete, depresyon, sosyal izolasyon gibi psikolojik sorunların da görüldüğü ve bu sebepten topluma göre daha fazla antidepressan, anksiyolitik ve pıhtılaſma önleyici ilaç kullanmak durumunda kalıp, daha fazla ruhsal-toplumsal desteğe ihtiyaç duydukları raporlanmıſtır (Akyar ve Akdemir, 2009; Sözeri Varma ve diğerleri, 2018).

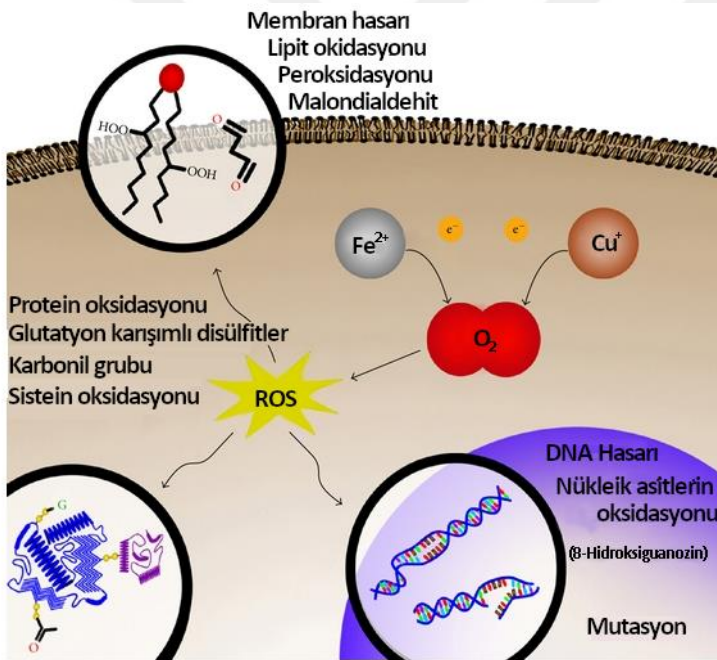
2.2. Alzheimer Hastalığındaki Genetik Faktörler ve Mekanizması

Diğer nörodejeneratif hastalılarda olduğu gibi AH'de de genetik mekanizmalar hastalığın oluſumu ve ilerlemesinde önemli role sahiptir. AH patobiyolojisinin çoğunlukla nöronal süreçler ile yakından iliſkili genlerdeki nadiren de nöral süreçler ile iliſkisi olmayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanabildiği bilinmektedir (Inoue, 2015). Üstelik bu genetik bozukluklar yalnızca kalıtsal AH'nin geliſiminde değil, aynı zamanda sporadik olarak oluſan AH'de de etkili olmaktadır (Pihlstrøm ve diğerleri, 2018). Şekil 2.1'de de görüldüğü üzere birçok genin AH ile iliſkili olduğu belirlenmiſ olmasına rağmen oluſumunu tetikleyen genetik risk faktörleri baſlıca otozomal dominant olarak kalıtılan mutasyonlar ve apolipoproteinin (ApoE) polimorfik alelleridir. Őimdiye kadar, otozomal dominant mutasyonlar ile AH patolojisine neden olan üç gen tanımlanmıſtır. Bunlardan ilki, 1991'de keſfedilen Amiloid Prekürsör Proteininin (APP) geni üzerindeki mutasyonlarıdır (Pihlstrøm ve diğerleri, 2018).

APP, 21. kromozom üzerinde bulunan ve üç ana izoformu olan bir gendir ve üzerinde tanımlanmıſ 70 farklı mutasyon bulunmaktadır (İnternet 3). Keſfinden bu yana birçok alıſmaya konusu olmasına rağmen, APP'nin fizyolojik iſlevi hala tam olarak aydınlatılamamıſtır. Fakat APP'nin eſitli fragmanlara proteolize edildiği ve proteoliz sonucu oluſan fragmanların bazen ters fonksiyonlara aracılık ettiği bilinmektedir (Wang ve diğerleri, 2011). Bu mutasyonların çoğu -sekretaz bölünme bölgesi etrafında olmasına rağmen, en ünlü APP mutasyonu BACE1 bölünme bölgesindeki aminoasitlerde deđiſikliklere neden olmaktadır. AH ile iliſki diğer iki gen ise -sekretaz kompleksini kodlayan PSEN1 ve PSEN2'dir. PSEN1 için tanımlanmıſ 300 farklı mutasyon bulunmakta olup (Güven ve diğerleri, 2021), bunların çoğu tekli aminoasit deđiſiklikleri ile sonuçlanan

2.3. Oksidatif Stres ve Oksidatif Stres İlişkili Nöron Hasarı

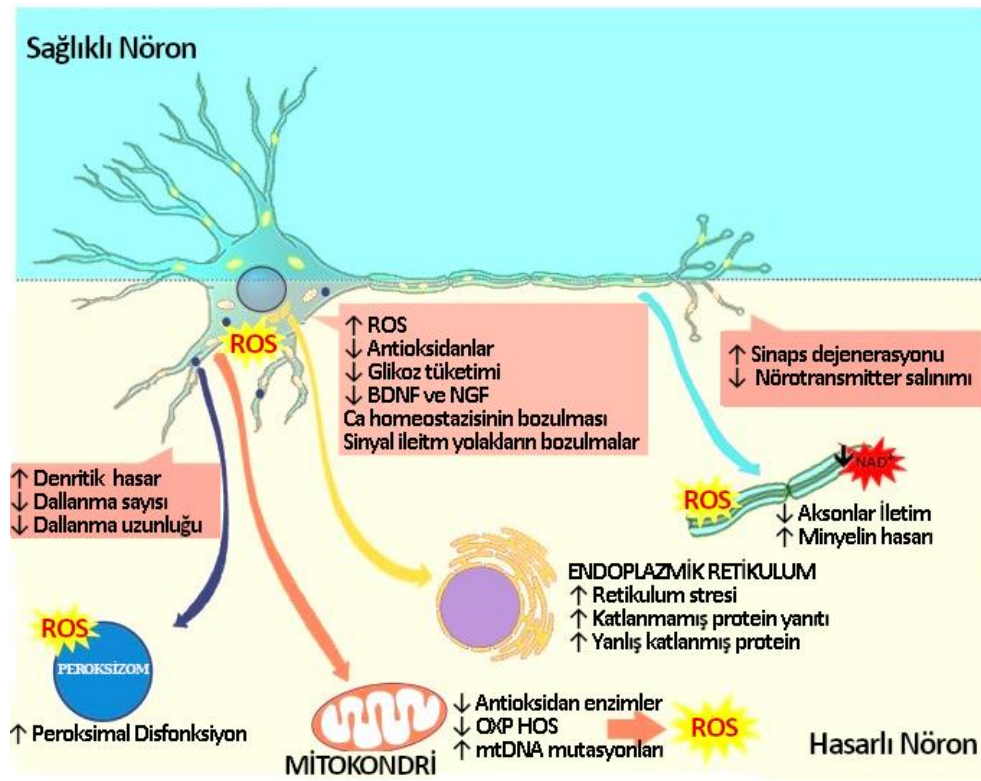
Oksidatif stres artan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve/veya antioksidan sisteminin işlevsizliği nedeniyle ortaya çıkan hücre içi aşırı ROS (O_2^- , H_2O_2 , HO_2 , ve $\bullet OH$) birikimi ile hücrel antioksidan mekanizma arasındaki dengesizlik durumu olarak tanımlanmaktadır (Chen ve diğerleri, 2012; Liu ve diğerleri, 2017c). Esasen ROS, aerobik organizmalarda sürekli olarak üretilen oksijen metabolizmasının normal bir yan ürünüdür ve düşük konsantrasyonları hücre sinyalleşmesinde önemli bir ikinci haberci olarak işlev görmektedir. Fakat yüksek konsantrasyonları nekrotik ve apoptotik hücre ölümüne yol açan DNA, proteinler ve lipitler gibi hücrel makro moleküllerde biyokimyasal değişikliklere neden olmaktadır (Şekil 2.2) (Chen ve diğerleri, 2012).



Şekil 2.2. ROS'un hücrel makromoleküller üzerindeki etkisi (Melo ve diğerleri, 2011)

Nöral sistem ise aksiyon potansiyeli, nörosekresyon ve iyon kanal hareketliliği süresince hücre içi homeostazisinin sürdürülebilmesi için büyük miktarda ATP'ye ihtiyaç duymaktadır. Bu sebepten vücuttaki toplam oksijen tüketiminin %20'si nöral sisteme aittir. Ayrıca, nöronal membranların yapısında yüksek oranda nöral ve bilişsel yeteneklerin gelişim için kritik role sahip olan dokosaheksaenoik, linoleik ve araşidonik gibi yağ asitleri bulunmaktadır (Halliwell, 2006; Quinn ve diğerleri, 2012; Siddappaji ve Gopal, 2021). Bu yüksek oksijen tüketimi ve çoklu doymamış yağ asidi içeriği nedeniyle nöronların oksidatif

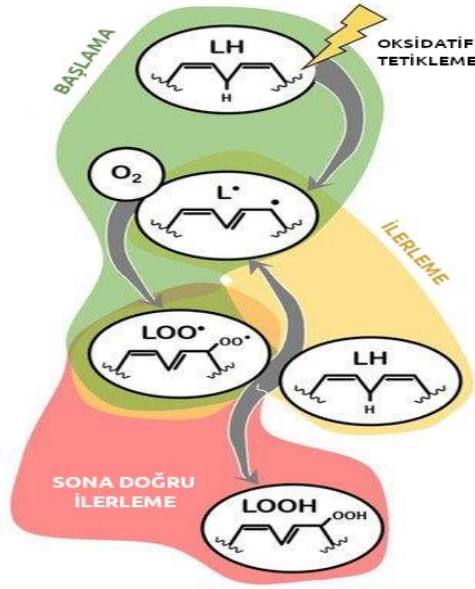
hasara karşı oldukça hassas olduğu bilinmektedir. Yapılan birçok çalışmada oksidatif stresin, AH ve AH gibi nörodejeneratif hastalılardaki nörodejenerasyon sürecinin bir parçası olduğu ortaya konulmuştur (Cassidy ve diğerleri, 2020; Castelli ve diğerleri, 2019; Liu ve diğerleri, 2017c; Niedzielska ve diğerleri, 2016). Dahası ROS kaynaklı oksidatif stresin, nörodejenerasyon sürecinde ortaya çıkan patolojik bir faktör olmaktan öte, erken bir belirteç olduğu ve nörodejenerasyondaki majör etiyolojik faktörlerin indüklenmesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.3)(Cheignon ve diğerleri, 2018; Galas ve diğerleri, 2006; Nunomura ve diğerleri, 2001).



Şekil 2.3. Oksidatif stresin AH patogenezindeki etkisi (Castelli ve diğerleri, 2019)

Bu etiyolojik faktörlerin başında membranların ve diğer makromoleküllerin hasarına neden olan lipid peroksidasyonu gelmektedir (Gaschler ve Stockwell, 2017; Peña-Bautista ve diğerleri, 2019; Taso ve diğerleri, 2019). Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin dokosaheksaenoik, linoleik ve araşidonik gibi doymamış yağ asitlerindeki çift bağlara saldırılması ile gerçekleşmektedir (Şekil 2.4) (Gaschler ve Stockwell, 2017). Oksidatif stres kaynaklı plazma ve organel membranlarındaki lipid peroksidasyonu reseptör ve kanallardaki yapısal ve fonksiyonel bozulmalar, iyon homeostazisinin değişimi, sitoskeletal elementlerin anormal fosforilasyonu, terminal aksondaki proteinlerin sindirimi, dendritik uzantıların

organizasyon ve işlevinin kaybı, sinyal yollarının ve nöronal biyoenerjettiği bozulması gibi nörodejenerasyon süreçlerine ve nihayetinde de nöral ölüme neden olmaktadır (Benhar, 2020; Ermak ve Davies, 2002; Fernandes ve diğerleri, 2017; Tönnies ve Trushina, 2017).



Şekil 2.4. Lipit peroksidasyonunun üç ana aşaması. LH: lipit molekülü; LOO•: lipit peroksil radikali; L•: lipit radikali; LOOH: lipit hidroperoksit (Félix ve diğerleri, 2020)

Oksidatif stres lipitlerin yanı sıra, nöronlarda proteinlerin anormal şekilde katlanmasına ve proteolize karşı daha duyarlı hale gelmesine neden olan protein yan zincirlerinin oksidasyonu, protein yapılarına hidroksil gruplarının sokulmasını, protein bazlı karbonillerin üretilmesini ve proteinlerde transasyon sonrası modifikasyonların oluşumunu tetiklemektedir (Chen ve diğerleri, 2012; Huang ve diğerleri, 2016a). Bu durum nörotransmitter ve reseptör proteinlerin fonksiyonlarını bozabilmekte ve immün sistemi uyaraabilecek antijenik değişikliklere de yol açabilmektedir (Altınkılıç, 2010).

Oksidatif stres ayrıca DNA çift sarmal yapısının açılmasına, depürinasyona, çapraz bağlanmalara, nükleik asitlerde baz modifikasyonlarına ve nokta mutasyonlarına neden olabilmektedir. Bu etkiler kromozomal mutasyonları ve sitotoksisteyi tetiklemektedir (Altınkılıç, 2010; Cassidy ve diğerleri, 2020). Birçok farklı çalışmada yukarıda sayılan nedenlerden dolayı oksidatif stresin AH başta olmak üzere nörodejeneratif hastalıkların ortak patofizyolojisinde merkezi bir rol oynadığı, nöral hasarın indikatörleri olan plak ve proteinlerin birikimine, nörit gelişim bozukluklarına ve nöronal dejenerasyonunun oluşumu

ve ilerlemesine neden olduğu ortaya konulmuştur (Ashabi ve diğerleri, 2013; Cheignon ve diğerleri, 2018; Liu ve diğerleri, 2017c).

2.4. Oksidatif Stres ve Alzheimer Hastalığının Ana Patobiyolojisi

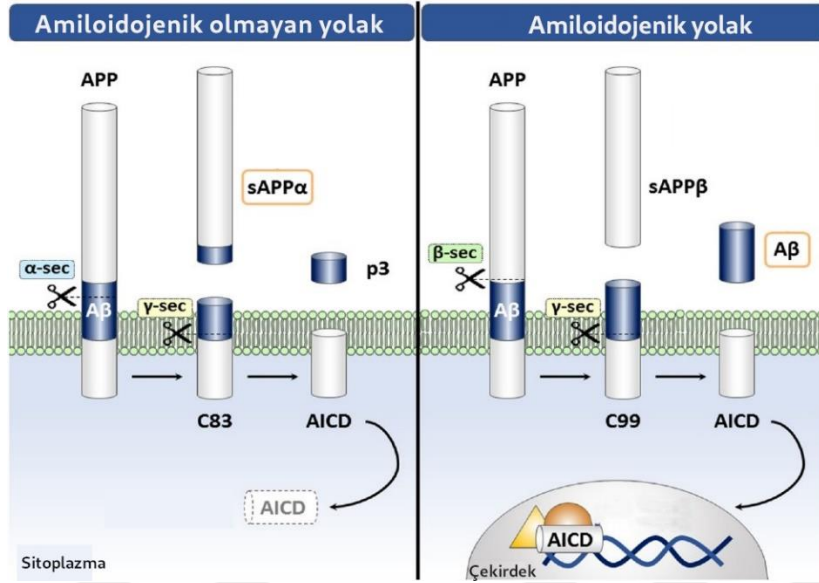
Yapılan birçok çalışmada ROS kaynaklı oksidatif stresin, AH'deki nörodejenerasyon sürecinin bir parçası olduğu ortaya konulmuştur (Castelli ve diğerleri, 2019). Üstelik nörodejenerasyon sürecinde ortaya çıkan patolojik bir faktör olmaktan öte, hastalığın erken bir belirteç olduğu ve hücrel makro moleküllerdeki (lipit, protein ve DNA) biyokimyasal değişikliklerin yanı sıra AH patogenezindeki majör etiyolojik faktörlerin indüklenmesinden de sorumlu olduğunu gösteren kanıtlar mevcuttur (Castelli ve diğerleri, 2019; Cheignon ve diğerleri, 2018; Galas ve diğerleri, 2006).

2.4.1. Oksidatif stres kaynaklı plak ve protein agregasyonu

Oksidatif stres nedeniyle AH'deki plak ve protein agregasyonunu tetikleyen majör etiyolojik faktörlerden patolojik A β oluşumu ve hiperfosforile edilmiş tau proteinin birikimidir.

Oksidatif stres ve A β

Aslen A β , 39-43 amino asitten oluşan, hidrofobik bir peptit grubudur (Graham ve diğerleri, 2017). Nöron gelişiminde ve aksonal taşımada görev aldığı düşünülen ve bir transmembran protein olan, APP'nin iki basamaklı işlenmesi sonucu ortaya çıkmaktadır (Kametani and Hasegawa, 2018). Şekil 2.5'de de görüldüğü üzere APP'nin iki basamaklı işlenmesinde iki farklı yolak söz konusudur. Bu yollardan ilki, APP'nin önce alfa-sekretaz (α -sekretaz) ile ardından da gama-sekretaz (γ -sekretaz) ile işlenmesi ve sonucunda da P3 veya A β 17-40/42 adı verilen küçük hidrofobik peptitlerin olduğu amiloidojenik olmayan yolaaktır (Kolev ve diğerleri, 2009; Selkoe, 2004). Diğeri ise APP'nin β -sekretaz ve γ -sekretaz enzimleri ile işlendiği ve sonucunda birleşerek nöronlara zarar veren ve organize makro yapıları meydana getiren A β 1-40 ve A β 1-42 plaklarının olduğu patolojik amiloidojenik yolağıdır (Graham ve diğerleri, 2017).



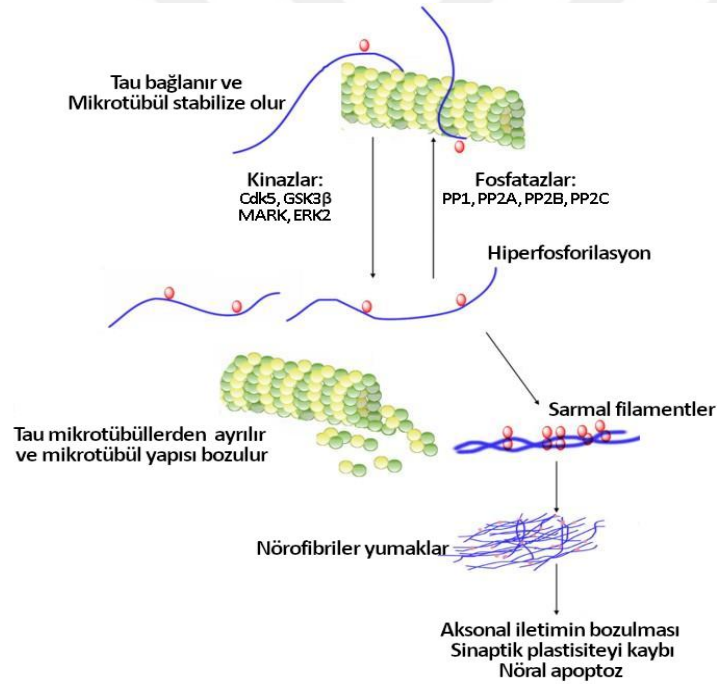
Şekil 2.5. APP'nin işlendiği amiloidojenik ve amiloidojenik olmayan yollar. α -sec: α -sekretaz; β -sec: β -sekretaz; γ -sec: γ -sekretaz; sAPP α : çözümlü APP- α ; sAPP β : çözümlü APP- β ; AICD: hücre içi C-terminal alanı; A β : amiloid- β (Coronel ve diğerleri, 2019)

Bir ROS olan H_2O_2 tarafından indüklenmiş oksidatif stresin, APP'den patolojik A β plaklarının üretimine neden olan amiloidojenik yolların aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra, A β oluşumuna, redoks duyarlı aktivatör proteinleri ve nükleer faktör kappa Beta (NF- κ B) gibi transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgesi olan sekretaz genlerinin promotörü ve 5' translate edilmemiş bölgesinin oksidatif stres ile aktivasyonu aracılık etmektedir. Bu bölgenin oksidatif stres ile aktivasyonu patolojik A β üretimini tetikleyen β - ve γ - sekretazların aktivitesinin artmasına, buna karşın patolojik olmayan bölünmeye aracılık α -sekretaz aktivitesinin ise azalmasına neden olmaktadır ve bu durum patolojik A β birikimi ile son bulmaktadır (Hadipour ve diğerleri, 2018; Kim ve diğerleri, 2015; Tan ve diğerleri, 2015; Zhao and Zhao, 2013).

Oksidatif stres ve tau

Nöronlardaki mikrotübüllerin bir arada ve stabil bir şekilde tutulmasını sağlayan tau proteinin asetilasyon, ubikikasyon, glikosilasyon ve fosforilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonları, protein agregasyonu sonucu oluşan nörofibriler yumakların (NFY'ler) başlıca nedenidir (Şekil 2.6). Bu post-translasyonel modifikasyonlardan en kapsamlı incelenen fosforilasyonudur (Alonso ve diğerleri, 2018; Graham ve diğerleri, 2017). Oksidatif stresin tau proteinin hiperfosforilasyonuna üç farklı şekilde yol açtığı

düşünülmektedir. İlki, glikojen sentaz kinaz 3-beta (GSK-3 β), hücre dışı sinyalle düzenlenen protein kinaz (ERK-2), sikline bağımlı kinaz (CDK) ve protein fosfataz 2A gibi tau proteinin düzenleyicisi olan protein kinazların ve fosfatazların oksidatif stres tarafından direk olarak modülasyonudur (Liu ve diğerleri, 2017c). İkincisi, oksidatif strese yanıt olarak transkripsiyon faktörü NF κ B'nin hızlı ve güçlü bir şekilde aktive olabilmesidir. Üçüncüsü ise oksidatif stres tarafından indüklenen lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ve araşidonik asidin bir peroksidasyon ürünü olan akrolein aracılığıyla hiperfosforile patolojik tau formunun oluşumudur (Cioffi ve diğerleri, 2019). Oksidatif stres ile hiperfosforilasyona indüklenen tau proteinini nörofibril yumakların oluşumuna, mikrotübül bozukluklarına ve sinaptik kayıplara neden olmaktadır (Huang ve diğerleri, 2016a; Liu ve diğerleri, 2017c; Zhao and Zhao, 2013).



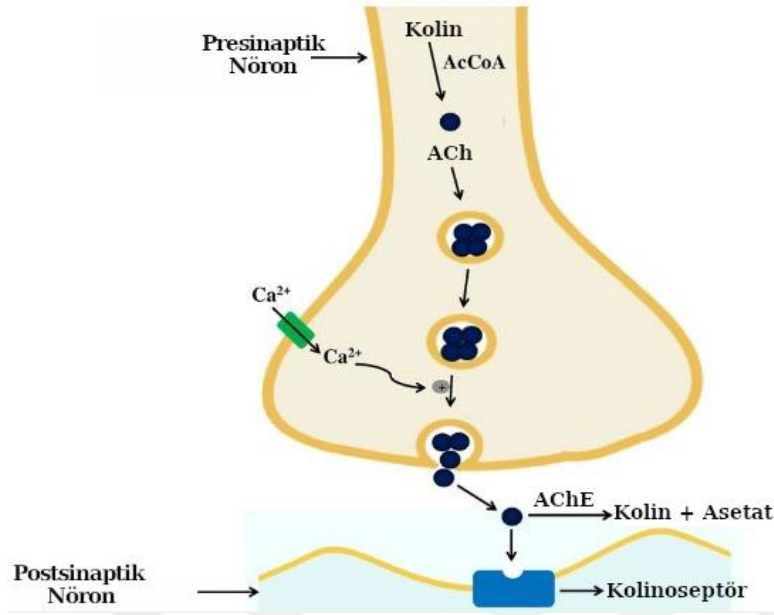
Şekil 2.6. Oksidatif stres ile indüklenen tau aracılı nörodejenerasyon (Duan ve diğerleri, 2012).

2.5. Oksidatif Strese Bağlı Kolinerjik Aktivitenin Bozulması

Kolinerjik aktivite dikkat, öğrenme, hafıza, strese cevap, uyanıklık ve uyku gibi kritik fizyolojik süreçlerde yer alan bir mekanizmadır ve kolinerjik iletim ağı tarafından düzenlenmektedir (Bekdash, 2021; Hampel ve diğerleri, 2018). Kolinerjik iletim esasen nörotransmitterlerin sentezini, depolanmasını, taşınmasını ve imha edilmesini içeren bir süreçtir ve bu süreçte rol oynayan proteinler sayesinde gerçekleşmektedir (H. Ferreira-Vieira ve diğerleri, 2016).

Nöronal sistemin başlıca nörotransmitteri olan asetilkolin (ACh) bu proteinlerden biridir ve kolinerjik sistemdeki pre-sinaptik terminalde asetilCoA ve kolin asetiltransferaz (ChAT) enzimleri tarafından sentezlenmektedir. Hücreler arası iletişim, ACh'nin pre-sinaptik hücreden post-sinaptik hücredeki muskarinik veya nikotinik reseptörlere aktarılması ile gerçekleşmektedir. Aktarım sonrası reseptördeki ACh, asetilkolinesteraz (AChE) enzimi sayesinde asetat ve kolin'e hidrolize edilmektedir. Hidroliz işleminin gerçekleşmesi ile birlikte sinaptik iletim başarılı bir şekilde sonlandırılmaktadır (Şekil 2.7) (Hampel ve diğerleri, 2018; Suganthi ve diğerleri, 2009).

Ancak oksidatif stres gibi çeşitli faktörlerin, bu enzimlerin sentezini, salınımını ve alımını direk veya iyon kanal ve reseptörlerinin işlevinin bozması aracılığıyla etkileyebileceği bilinmektedir (Hegazy ve diğerleri, 2016; Xu ve diğerleri, 2016b). Ayrıca, kolinerjik iletimde hem pre-sinaptik hem de post-sinaptik etkilere sahip olduğu bilinen ATP ve ara ürünlerinin oksidatif stres nedeniyle üretimlerinin azaldığı bilinmekte olup, bu azalışın da enzimlerin normal işleyişini etkileyebileceği gösterilmiştir (Cioffi ve diğerleri, 2019; Ziganshin ve diğerleri, 2020). Bununla birlikte, oksidatif stresin merkezi role sahip olduğu AD ve AD gibi nörodejeneratif hastalıklar için ChAT ve ACh'nin azalışı buna karşın AChE'nin artışı ortak bir patolojidir (Campanari ve diğerleri, 2016; H. Ferreira-Vieira ve diğerleri, 2016; Liu, 2020; Sun ve diğerleri, 2019). Ve bu proteinlerin yapı veya fonksiyonlarındaki değişiklikler kolinerjik iletimin aksamasına ve dolayısıyla nörodejenerasyona neden olmaktadır (Paraoanu and Laver, 2008).

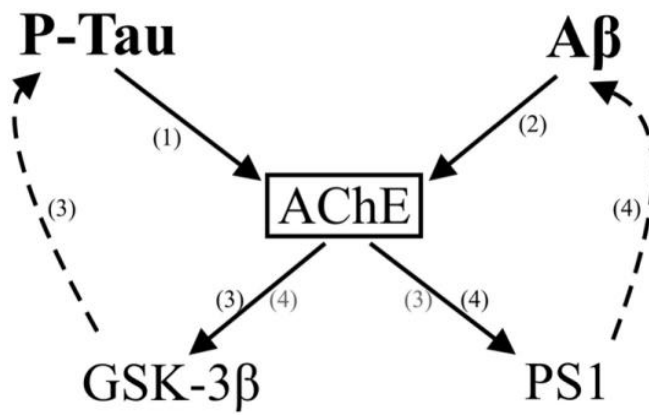


Şekil 2.7. Kolinerjik iletimin şematik gösterimi. AcCoA: Asetil koenzim A, ACh: Asetilkolin, AChE: Asetilkolin esteraz (Kabir ve diğerleri, 2019b)

2.6. Kolinerjik Aktivitenin Alzheimer Hastalığı ile İlişkisi

Kolinerjik aktivite kaybı ile AH arasındaki ilişkinin ise temelde iki yönü bulunmaktadır. Bunlardan ilki kolinerjik sistemin ana nörotransmitteri olan ACh'nin konsantrasyonundaki ve hidrolizindeki dengesizliktir (Wong ve diğerleri, 2020). Oksidatif stres kaynaklı AH patolojisi ile birlikte kolinerjik nörotransmisyonu, ACh'yi hidrolize etmek suretiyle, sonlandıran nöromusküler kavşaktaki AChE etkinliğinin aşırı artışı ve bunun ACh metabolizmasındaki dengeyi bozduğu bilinmektedir. Nöral iletimin aksamasına neden olan bu kolinerjik açık nöral dejenerasyona neden olmaktadır (H. Ferreira-Vieira ve diğerleri, 2016; Wong ve diğerleri, 2020). İkincil olarak ise, AChE'nin yakından ilişkili olduğu diğer AH patolojileri ile de AH'deki nörodejenerasyona aracılık ettiği bilinmektedir. Bir çalışmada AChE'nin A β ile ilişkili presenilin 1 gibi proteinlere bağlanarak, plak oluşumunu hızlandırdığı ve nöral toksisiteye katkı da bulunduğu raporlanmıştır. Hatta bu nörotoksisitenin (A β -AChE kompleksi) yalnızca A β 'nin neden olduğu toksisiteden daha yüksek ve yıkıcı olduğu da bildirilmiştir (Sun ve diğerleri, 2019). AChE, A β oluşumunun yanı sıra tau hiperfosforilasyon yollarını da etkileyerek nörodejenerasyona neden olmaktadır. Bazı AChE varyantının aşırı ekspresyonunun tau hiperfosforilasyonunu indükleyen tau kinazları aktive ederek, patolojik tau oluşumunu artırdığı bilinmektedir. Üstelik AChE'nin A β ve tau ile olan ilişkisinde Şekil 2.8'de de görüldüğü üzere çift yönlü

bir etkileşim söz konusudur (García-Ayllón ve diğerleri, 2011). Diğer bir yandan, AChE'nin aşırı ekspresyonunun AH'deki nöral morfolojik bozukluklara ve kaspaz-3 aktivasyonuna bağlı hücre ölümünün tetiklenmesine de neden olabileceği ortaya konulmuştur (Lazarevic-Pasti ve diğerleri, 2017). Venkatesan ve arkadaşları tarafından AChE indüklü apoptotik yolların aktivasyonuna ve sitotoksositeye, azalan hücrel reseptör aktivitelere bağlı olarak oluşan mitokondriyal disfonksiyonun ve ROS oluşumunun aracılık ettiği bildirilmiştir (Venkatesan ve diğerleri, 2016). Tüm bunlar hem kolinerjik iletimin hem de nöral sinyalleri gönderecek ve alacak nöronların kaybı ile sonuçlanmaktadır (Wong ve diğerleri, 2020).

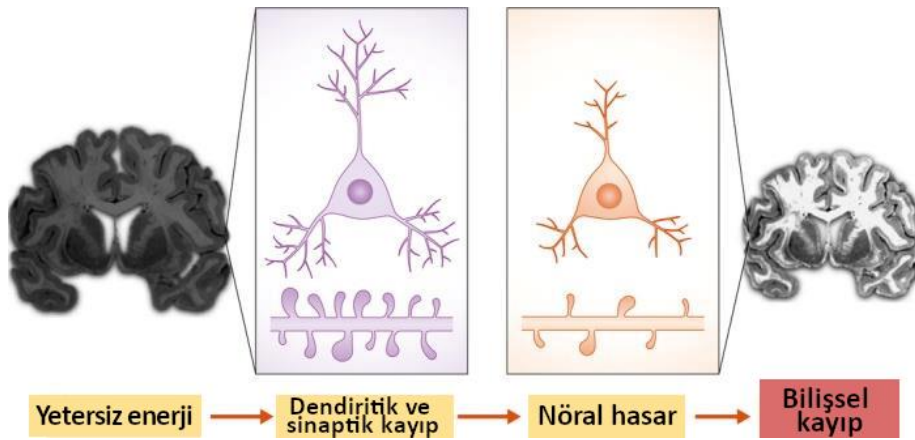


Şekil 2.8. AChE, Aβ ve tau arasındaki çoklu ilişki. (1) hiperfosforile edilmiş tau AChE aktivitesinin artmasına neden olabilmektedir. Diğer yandan, (3) N-terminal olarak uzatılmış AChE varyantının aşırı ekspresyonu da, tau hiperfosforilasyonunu indükleyen GSK-3β tau kinazını aktive etmektedir. Bunu ile birlikte, (2) Aβ oluşumu da AChE aktivitesinin artmasına yol açabilmektedir ve (4) γ-sekretazın katalitik alt birimi olan PS1'in AChE ile modülasyonu sonucu Aβ oluşumun tetiklenebilir (García-Ayllón ve diğerleri, 2011)

2.7. Alzheimer Hastalığında Nörit Gelişimi ve Nöral Morfoloji

Nörodejenerasyon, nöronların yapısal ve fonksiyonel açıdan işlevlerini yitirmeye başlayıp, ilerleyici şekilde devam eden ve nöron ölümüyle son bulan süreçleri ifade etmektedir (Gao and Hong, 2008). Normal nöronal süreçlerin gerçekleştirilmesi ve sürdürülmesi açısından önemli olan moleküllerin işlevsizliği beraberinde nöral morfolojik bozuklukları da getirmektedir (Benussi ve diğerleri, 2017; Tusi ve diğerleri, 2012). Bu sebepten nöral morfolojik değişimler nörodejeneratif hastalıkların anahtar bulgularından bir olarak görülmektedir (Rehbach ve diğerleri, 2019). AH'de de özellikle kolinerjik hücrelerde ciddi nöronal dejenerasyonlarının gerçekleştiği ve nihayetinde dejenerasyonun şiddetine bağlı olarak nöronal hücrel ölümün meydana gelebildiği bilinmektedir (Tusi ve diğerleri, 2012).

Hüresel morfolojideki patolojik değişimlere AH fizyolojisindeki pek çok sürecin neden olabileceğine dair kanıtlar mevcuttur. Bu kanıtlardan biri, oksidatif stresin nöron hücrelerindeki aksonal ve dendritik uzantıların sayısında azalmalara ve boyutlarında kısılmalara neden olmasıdır (Castelli ve diğerleri, 2019). Bazı araştırmalarda bunlara ek olarak, oksidatif stres ile nöral hücre genişliğinin ve polaritesinin arttığı raporlanmıştır (Şekil 2.9) (Ashabi ve diğerleri, 2013; Tusi ve diğerleri, 2012; Wang ve diğerleri, 2016). Diğer yandan oksidatif stresin hem hücre membranındaki hem de organel membranlarındaki peroksidasyon nedeniyle hücre ve organel dinamiğini bozduğu bilinmektedir. Nöral uzantıların organizasyonundaki ve işlevindeki değişimlere bu bozulmanın da aracılık ettiği düşünülmektedir. Ayrıca, peroksidasyon beyin biyoenerjisi için zararlı olan sinaps bölgelerindeki enerji desteğinin azalması yoluyla da sinaptik bağlantıların kaybına neden olabilmektedir (Tönnies ve Trushina, 2017). Bunun yanı sıra, AChE inhibitörlerinin nörit gelişimini desteklediği farklı çalışmalar ile ortaya konulmuş olup, kolinerjik aktivitedeki kayıpların nöral morfolojik değişim ile yakından ilişkili olabileceğini gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır (Kawashiri ve diğerleri, 2019; Terada ve diğerleri, 2018; Yang ve diğerleri, 2020). Diğer yandan, Aβ plakları hem agregat oluşturarak hem de reseptör ve kanallara bağlanması sonucu bozduğu iyon homeostazisi ile nöral uzantılara zarar vermekte ve sinyalleşmeyi engellemektedir (Karisetty ve diğerleri, 2020). Hiperfosforile tau proteininin ise hem nöral uzantılardaki mikrotübüllerin yapısından ayrılarak hem de ayrılma sonrası sinaptik vezikül proteinlere bağlanarak, nöral uzantıların ve sinaptik bağların kaybına neden olmaktadır (Alonso ve diğerleri, 2018; Di ve diğerleri, 2016).



Şekil 2.9. Oksidatif stresin neden olduğu nöral morfolojik değişimler. Dejenerasyon süreçleri ile birlikte zarar gören nöronlardaki (sağdaki) dendritik dallanmanın boyutunda, şeklinde ve yoğunluğunda değişiklikler meydana gelmektedir. Bu durum nöronal fonksiyonlardaki bozulmaların yanı sıra, hafıza ve öğrenme güçlüklerine de yol açmaktadır (Camandola ve Mattson, 2017)

2.8. Nörodejenerasyona Aracılık Eden Nöral Ölüm Yolakları

Sinir sisteminin oluşumu ve gelişimi sırasında aşırı nöronların ortadan kaldırılması, nöronal yapının oluşması için gerekli olsa da, özellikle yaşlı beyinlerdeki anormal nöron kaybı AH'nin ciddi patolojilerinden biri olarak kabul edilmektedir (Fricker ve diğerleri, 2018). AH patolojisine eşlik ederek, nöronların kaybına neden olan ölüm yolaklarının başında ise apoptoz, nekroz ve ferroptozis gelmektedir.

2.8.1. Apoptozis

Programlanmış bir hücre ölüm tipi olan apoptoz, nörodejenerasyonun ana nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Xu ve diğerleri, 2016b). Sitomorfolojik olarak büzülme, kromozom yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonu ile karakterize edilen apoptoz dışsal veya içsel sinyaller tarafından teşvik edilmektedir. Dışsal yolda, apoptoz ile yakından ilişkili reseptörlere hücre dışı ligandların bağlanması yoluyla aktive edilirken, içsel yolda hücre içi moleküllerin hasarı gibi dâhili uyarılarla pro-apoptotik öğeleri etkinleştirilmesi ile aktive edilmektedir. Her iki yolak da nöronal apoptoz için gerekli olan kaspaz-3'ün aktivasyonuna neden olmaktadır ve nihayetinde hücre içi ölüm meydana gelmektedir (Chi ve diğerleri, 2018).

2.8.2. Nekrozis

Hücre ölümündeki bir diğer alternatif mekanizmada hücrenin şişmesi ve hücre zar bütünlüğü bozulması ile karakterize edilen nekrozdur. Nekrozda DNA kırılması da sürece dâhil olmaktadır ancak apoptozdan farklı olarak kromozom yoğunlaşması saptanmamaktadır. Tanımlanmış farklı nekroz tipleri bulunmaktadır. Bunlar arasında en iyi karakterize edileni nekroptoz'dur. Geçmişte, nekrotik hücre ölümünün programlanmadığı ve bu sebepten de hücre içi belirteçlerinin olmadığı düşünülmekteydi. Ancak, günümüzde nekroptozun başlamasına tümör nekroz faktörü (TNF) gibi spesifik ölüm reseptörlerinin veya Toll benzeri reseptörlerin aktivasyonunun aracılık edebildiği bilinmektedir (Chi ve diğerleri, 2018). Nekroptozun moleküler mekanizması incelendiğinde TNF reseptör 1'in (TNFR1) aşağı akışında, reseptörle etkileşime giren kinaz proteini 1 ve 3'ü (RIPK1/3) içeren kompleks bulunmaktadır. Bu kompleks tarafından oligomerizasyonun indüklenmesi amacıyla karışık soy kinaz alanı proteini (MLKL) fosforile etmektedir. Fosforillenmiş MLKL daha sonra

plazma zarında gözenekler oluşturarak hücreden pro-inflamatuar faktörlerin salınmasına ve nöral ölüme yol açmaktadır (Andreone ve diğerleri, 2020).

2.8.3. Otofaji

Otofaji, hasarlı organellerin ve makromoleküllerin parçalandığı bir süreçtir. Bu parçalama işlemine polisakkaroz, fosfolipit, nükleik asit ve protein gibi hücresel molekülleri hidrolize edebilen 60 asidik enzim içeren lizozomlar aracılık etmektedir. Otofaji, protein yıkımı, organel döngüsü ve oksidatif strese cevap gibi birçok fizyolojik fonksiyona sahiptir. Otofaji, yanlış katlanmış proteinlerin, zararlı metabolitlerin ve yaşlanan organellerin ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır. Bu nedenle de hem hücresel homeostazisin korunmasında önemli bir role sahiptir. Öte yandan, diğer hücrelerin aksine, post-mitotik hücreler olan nöronlar, toksik maddelerden mitoz yoluyla kurtulamamaktadır. Bu nedenle otofajinin hücre büyümesi ve gelişiminin yanı sıra AH patogenezinin oluşumunun engellenmesinde de etkin olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle oluşan ve ilerleyen patogeneze ile otofajik disfonksiyonun ilişkili olduğuna inanılmaktadır (Kocaturk ve Gozuacik, 2017). Otofaji mikrootofaji, makrootofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere 3'e ayrılmaktadır. Otofaji türleri arasında AH patolojisine en büyük katkıya makrootofaji neden olmaktadır (Bonci ve diğerleri, 2015).

2.8.4. Ferroptozis

Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile nöronlarda eksitotoksik stres tarafından tetiklenebilen ve ferroptoz adı verilen bir başka ölüm yolu daha tanımlanmıştır. Ferroptoz, lipid peroksidlerin birikmesi ile karakterize edilen, apoptotik olmayan, düzenlenmiş bir tür hücre ölümüdür (Gaschler ve Stockwell, 2016). Ferroptoz, hücre morfolojisi ve işlevi açısından apoptoz ve nekroza benzemektedir. Sitoplazma ve organellerin şişmesi ve hücre zarının yırtılması gibi tipik nekrozun morfolojik özelliklerine sahip olmadığı gibi hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması, apoptotik cisimlerin oluşumu ve hücre zarının yırtılması gibi hücre apoptozun özelliklerini de taşımamaktadır. Ferroptoz membran yoğunluğunun artması, mitokondriyal kristanın azalması veya kaybolması ve mitokondrinin bariz bir şekilde büzülmesi ile karakterizedir. Ancak, hücre zarında, çekirdek boyutunda ve kromatin konsantrasyonunda herhangi bir bozulma gözlemlenmez. Ferroptoz, çoklu doymamış yağ asitlerinin demire bağlı lipid peroksidasyonunu neticesinde oluşan bir ölüm tipidir (Li vd.,

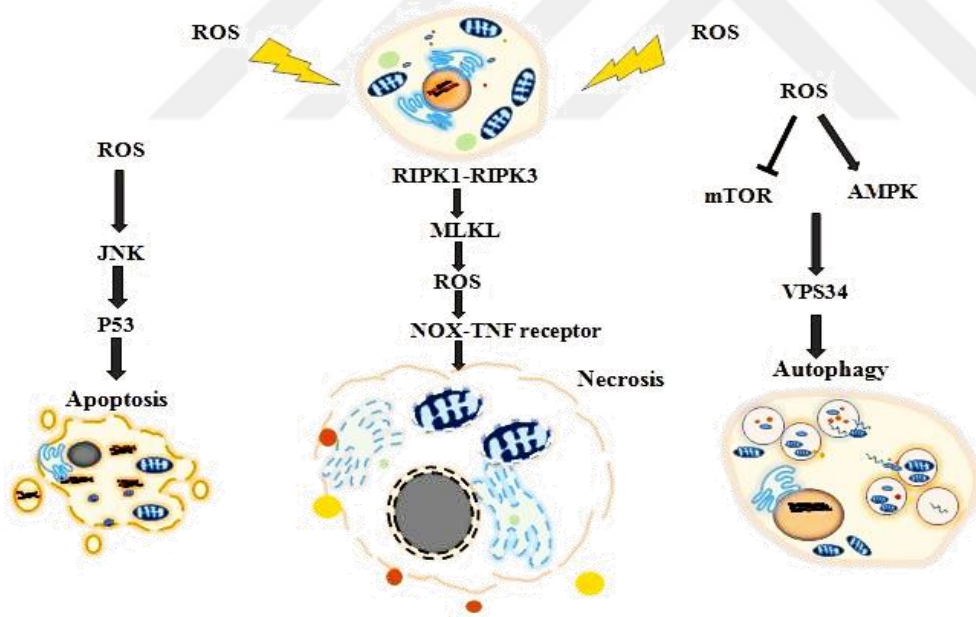
2020). Ferroptozu indükleyen elemanlar dört kategoriye ayrılmıştır. Bunlar Xc-, fosfolipit çift tabakalarındaki bir aminoasit anti-taşıyıcısı olan sistem Xc-inhibitörleri, lipid peroksidasyonun ana düzenleyicilerinde olan glutatyon peroksidaz-4 enzim (GPx4) inhibitörleri ve hücre içi iyon dengesinden sorumlu olan voltaj bağımlı iyon kanal modülatörleridir. Ayrıca, son zamanlarda asetilasyon eksikliği olan tümör protein 53 (P53) mutantlarının da ferroptozu teşvik ettiği tespit edilmiştir (Li ve diğerleri, 2020a).

2.9. Alzheimer Hastalığının Patolojisi ile Nöral Hücresel Ölüm Arasındaki İlişki

Nörodejenerasyon, nöronlardaki işlev ve yapı kaybının nihayetinde hücre ölümüne yol açtığı bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Nöronal kayıpların apoptoz, nekroz ve ferroptoz başta olmak üzere çeşitli ölüm yolları aracılığıyla gerçekleştiği, böylelikle AH ve AH gibi nörodejeneratif hastalıklardaki patolojisinin ağırlaşmasına neden olduğu bilinmektedir. Bu hücresel ölüm yollarının tetiklenmesine majör etiyolojik faktörler neden olmaktadır (Telegina ve diğerleri, 2019). Bunlardan biri olan ROS ile indüklenen oksidatif stres, Şekil 2.10'de de özetlendiği gibi strese duyarlı kinazlar ve sinyal yolları aracılığıyla hücresel ölüm yollarının aktivasyonuna neden olmaktadır (He ve diğerleri, 2017). AH'nin ana belirteçleri olan ve oksidatif stres tarafında oluşumları indüklenen patolojik A β plakları ve hiperfosforile tau proteini nöronlardaki hücresel ölümüne birkaç farklı şekilde neden olabildiği bilinmektedir. A β 'nin neden olduğu hücre zarı elastikiyetindeki kayıp nöronları hücre ölümüne karşı daha duyarlı hale getirmektedir. Diğer yandan A β plakları ve hiperfosforile tau, NMDA reseptör aktivasyonu ile ilişkili hücre iskeletinde ve sinapslarda bozukluklara neden olmaktadır. Bu bozuklukların hücre içerisine aşırı miktarda Ca⁺² girişine yol açması kalpain aktivasyonuna ve mitokondriyal ölüm yolları aracılığıyla ölüme neden olabilmektedir. Ayrıca, hem A β plaklarının hem de hiperfosforile tau proteinin nöronlardaki hücre döngü homeostazisinin bozulması yoluyla da nöronları apoptotik ölüme yönlendirilebileceği düşünülmektedir (Chi ve diğerleri, 2018; Z. Liu ve diğerleri, 2017c).

A β ve tau'nun yanı sıra, oksidatif stres sonucu hücre ve organel membranlarında meydana gelen lipid peroksidasyonu nedeniyle oluşan 4-hidroksinonenalın gibi peroksidasyon ürünleri de p53, JNK (c-Jun N-terminal kinazlar), Fas, mTOR (rapamisin protein kompleksinin memeli hedef), MKLK ve Gpx4 gibi apoptoz, nekroz, otofaji ve ferroptoz aktörleri ile etkileşme girerek, nöral hücresel ölümü tetikleyebilmektedir (Cassidy ve diğerleri, 2020; Xie ve diğerleri, 2020). Bunun yanı sıra, oksidatif stresin bozduğu oksidan-antioksidan dengesi,

hem redoks sinyalinin ve kontrolünün bozulması ile direk olarak hem de antioksidan sistem tarafından dengelenmeyen serbest radikallerin hücresel bileşenlere bağlanması yoluyla hücresel ölüm yollarının aktivasyonuna neden olmaktadır (Jantas ve Lasoń, 2021). Öte yandan kolinerjik patolojinin de nöral ölüm ile yakından ilişkili olduğu, kolinerjik kaybın ana nedenlerinden biri olan AChE'nin apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) ve sitokrom C gibi apoptotik yolda görevli elemanlar ile etkileşimi sonucu kaspaz-9 ve-3 aracılı apoptozun oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (Işık ve Beydemir, 2019; Knorr ve diğerleri, 2020; Lazarevic-Pasti ve diğerleri, 2017). Ayrıca, ROS tarafından tetiklenen akson ve hücre gövdesindeki dejenerasyona sırasıyla RIPK1, RIPK3 ve MLKL'ye gibi nekrotik ve protein kinaz B (Akt) gibi apoptotik ölüm sinyal yollarının eşlik ettiği ortaya konmuştur (Hoy ve diğerleri, 2017; Posner ve diğerleri, 2008; Salvadores ve diğerleri, 2020). Ek olarak, oksidatif stres ile indüklenabilen bazı peptitler ($A\beta$ gibi) aksonal budama ve nöronal hücre ölümünü başlatan ölüm reseptörü 6 için ligand görevi görerek de, hücre ölümüne katkıda bulunmaktadır (Cassidy ve diğerleri, 2020).



Şekil 2.10. Oksidatif stres ile indüklenen AH'deki ana ölüm yolları. Nöronlarda ROS tarafından indüklenen apoptotik, nekrotik ve otofajik ölüm yollarının aşağı akış şeması (He ve diğerleri, 2017)

2.10. Alzheimer Hastalığındaki Tedavi Yaklaşımları

FDA tarafından onaylanmış, klinikte kullanılan AH tedavileri kolinerjik iletimi hedef alan AChE inhibitörleri, NMDA reseptörünü hedef alan NMDA antagonistleri ve A β 'nın klirensini hedef alan antikor tedavisinden oluşmaktadır (İnternet 1; Petch ve Bressington, 2021).

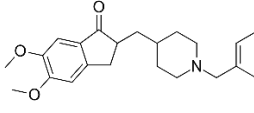
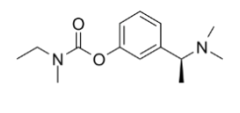
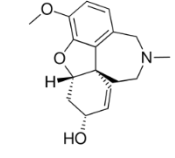
2.10.1. AChE inhibitörleri

AH için kullanılan AChE inhibitörleri nörosinaptik iletimde önemli role sahip olan ACh'nin hidrolizi yoluyla kolinerjik iletimin aksamasına neden olana aşırı AChE aktivitesinin baskılanmasını hedeflemektedir. Donepezil, rivastigmin ve galantamin FDA tarafından onaylanmış ve klinik olarak da kullanılmakta olan AChE inhibitörleridir.

AH'ye yönelik bu üç tedavi hakkında detaylı bilgi Çizelge 2.1'de verilmiştir (Cummins ve diğerleri, 2018; Hampel, 2012). Bunlardan rivastigminin ve galantamin bitkisel kaynaklı AChE inhibitörleridir. Rivastigminin *Physostigma venenosum*'dan izole edilen ve sekonder bir metabolit olan fizostigminin alkaloidinin sentetik bir türevidir (Pinho ve diğerleri, 2013). İzokinolin grubu bir alkaloid olan galantamin ise *Galanthus woronowii*'den izole edilmekte olup, AChE inhibisyonunun yanı sıra nikotinik reseptörlerin allosterik modülasyonunu ve nörotransmitter salınımının artırılması sağlamaktadır. Hem bu çoklu etki mekanizması ve oral emiliminin %100 olması sebebiyle galantamin en çok reçete edilen AChE inhibitörüdür (Korabecny ve diğerleri, 2015).

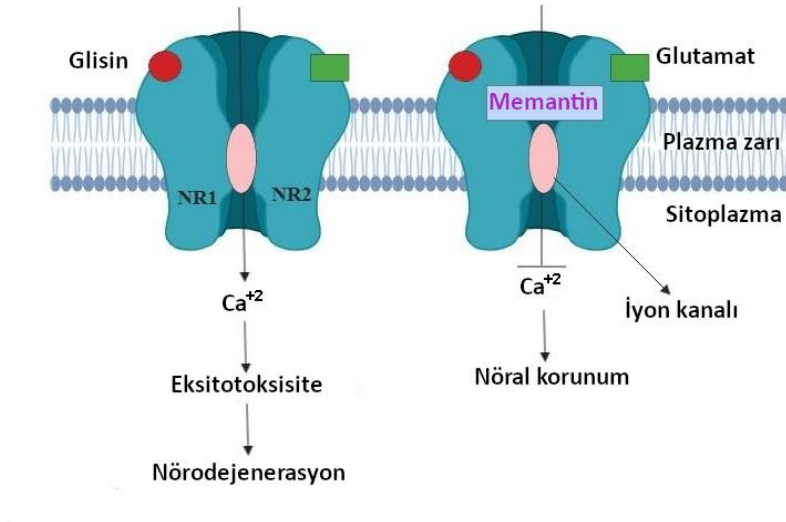
Ancak AChE inhibitörleri tedavi sağlamamakta olup, yalnızca yaşam kalitesindeki düşüşü yavaşlatmak amacıyla palyatif tedavi olarak uygulanmaktadırlar (Graham ve diğerleri, 2017). Bunun yanı sıra, bu ilaçlar hepatotoksisite ve gastrointestinal sorunlar gibi yan etkileri nedeniyle klinik kullanım için ideal değildir (Labrou Editor, 2020; Zambrano ve diğerleri, 2019). Bu nedenle, çoklu etki mekanizmasına sahip alternatif AChE inhibitörlerinin keşfedilmesi kritik öneme sahiptir (Dos Santos ve diğerleri, 2018; Xu ve diğerleri, 2016b).

Çizelge 2.1. Klinik olarak kullanılan AChE inhibitörleri ve özellikleri

	AChE inhibitörleri		
	Donepezil	Rivastigmin	Galantamin
Yapısı			
Kimyasal sınıflandırması	Piperidin türevi	Karbamat	İzokinolin alkaloid
İnhibisyon türü	Rekabetçi olmayan, hızlı geri dönüşümlü	Rekabetçi, yavaş geri dönüşümlü	Rekabetçi, hızlı geri dönüşümlü
Metabolizması	CYP2D6 ve 3A4	AChE ve BChE	CYP2D6 ve 3A4
İlaç formülasyonunun türü	Tabletler	Transdermal bantlar, solüsyonlar ve kapsüller	Tabletler, solüsyonlar, kontrol salımlı tabletler
Plazma yarılanma ömrü	70 saat	3 saat (bantlar) 1 saat (kapsül)	7 saat

2.10.2. N-metil-D-aspartat reseptör antagonisti

NMDA reseptörleri, hemen hemen tüm omurgalı uyarıcı sinapslarda bulunan öğrenme ve hafıza dahil olmak üzere temel sinir sistemi işlevlerinde merkezi rol oynayan iyonotropik glutamat reseptörleridir. NMDA reseptörlerinin açık durumda olması çoğunlukla hücre içersine Sodyum (Na^+), potasyum (K^+) ve kalsiyum (Ca^{+2}) akışına aracılık etmektedir; bu durum hem fizyolojik hem de patolojik etkiler açısından oldukça kritiktir. Magnezyum (Mg^{+2}), Çinko (Zn^{+2}), nörosteroidler ve yağ asitleri gibi birçok endojen madde NMDA reseptörlerinin aktivitesini modüle ederek, hücre içi homeostazisin bozulmasına ve NMDA aracılı nörotoksisiteye neden olmaktadır (Şekil 2.11). FDA tarafından onaylanmış faz 4 aşamasındaki bir diğer bileşik olan Memantin ise Mg^{+2} iyonlarından daha yüksek afinite ile NMDA reseptörlerine bağlanabilen antagonist bir ajandır. Reseptördeki iyon kanalını işgal ederek, iyon akışını durdurmakta ve böylelikle nörotoksisiteye aracılık eden NMDA reseptörleri inhibe etmektedir (Johnson ve diğerleri, 2015; Tan ve diğerleri, 2012). Ancak memantin palyatif tedavi olarak uygulandığını ve ciddi psikotomimetik sorunlara neden olduğu bilinmektedir (Graham ve diğerleri, 2017; Kabir ve diğerleri, 2019a).



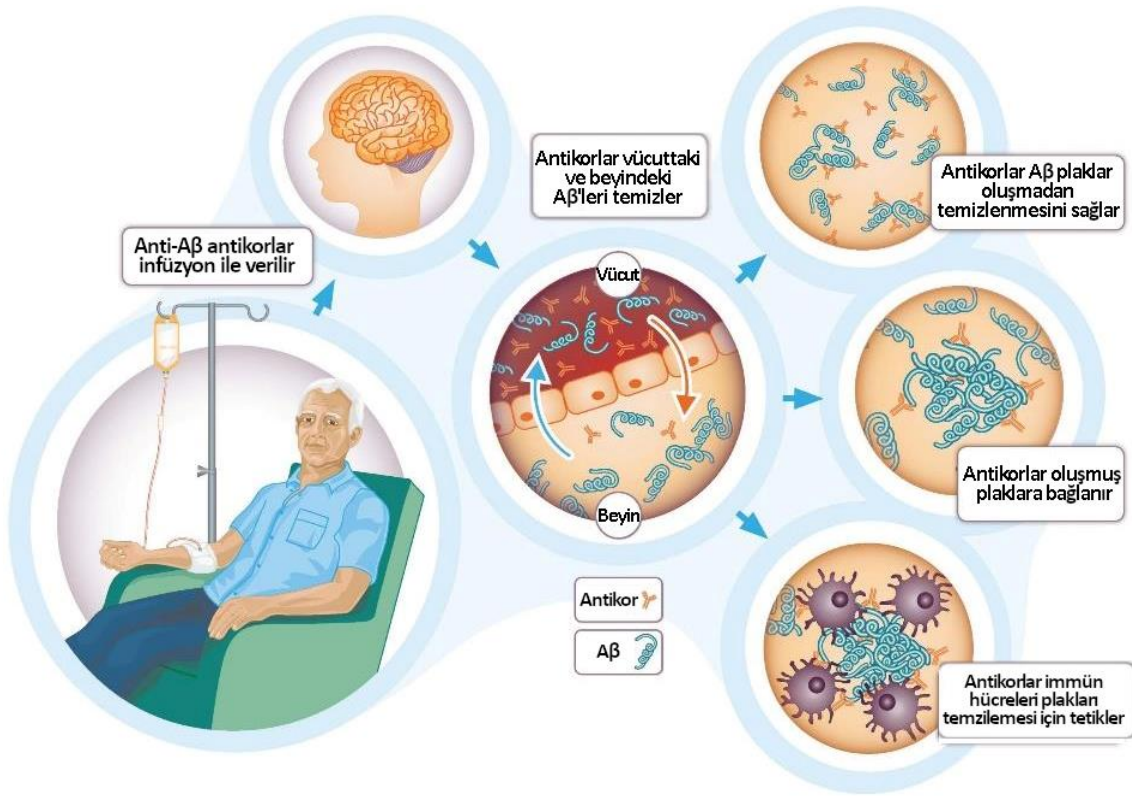
Şekil 2.11. Memantinin etki mekanizması. NR: N-metil-D-aspartat reseptörü; Ca^{+2} : Kalsiyum iyonu (Kabir ve diğerleri, 2019a)

2.10.3. Aβ antikor tedavisi

Aβ formunun oluşumu ve nöronal ortamlarda birikimi AH'nin ana biyobelirteçlerinden biri olarak görülmektedir ve patolojisinin klinik belirtilerden yaklaşık on yıl önce oluşmaya başladığına dair kanıtlar mevcuttur. Bu sebepten Aβ uzun yıllardır AH tedavisi için iyi bir hedef olarak görülmektedir. Ancak bu yılın başlarına kadar Aβ hedefli onaylanmış herhangi bir tedavi bulunmamaktaydı. Klinik olarak kullanımı yeni onaylanan Aducanumab hem Aβ'ya yönelik klinik olarak kullanımı onaylanan ilk ajan, hem de AH için kabul gören ilk antikor tedavisi olma özelliğini taşımaktadır (Marasco, 2020).

Aducanumab, insan immünoglobulin gama 1 (IgG1) monoklonal antikor olarak sınıflandırılan bir immünoterapötiktir. Kan-beyin bariyerini geçerek, beyindeki Aβ'nın monomer, agregasyona uğramış çözünebilir oligomer ve çözünmeyen fibriller konformasyonları seçici olarak hedeflemektedir. Etki mekanizmasını ise, Aβ oligomer veya fibrillerinin N-terminalindeki 3 ila 7 arasındaki aminoasitten oluşan doğrusal bir epitopa bağlanarak, Aβ'nın klirensini sağlamaktadır (Şekil 2.12) (Linse ve diğerleri, 2020; Padda ve Parmar, 2021). Diğer yandan, Aβ'nın klirensi yoluyla erken evrede hastalığın aşağı akış yollarını durdurup-durdurmayacağı henüz açık değildir. Durdurabilse dahi Aβ'yı patolojik eşik altındaki bir seviyeye getirmesinin ne kadar zaman alacağı ve bunun için tekrarlanan dozların gerekip-gerekmeyeceği belirsizdir (Lalli ve diğerleri, 2021).

Ayrıca hastalık seyrinin erken indüklenmesine neden olabileceği yönünde tartışmalar mevcuttur (Padda ve Parmar, 2021). Klinik denemeleri daha çok yeni olan ve çok kısıtlı bir popülasyon üzerinde etkinliği denenilen aducanumabın baş ağrısı, düşme ve ishal gibi hafif yan etkilerinin yanı sıra bazı hastalarda ölüme neden olduğu raporlanmış olup, uzun dönemdeki etkisi ile ilgili endişe duyulmaktadır (Scheltens ve Vijverberg, 2021; Selkoe, 2019).



Şekil 2.12. Aducanumab'ın uygulandığı ve moleküler etki mekanizması. Aducanumab plak oluşumunu engelleyerek, oluşan plaklara bağlanarak ve Aβ'yı ortadan kaldırması için immün hücreleri uyatarak Aβ klirensini artırmaktadır (İnternet 2)

2.11. Alzheimer Hastalığına Yönelik İlaç Geliştirme Çalışmaları ve Hedefleri

Güncel terapötik yaklaşımların tedavi sağlayamaması ve giderek daha da artacak olan AH ve AH benzeri nörodejeneratif hastalıklara bağlı morbidite ve mortalite oranları tedavide etkin olabilecek yeni ilaç etken maddelerinin keşfini ve geliştirilmesini önemli kılmaktadır (Conrado ve diğerleri, 2020; Cummings ve diğerleri, 2019; Girdhar ve diğerleri, 2015).

İlaç etken maddelerinin genelde şu üç özelliği taşınması beklenmektedir;

1. Biyolojik hedefine karşı seçicilik göstermesi,
2. Etkisinin doza bağlı olması,
3. Etkisinin geçici olması

Bu üç genel özelliğin dışında nörodejeneratif hastalılar için ilaç etken maddesi olabilecek etkin ve başarılı bileşiklerin keşfedilmesi ve/veya geliştirilmesinde bileşiğin farmakokinetik ve farmakodinamik etki bakımında bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir (Akkan, 2014).

2.11.1. Alzheimer hastalığı için farmakokinetik hedefler

Farmakokinetik, bir ilaç adayının canlı bir organizmanın üzerindeki etkilerinin incelenmesi olarak tanımlanmaktadır ve bileşiklerin vücuttaki konsantrasyon-zaman profilinin kinetiğini ile yakından ilişkili olan emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite (EDMA-T) profilinin araştırılması ile karakterize edilmektedir. Bu sebepten ilaç keşif ve geliştirme çalışmalarında etken maddenin güvenilirliğinin ve etkinliğinin değerlendirilmesi açısından farmakokinetik özelliklerin belirlenmesi önemli bir yere sahiptir (Dunnington ve diğerleri, 2018; Reichel ve Lienau, 2015).

İlaç etken maddelerinin emilimi

Emilim; bileşiklerin uygulama bölgesinden pasif difüzyon, filtrasyon, aktif taşıma, endositoz, ekzositoz vb. yollar ile başarılı bir şekilde sistemik dolaşıma taşınmasıdır. Vücutta akciğer ve deri gibi birkaç farklı emilim bölgesi bulunmasına karşın gastrointestinal sistem aracılı emilim en önemlisidir (Toomula ve diğerleri, 2011). Özellikle ilaç keşif ve geliştirme çalışmalarında oral olarak kullanımı hedeflenen ilaç adaylarının gastrointestinal sistemden emilerek yüksek verimli bir şekilde hedef dokuya ulaşması beklenmektedir. Gastrointestinal epitel hücre zarı, aralarında proteinlerin bulunduğu sıkıca paketlenmiş fosfolipitlerden oluşmaktadır ve ilaçların çift katmanlı lipit tabakasından geçerek sistemik dolaşıma ulaşması gerekmektedir. Bu sebepten ilaç etken madde adaylarının lipofilikliği ve çözünürlüğü emilim hızı ve derecesini etkileyen en önemli faktörlerdir (Alavijeh ve diğerleri, 2005; Tsantili-Kakoulidou, 2005). Bunlar dışında bileşiğin yüzey alanı ve

büyüklüğü, uygulanan doz, emilimin gerçekleşeceği membranın bütünlüğü ve emilim alanı da diğer önemli hususlardır (Ataei, 2018).

İlaç etken maddelerinin dağılımı

Dağılım, ilacın uygulama yerinden önce kan dolaşımına oradan da dokulara geri dönüşümlü transferi olarak tanımlanmaktadır. Dağılım hedeflenen bölge veya dokuya iletilen ilaç miktarının belirlenmesi açısından çok önemlidir. Bir ilacın dağılımını etkileyen başlıca faktörler; lipit çözünürlüğü, membran-plazma geçirgenliği ve pH'sı, plazmadaki ve çeşitli dokulardaki konsantrasyonu, taşıma proteinlerine ve dokulara bağlanma durumlarıdır (Alavijeh ve diğerleri, 2005; Toomula ve diğerleri, 2011).

İlaç etken maddelerinin metabolizması

Metabolizma, ilaç etken maddesi ana bileşiklerin enzimatik veya kimyasal reaksiyonlar sonucu metabolitlerine dönüştüğü biyotransformasyon sürecidir. Bu süreç ekzojen bileşiklerin vücuttan atılmalarını kolaylaştırmak için hidrofiliteleklerinin artırarak suda daha çözünür hale getirilmesini sağlamaktadır. Hidrofilikliğı artan bileşik böbrek yoluyla dolaşım sisteminden uzaklaştırılmaktadır. Vücuttaki ana metabolizma bölgesi karaciğerdir ve burada metabolik dönüşüm iki aşamada gerçekleşmektedir. Faz I metabolizma esas olarak sitokrom P450 enzimleri (CYP450) tarafından kataliz edilmektedir ve oksidasyon, indirgeme ve hidroliz reaksiyonlarını içermektedir. Çoğu zaman bu Faz I reaksiyonları etken maddeyi daha çözünür hale getirerek böbrekler yoluyla eliminasyonu kolaylaştırmaktadır. Faz I reaksiyonları genellikle faz II reaksiyonları için gerekli konjugasyon reaksiyon bölgelerini oluşturmaktadır ve Faz II metabolizması ile eliminasyonu daha da kolaylaştıracak konjugasyon reaksiyonlarından gerçekleşmektedir. Uygulama yolu, doz, genetik yatkınlık ve hastalık gibi durumlar ilaç etken maddelerin metabolizmasında etkileyen faktörlerdir (Alavijeh ve diğerleri, 2005; Toomula ve diğerleri, 2011).

İlaç etken maddelerinin atılımı

Atılım, ilaç ve diğer toksik maddelerin vücuttan uzaklaştırılmasını ifade etmektedir. Bu süreç karaciğer, akciğerler, ter, tükürük ve solunum gibi çeşitli yollar ile gerçekleşebildiği

gibi çoğunlukla, özellikle suda çözünür olanlar için, böbrekler yoluyla gerçekleşmektedir (Alavijeh ve diğerleri, 2005; Toomula ve diğerleri, 2011).

İlaç etken maddelerinin toksisitesi

Toksisite, bir maddenin, hücreler ve organlara zarar verme derecesini ifade etmektedir ve geç dönemdeki ilaç geliştirme çalışmalarındaki başarısızlıkların en önemli nedenlerinden biridir. Toksisite tahminleri akut toksisite, genotoksisite ve hERG (Human Ether-à-go-go-Related Gene) potasyum kanal toksisite olmak üzere farklı alt başlıklar ile değerlendirilmektedir.

AH'li hasta profilinin büyük bir çoğunlukla 65 yaş ve üstü bireylerden oluşması nedeniyle kalp kasılmasının düzenlenmesinde rol oynayan hERG üzerindeki toksisitesinin erken dönemde değerlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca, yaşa bağlı olarak diyabet, kardiyovasküler, metabolik ve sindirim bozuklukları yaşamaları nedeniyle bir başka ilaç kullanıyor olma ihtimalleri yüksektir. Bu sebepten AH'ye yönelik ilaç geliştirme çalışmalarında ilaç-ilac etkileşim potansiyelinin de araştırılarak erken dönemde ortaya konulması gerekmektedir (Dunnington ve diğerleri, 2018).

İlaç etken maddeleri ve Lipinski kuralları

Bir bileşiğin ilaç olabilme potansiyelinin değerlendirmesindeki bir diğer yöntem ise "Lipinsk'nin 5 Kuralı" olarak bilinen, ilaç benzeri bileşiklerin temel fizikokimyasal özelliklerine göre sınıflandırıldığı bir dizi parametrelerce uygunluğunun test edilmesidir.

Bu parametreler;

- 1) Moleküler ağırlık (MA) <500,
- 2) QPlog/Pow (Öngörülen oktanol / gaz partisyon katsayısı) <5,
- 3) Hidrojen bağ donörü ≤ 5 ,
- 4) Hidrojen bağ akseptörü ≤ 10 'dir.

Bu parametreler aslında çok güçlü bir fizikokimyasal mantığa dayanmaktadır. MA, molekülün boyutu ile yakından ilişkilidir ve MA arttıkça molekülün boyutu da artmaktadır.

Artan boyut bileşiğın su molekülleri ile arasında büyük bir boşluğın oluşmasına ve çözünürlüğün azalmasına neden olmaktadır. Bu durumda bağırsak epitelinin yüzeyindeki etken madde konsantrasyonunu ve dolayısıyla emilimin azaltmasına neden olmaktadır. QPlog/Pow değerinin artırılması da lipofilikliğin artırmakta, suda çözünürlüğü ve emilimi ise azaltmaktadır. Diğer yandan, hidrojen bağları suda çözünürlüğün artmasına neden olmaktadır ve yüksek hidrojen bağ yapma kapasitesine sahip bileşiklerin membran yapılarındaki bilayer lipid tabakalarında geçebilmesi için kırılıp, bozulması gerekmektedir (Kerns ve Di, 2008).

İlaç etken maddelerinin kan-beyin bariyer geçirgenliği

Kılcal endotel hücreleri, astrositler, perivasküler makrofajlar ve perisitler gibi farklı hücrelerden oluşan kan-beyin bariyeri (KBB), vücudun komuta merkezi olarak görev yapan merkezi sinir sisteminin (MSS) nörotoksik ajanlara karşı korunarak, homeostazisinin sürdürülmesini sağlamaktadır. Hücreler arasındaki sıkı bağlantıları ve hücre dışı matrisi sayesinde yalnızca MSS için gerekli besinlerin ve oksijenin beyne ulaşmasını sağlamaktadır (Ebrahimi ve diğerleri, 2020).

KBB MSS'ye n  rotoksinlerin yanı sıra n  rodejeratif hastalıkların tedavisi için gerekli olan bazı ilaçların ve terapötik ajanların geçişini de engellemesi nedeniyle AH'ye yönelik ilaç geliştirme çalışmaları için ciddi bir zorluk teşkil etmektedir. Bu durum AH ve AH gibi n  rodejeratif hastalıklara yönelik tedavi geliştirme çalışmalarında KBB penetrasyonu ana stratejilerden biri olmasına yol açmaktadır (Conrado ve diğerleri, 2020; Cummings ve diğerleri, 2019; Poovaiah ve diğerleri, 2018). Bir ilacın KBB'yi geçme potansiyeli, onun fizikokimyasal özellikleri ile yakından ilişkilidir. KBB penetrasyonunun birçok belirleyicisi tanımlanmış olmasına rağmen, başlıca ve en önemli olan parametreler bileşiğın polar yüzey alanın büyüklüğü, moleküler ağırlığı ve hidrojen bağlama yeteneği ile ölçülen lipofilikliğidir. MSS'de etkili olabilecek bir ilaç adayının küçük gözeneklerden veya hücresel kanallardan geçebilmesi için polar yüzey alanın 90  ²'den, moleküler ağırlığının ise 450 Dalton'dan küçük olması gerekmektedir. Ayrıca, KBB'nin endotel hücreleri, lipofilik membranlarla çevrelenmiştir. Bu nedenle merkezi sinir sistemine geçmesi gereken maddelerin kanın hidrofilik ortamından endotel hücrelerinin hidrofobik ortamına geçmesi gerekmektedir. Hidrojen bağ donör sayısı 3'den az olan lipofilik bileşiklerin KBB boyunca taşınabildiği bilinmekte olup, AH gibi n  rodejeratif hastalıkların hedeflendiği ilaç keşif ve

geliştirme çalışmalarında etken maddenin EDMA-T'nin yanı sıra bu fizikokimyasal özelliklere de sahip olması hedeflenmektedir (Conrado ve diğerleri, 2020; Poovaiah ve diğerleri, 2018) .

2.11.2. Alzheimer hastalığı için farmakodinamik hedefler

Farmakokinetik özelliklerin yanı sıra, ilaç keşif ve geliştirme çalışmalarında etken maddenin fizyolojik, biyokimyasal ve patolojik olaylar üzerindeki etkisinin (farmakodinamik) belirlenmesi de önemlidir (Akkan, 2014). AH'nin ana biyobelirteçlerinden A β ve tau'nun yanı sıra oksidatif stresin kaynaklı patolojilere karşı korunma sağlayabilecek farmakodinamik özelliklere sahip ilaç etken maddelerinin keşfedilip, geliştirilmesi amaçlanmaktadır (Cummings ve diğerleri, 2019; Valis ve diğerleri, 2019).

A β ve tau'ya yönelik farmakodinamik hedefler

Protein agregasyonu birçok nörodejeneratif hastalık gibi AH tedavisi için de önemli mekanizmalarından biridir (Hussain ve diğerleri, 2018b; Ross ve Poirier, 2004). A β üretiminin modülasyonu için sekretazların (β ve γ) ve proteazların yanı sıra immünoterapik yaklaşımlar ile A β plak oluşum miktarının azaltılması hedeflenmektedir. β -sekretazların modülasyonu için APP'yi parçalayan ilk enzim olan β - sekretaz-1 (BACE-1), γ -sekretaz için ise nicastrin (NCSTN), presenilin (PEN-1), ön farenks defektif -1 (APH-1) ve presenilin arttırıcı-2 (PEN-2) hedef alınmaktadır. Fakat, sekretazların A β 'nın yanı sıra transmembran proteinlerin substratını da parçalıyor olması ve bunları hedef alan ajanlar kan-beyin bariyeri penetrasyonu, karaciğer toksisitesi, gastrointestinal kanama ve immünosüpresyon ile ilgili sorunları nedeniyle başarılı henüz başarılı bir tedavi sunamamaktadır. Patolojik A β 'nın parçalanmasını sağlayan proteaz ekspresyonları uyarılması veya proteazları düzenleyen endojen inhibitörleri baskılanması da bir diğer yaklaşımdır ve A β 'nın monomer ve fibril formlarının bozulmasını artırarak, AH patolojisinin zayıflatılmasına katkıda bulunmaktadır. Diğer yandan, pasif immünizasyon ve monoklonal antikoları kapsayan immünoterapik yaklaşımlar ile de oligomer/fibril oluşumunun önlenmesi ve A β agregalarını çözülmesi amaçlamakta olup, özellikle pasif immünizasyona alternatif olarak geliştirilen Aducanumab gibi monoklonal antikoların gelecekte umut vaat ettiği düşünülmektedir (Graham ve diğerleri, 2017; Marasco, 2020). NFY oluşumunun hastalık patolojisindeki yeri ile ilgili çalışmaların artmasıyla, bu oluşumun engellenmesi de cazip hale gelmeye başlamıştır.

Bu kapsamda tau kinazlarının inhibisyonu veya fosfatazların aktivasyonu yoluyla fosforilasyonunun azaltılması, tau klirensinin artırılması ile hiperfosforile tau birikiminin azaltılma ve mikrotübülün stabilizasyonun artırılması açık terapötik hedeflerdir.

AH patogenezinde en çok incelenen tau kinazları, Glikojen sentaz kinaz-3 beta (GSK-3 β) ve siklin bağımlı kinaz 5 (CDK5)'dir ve bunların aşırı aktivitelerinin engellenmesi için inhibitör araştırma ve geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Bununla birlikte, AH'nin tedavisinde GSK-3 β ve CDK5 inhibitörlerinin kullanımı, bu proteinlerin çoklu hücre sinyal yollarında oynadığı temel rollerden dolayı aktivitesi özgünlüğü ve dar bir güvenlik marjına sahip olmaları gibi bazı endişeleri de beraberinde getirmektedir. Diğer yandan defosforilasyondan sorumlu olan fosfatazlar AH ile aşağı regüle olmaktadır, bu sebepten fosfatazların yukarı regülasyonu da AH'deki tau hiperfosforilasyonu ve nörofibril yumak oluşumunu hedef alan bir başka yaklaşımdır. Ancak, protein kinazlardan çok daha geniş substrat seçiciliğine sahip olmaları nedeniyle yakın gelecekte klinik faydalar sağlamaları oldukça güç görünmektedir. Tau fosforilasyonunu modüle etmenin potansiyel bir alternatifi de gen ve protein ekspresyonunu veya klirensini düzenleyen ubiquitinasyon-proteazomal ve lizozomal moleküller yolları hedeflemektir. Bu yolların aktivasyonu veya tau asetilasyonun inhibisyonu yoluyla tau türlerinin seviyesi azaltılabilmekte, böylelikle toplam hücre içi klirensi arttırılmaktadır. Tau disfonksiyonu ile ilişkili olan mikrotübül bozulmasının engellenmesi için ise mikrotübül stabilizatörlerinin kullanımı söz konusudur. Hatta AH için klinik öncesi ve klinik çalışmalarda test edilmiş stabilizatör de bulunmaktadır. Ancak bunlar kan-beyin bariyer penetrasyonlarının çok düşük olması nedeniyle MSS'ye ulaşmamakta olup, kullanımları AH için tedavi sağlamamaktadır (Aso ve Ferrer, 2012; Yang ve Wang, 2018).

Oksidatif strese yönelik yaklaşımlar

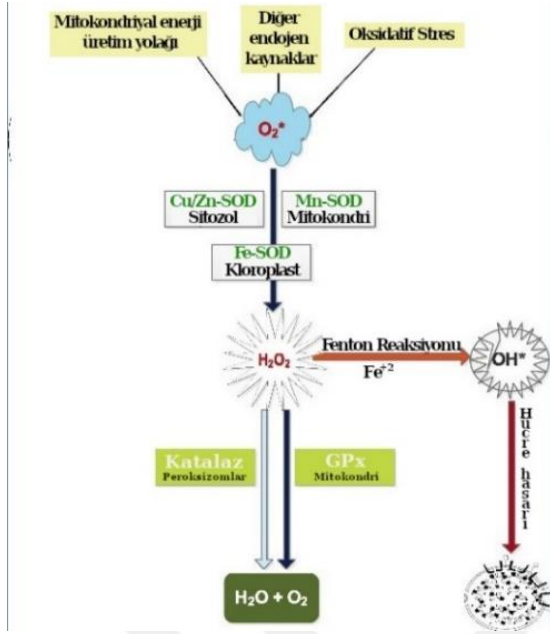
AH patogenezinin hem başlangıcında hem de ilerlemesinde oldukça fonksiyonel bir role sahip olması sebebiyle oksidatif stresin azaltılması da önemli bir yaklaşımdır (Niedzielska ve diğerleri, 2016). Bu yaklaşım ile temel olarak ROS'u süpürerek oksidasyonu azaltan ve nöronal korunumu sağlayan antioksidan mekanizmalar hedef alınmaktadır. Bu kapsamda süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleri oksidatif strese karşı birincil savunma hattı olarak görülmekte ve süperoksit ve peroksit

katabolizmasının uyarmaları nedeni ile sıklıkla çalışılmaktadır (Şekil 2.13) (Feng ve Wang, 2012; Ighodaro ve Akinloye, 2018).

SOD; oksidatif bozunma yoluyla süperoksit radikallerini H_2O_2 'ye dönüştürmektedir. Ayrıca, organik bileşiklerden suyun ayrılmasını katalize eden dehidrataz enziminin serbest radikaller tarafından inaktive edilmesini de engellemektedir. SOD'un üç farklı formu bulunmaktadır, bunlardan bakır-çinko içeren SOD (Cu, Zn-SOD) olan SOD-1, toksik O_2^- anyonlarının H_2O_2 ve O_2 'ye dönüşümünü katalize eden sekiz antiparalel beta ipliği ve iki metal atomundan oluşan bir homodimerdir. Sitozolde bulunmaktadır ve özellikle pH'tan bağımsız olarak dismutasyonu katalize etmektedir. SOD-1 süperoksit radikallerini detoksifiye etmesi nedeniyle AH'de birinci savunma hattı olarak görülmektedir (Lee ve diğerleri, 2020).

KAT; hücre içinde üretilen H_2O_2 'yi, H_2O ve moleküler O_2 'ye enzimatik olarak katabolize eden enzimlerden biridir. CAT, SOD'un başladığı detoksifikasyon sürecini tamamlayarak, hücreleri korunmasında önemli bir role sahiptir. Ayrıca, adaptif bir yanıt olarak oksidatif strese karşı tolerans kazanılmasına da aracılık etmektedir (Lee ve diğerleri, 2020).

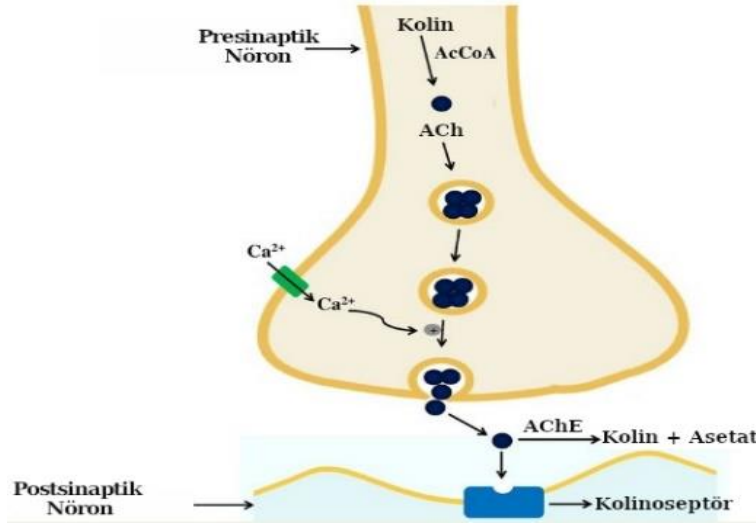
GPx; H_2O_2 'yi katalize eden bir diğer enzimdir. KAT'dan farklı olarak, memeli hücrelerinin oksidatif hasara karşı korunmasında glutasyonu kullanmaktadır ve çeşitli hidroperoksitlerin H_2O veya karşılık gelen alkollere indirgenmesini katalizlemektedir. GPx'in pek çok formu bulunmaktadır; bunlardan GPx1 ve GPx4 beyin dokusunda baskın olan formlardır. GPx1, H_2O_2 ve organik hidroperoksitleri azaltmaktadır. Diğer yandan, fosfolipit hidroperoksit glutasyon peroksidaz olan GPx4, sitozolde bulunmaktadır ve doğrudan fosfolipit hidroperoksitlerini, yağ asidi hidroperoksitlerini ve kolesterol hidroperoksitlerini azaltabilen bir membran fraksiyonudur (Lee ve diğerleri, 2020).



Şekil 2.13. Birinci savunma hattı antioksidanlar ve görevleri (Ighodaro ve Akinloye, 2018)

Kolinerjik sisteme yönelik yaklaşımları

AH ile birlikte kolinerjik iletimden sorumlu proteinlerin yapı veya fonksiyonlarındaki değişiklikler kolinerjik iletimin aksamasına ve dolayısıyla nörodejenerasyona neden olmaktadır. Bu sebepten kolinerjik iletimde rol alan ACh ve ACh'nin üretiminden sorumlu olan asetilCoA, ChAT aktivitelerinin artırılması veya post sinaptik iletimden sonra ACh'i katabolize eden AChE'nin inhibisyonu hedeflenmektedir. AChE kinetik olarak en etkili enzimlerden biridir ve her bir AChE molekülünün saniyede 5000 ACh molekülünü hidrolize edebildiği bilinmektedir (Şekil 2.14). Bu sebepten mevcut çalışmalar ile çoğunlukla hidrolize edici bu enzimin inhibisyonuna odaklanılmakta olup (Holzgrabe ve diğerleri, 2007; Koçancı ve Aslim, 2016; Lazarevic-Pasti ve diğerleri, 2017), AH'ye yönelik ilaç geliştirme çalışmalarında AChE inhibisyonu altın bir standart olarak görülmektedir (Garcimartín ve diğerleri, 2017).



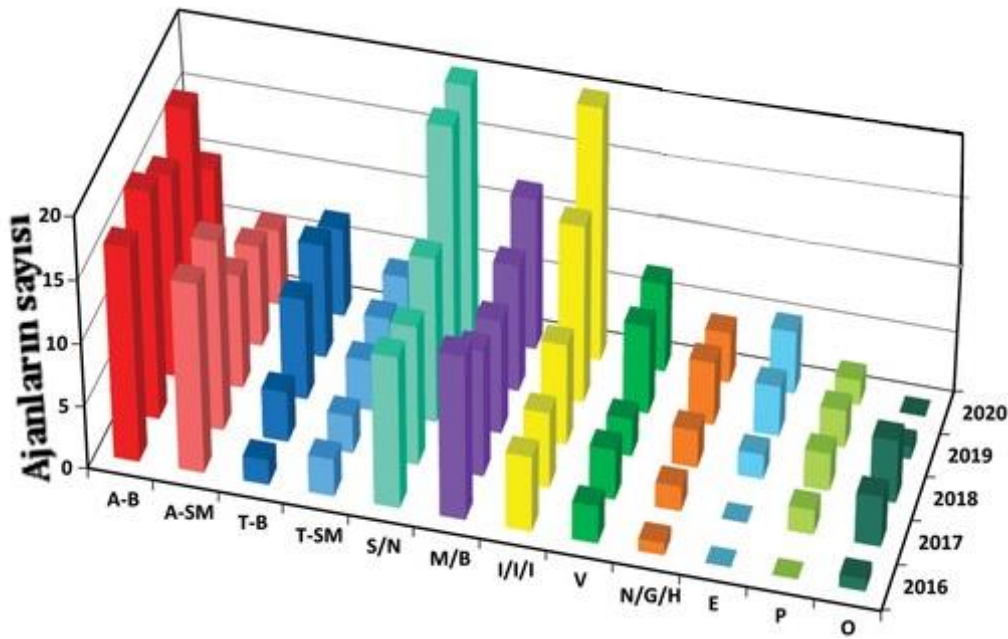
Şekil 2.14. AChE inhibitörlerinin etki mekanizması. AcCoA: Asetilkoenzim A; ACh: Asetilkolin; AChE: Asetilkolinesteraz; Ca²⁺: Kalsiyum iyonu (Vallés ve diğerleri, 2014)

Nöral Morfoloji ve Nörojeneze Yönelik Yaklaşımlar

Normal nöronal süreçlerden sorumlu olan moleküllerin işlevsizliği ile nöranal gelişim ve morfoloji bozuklukları arasında yakından bir ilişki olduğu ve bunun nörodejenerasyon süreçlerinin vazgeçilmez bir parçası olduğu bilinmektedir (Benussi ve diğerleri, 2017; Cohen-Cory ve diğerleri, 2010; Tusi ve diğerleri, 2012). Bu sebepten hasar görmüş nöronların kurtarılması ve nörojenezin uyarılması, nörodejeneratif hastalıkların tedavisine yönelik yaklaşımlardan bir diğeridir. Bu kapsamda, nörotrofik faktörler ailesinin birer üyesi olan nöral gelişim faktörü (NGF), beyin-türevli nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin-3(NT-3) ve nörotrofin-4 (NT-4) gibi moleküllerin terapötik amaçlı kullanımı oldukça cazip bir yaklaşım gibi görülmektedir. Ancak, bu moleküller kan-beyin bariyerinden geçememeleri ve periferik uygulama sonrası peptidazlar tarafından kararsız hale getirilmeleri nedeniyle MSS’de etkili bir tedavi sağlayamamaktadır (Enciu ve diğerleri, 2011; Hur ve diğerleri, 2004). Bu sebepten direk olarak bu faktörlerin uygulanmasından ziyade, bu nörotrofik faktörlerin salınımını artırabilen veya ilgili yollarını güçlendirebilen moleküller alternatif bir yaklaşım olarak görülmektedir (Gassaway ve diğerleri, 2016).

2.11.3. Alzheimer hastalığında için geliştirilmekte olan tedaviler

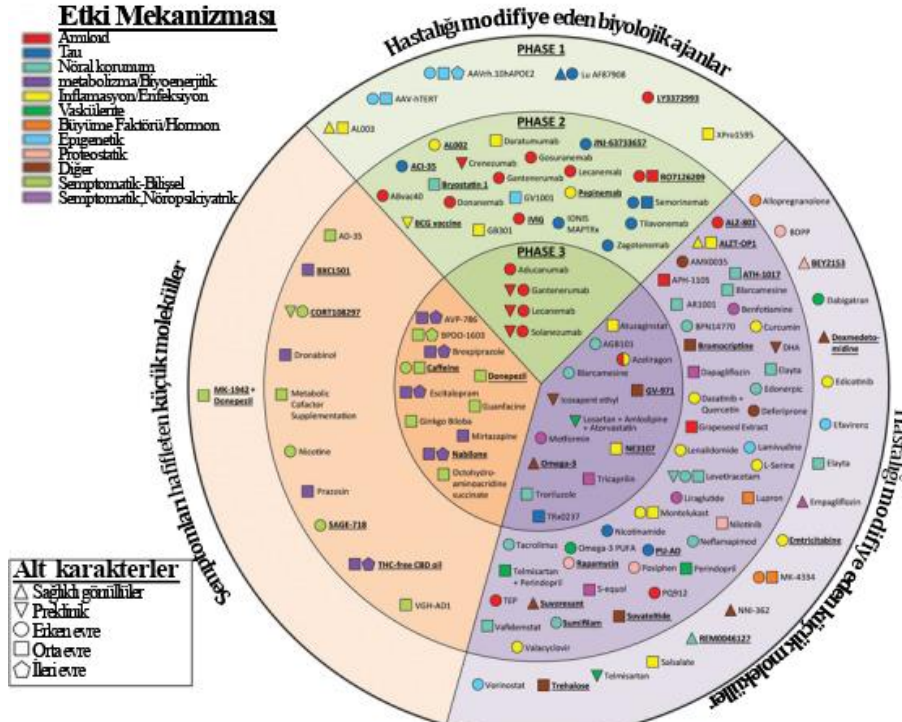
AH tedavisine yönelik 2016-2020 yılları arasında araştırılan ajanların (küçük molekül terapileri ve monoklonal antikorlar) hedefleri ve hedeflerine yönelik ilginin yıllara göre değişiminin incelendiğinde özellikle son yıllarda tau, anti-enflamatuar, sinaptik ve nörokoruyucu, metabolik, nörogenez ve epigenetik bazlı ajanlara olan ilginin arttığı görülmektedir (Şekil 2.15) (Cummings ve diğerleri, 2020).



Şekil 2.15. AH'ye yönelik terapötiklerinin hedeflerin son beş yıldaki değişimi. A-B: Biyolojik A β tedavileri; A-KM: A β 'yi hedef alan küçük moleküller; T-B: Biyolojik tau tedavileri; T-KM: tau'yu hedef alan küçük moleküller; S/N: Sinaptik plastisite/nörokoruma; M/B: Metabolizma/biyoenerjetik; I/I/I: İnflamasyon/infeksiyon/immünite; V: Vaskülersistem; N/B/H: Nörogeneziz/büyüme faktörü/hormon; E: Epigenetik; P: Proteostazis; D: Diğerleri (Cummings ve diğerleri, 2020)

Diğer yandan 2021 yılı itibari ile klinik olarak araştırmaları devam eden terapötik adaylar Şekil 2.16'da verilmiştir. AH için etkin bir tedavi adayı olabilme potansiyeline sahip olan bu 126 ajanın 28'i faz 3 aşamasında, 74'ü faz 2 aşamasında ve 24'ü faz 1 aşamasında araştırılmaktadır. Araştırmalardaki ilaçların büyük bir kısmı (%82,5'i), hastalık modifikasyonu amacıyla AH'nin altında yatan patobiyolojiyi hedef almaktadır. Küçük moleküllü ilaçlar ve biyolojik terapileri içeren bu ajanlar ile çoğunlukla inflamasyon,

sinaptik plastisite, A β ve Tau gibi AH patobiyolojisindeki mekanizmalardan biri hedeflenmektedir (Cummings ve diğeri, 2021).

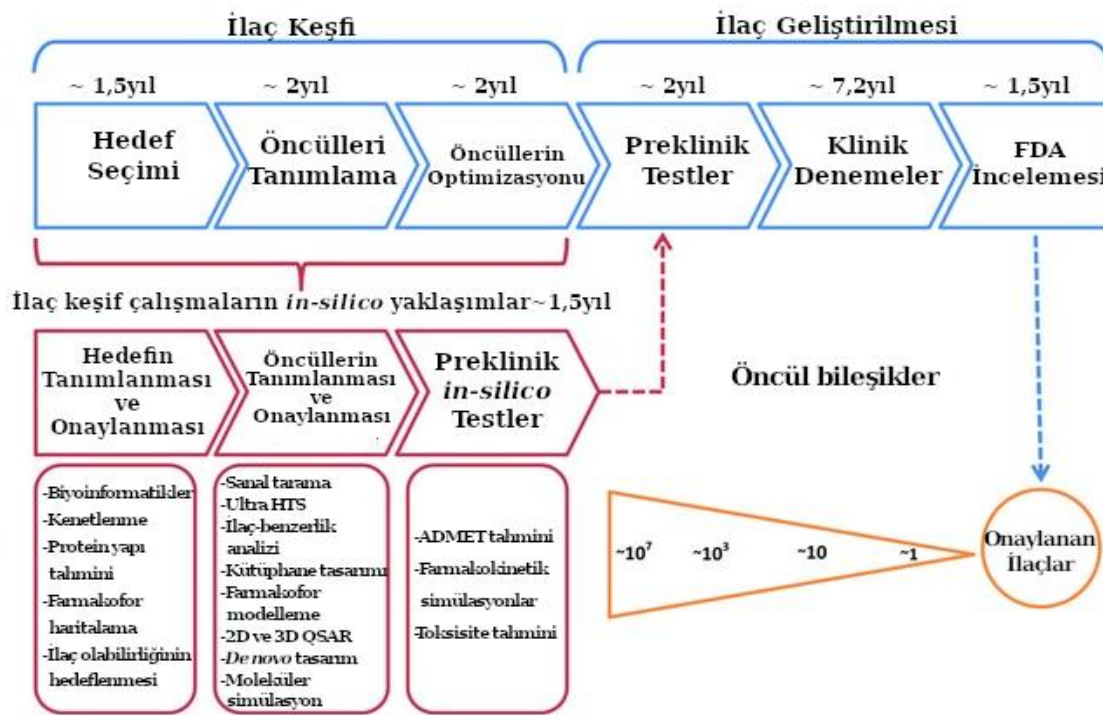


Şekil 2.16. AH tedavisine yönelik klinik deneylerde ile araştırılan ajanlar. 2021 yılında araştırmaları devam eden bu ajanlardan Faz 3 aşamasındakiler iç halkada, Faz 2 aşamasındakiler ortadaki halkada, Faz 1'ler ise dış halkada bulunmaktadır. Yeşil alanlarda ajanlar biyolojik; mor alanlarda hastalığın modifiye eden küçük moleküller; turuncu renkli alanda ise semptomları hafifleten ajanlara yer verilmiştir. Simgelerin şekli klinik denemenin gerçekleştirildiği popülasyonu, simgelerin şekli ise tedavi ile hedeflenen etki mekanizmasını göstermektedir (Cummings ve diğeri, 2020)

2.12. İlaç Keşif ve Geliştirme Çalışmalarında *İn-Siliko* Yaklaşımlar

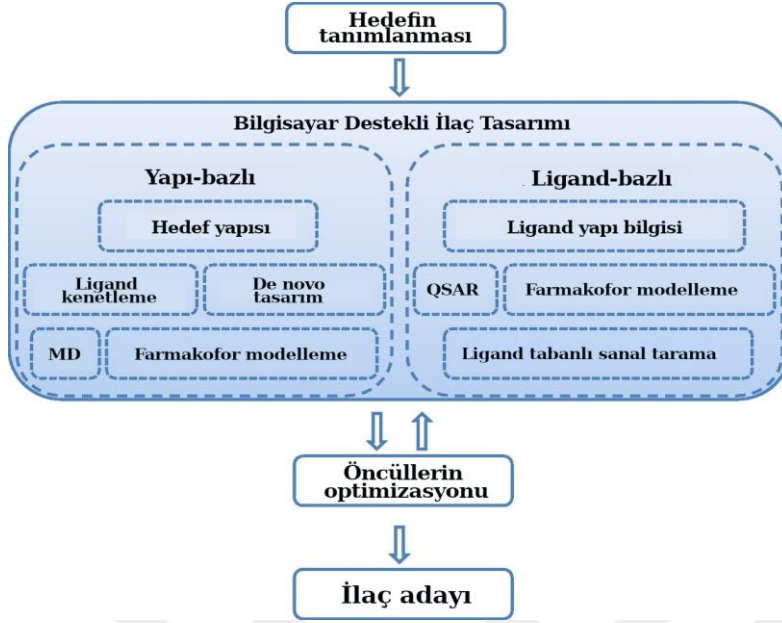
Geleneksel yöntemler ile yeni bir ilacın keşfi veya geliştirilmesi genellikle zaman alıcı, riskli ve oldukça maliyetli bir süreçtir. Öyle ki, bir bileşiğin ticari olarak kullanılabilmesi yaklaşık 14 yıl sürmektedir ve bu süreç ortalama 0,8-1,2 milyar dolara mal olmaktadır. Dahası pek çok tekrar ve hata döngüsünü içeren bu sürece girebilen 40.000 adaydan yalnızca beşi klinik öncesi deneme aşamalarına, klinik deneylere ise yalnızca biri ulaşabilmektedir. *İn-siliko*, bilgisayarda gerçekleştirilen matematik tabanlı hesaplamalı deneysel süreçleri tanımlamak için kullanılan bir ifadedir. *İn-siliko* (bilgisayar destekli) ilaç keşif ve geliştirme çalışmalarıyla ise hedeflenen biyolojik yapılar üzerinde etkili yeni ilaç adayları ve etkilerinin

moleküler temelleri araştırılmaktadır. Bu yöntemler ile ilaç keşif ve geliştirme sürecindeki aday bileşiklerin kurulan yapı-aktivite ilişkileri ile farmakokinetik ve toksikolojik, homoloji modelleme, moleküler kenetlenme ve moleküler dinamik (MD) simülasyonu içeren araştırma süreçleri ile de farmakodinamik profilleri tahmin edilerek, hedefe yönelik daha etkin, yeni ve güvenli olası ilaç adayları ortaya konulmaktadır. Son dönemde kullanımı daha da artan *in-siliko* ilaç keşif çalışmaları geleneksel süreçlerdeki zaman ve maliyetin enredeyse yarıya kadar düşürmesi nedeniyle etkin ve güvenli ilaçların araştırılmasın da önemli bir araç olarak görülmektedir (Şekil 2.17) (Bisht ve Singh, 2018; Ou-Yang ve diğerleri, 2012).



Şekil 2.17. *In-siliko* ilaç keşif ve geliştirmede çalışmalarının süreci ve yöntemleri (Rocha-Roa vd., 2018).

Kuantum mekaniği, moleküler mekanik, minimizasyon, simülasyon, konformasyonel analizler ve moleküler sistemlerin davranışlarını temel alan *in-siliko* ilaç keşif çalışmaları liganda tabanlı yaklaşım ve hedef tabanlı yaklaşım olmak üzere temelde iki sınıfa ayrılmaktadır (Eren ve Yalçın, 2020). Bu yaklaşımlar ve kullanılan stratejiler Şekil 2.18’de özetlenmiştir



Şekil 2.18. Bilgisayar destekli ilaç keşif çalışmalarındaki yaklaşımlar. Öncelikle terapötik bir hedefin belirlenmesi gerekmektedir. Yapı bilgisinin mevcudiyetine bağlı olarak, yapı veya ligand bazlı bir yaklaşım kullanılmaktadır. İlgili hesaplama yöntem/programları kullanılması ile bir veya birden fazla öncü bileşik tanımlanmaktadır. Birkaç optimizasyon döngünün ardından yeni ilaç adayı ortaya konulmaktadır. QSAR: Nicel yapı-aktivite ilişkisi; MD: Moleküler dinamik simülasyon (Sliwoski ve diğerleri, 2014)

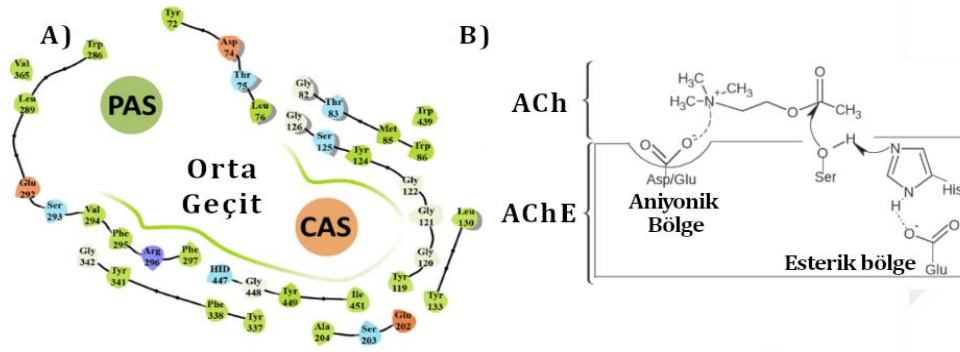
2.12.1. Alzheimer hastalığına yönelik geliştirilen ilaçlarda *in-siliko* yaklaşımlar

AH'ye yönelik *in-siliko* ilaç keşif çalışmaları ile hedeflenebilen A β ve A β ile ilişkili sekretazlar, NMDA reseptörü, tau ve tau ile ilişkili kinaz ve proteazlar, muskarinik ve nikotinik reseptörler gibi AH patolojisi ile ilişkisi olduğu bilinen birçok protein bulunmaktadır (Greco ve diğerleri, 2012; Salman ve diğerleri, 2021; Dos Santos Maia ve diğerleri, 2020). Ancak, bu bölümde bu proteinlerden tez çalışmasında kapsamında olan ve AH'ye yönelik *in-siliko* ilaç keşif ve geliştirme çalışmalarında en çok çalışılan AChE'ye yer verilmiştir.

AChE'nin inhibisyonu

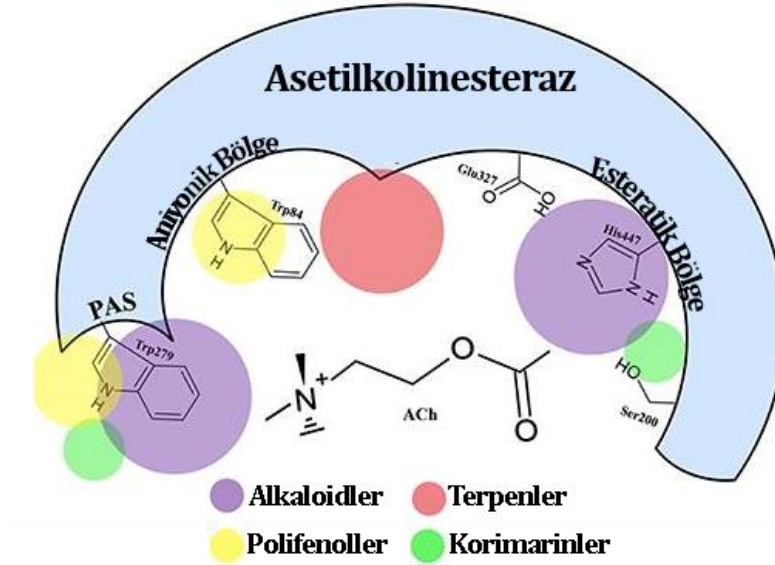
AChE enzimin inhibisyonu AH'ye yönelik *in-siliko* ilaç çalışmalarında en çok araştırılan terapötik yaklaşımlardan biridir. Karboksil esteraz ailesine ait olan AChE enzimi katalitik aktif bölge (CAS), periferik anyonik bölge (PAS) ve 20Å derinliğinde dar bir geçit alanına sahiptir (Abbasi ve diğerleri, 2018; Mishra ve diğerleri, 2019). Hidroliz için ACh önce

elektrostatik çekim ile PAS bölgesine daha sonra da kolinerjik iletimin sonlandırılmasından sorumlu olan CAS merkezine ulaşması gerekmektedir (Şekil 2.19) (Asghar ve diğerleri, 2020; Jiang ve Gao, 2019). Bu sebepten AChE enzimi üzerindeki ACh bağlanma bölgelerinin işgal edilerek, hidrolizin engellenmesi hedeflenmektedir ve *in-siliko* çalışmalar ile bunu sağlayabilecek yeni moleküllerin keşfine odaklanılmıştır.



Şekil 2.19. AChE enziminin moleküler yapısı ve ACh hidrolizinin kimyasal temelleri. CAS: Katalitik aktif bölge; PAS: Periferik anyonik bölge; ACh: Asetilkolin; AChE: Asetilkolinesteraz; Asp: Aspartat; Glu: Glutamat; His: Histidin; Ser: Serin (Kushwaha ve diğerleri, 2016)

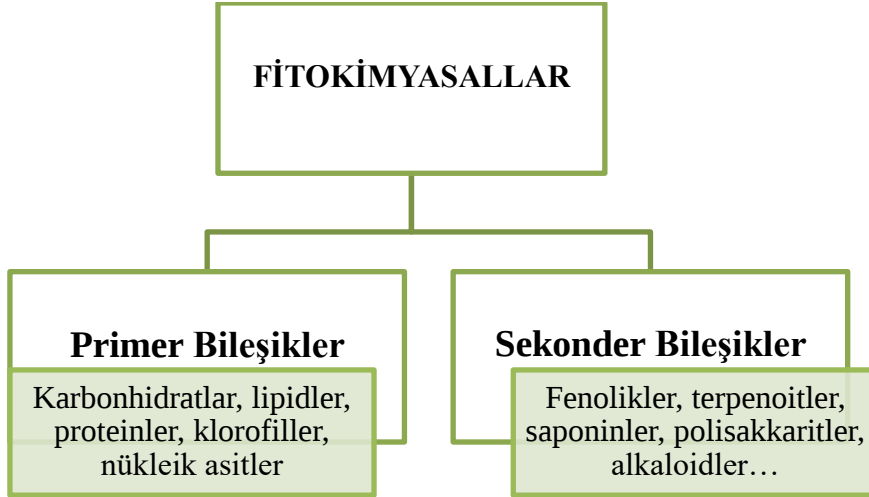
İn-siliko AChE inhibitör çalışmaları başlıca mevcut ilaçların yeniden kullanımını, bitkisel metabolitlerin ve sentetik moleküllerin inhibitör olma potansiyelinin araştırılmasını içermektedir. Bitkisel metabolitler, çok daha az miktarda toksisite seviyesi ile önemli bir terapötik madde kaynağıdır ve bunların AChE'yi yüksek oranda inhibe etme potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir (Awasthi ve diğerleri, 2016; Dos Santos ve diğerleri, 2018). Şekil 2.20'de farklı bitkisel gruplarından inhibitör aktivitesi ile yakından ilişkili olduğu düşünülen AChE üzerindeki aktif bağlanma bölgeleri verilmiştir. Bu bitkisel grupların AChE inhibitörü olma potansiyelini belirlemek amacıyla en çok çalışılan grup alkaloidlerdir. Alkaloidlerin anti-AChE aktivitesi, pozitif yüklü AChE aktif bölgesindeki "anyonik" alt bölgeye bağlanan nitrojen yapılarına ve PAS bölgesi ile güçlü etkileşimine atfedilmektedir. Özellikle berberin ve palmatinin gibi, izokinolin grubu alkaloidlerin bu etkileri sayesinde en yüksek inhibisyon etkisi gösterebilecek bitkisel bileşikler olduğu raporlanmıştır (Dos Santos ve diğerleri, 2018).



Şekil 2.20. Doğal AChE inhibitörlerinin enzimin üzerindeki bağlanma bölgeleri. AChE üzerindeki geçit bölgesi, esteratik bölge, anyonik bölge, periferik anyonik bölge (PAS) ve hidrofobik cep (HP) gösterilmektedir. Renkli daireler, belirtilen sınıflara ait bileşiklerin ana bağlanma bölgelerini temsil etmektedir (Dos Santos ve diğerleri, 2018)

2.13. Alzheimer Hastalığının Tedavisinde Kullanılan Alternatif Bitkisel Sekonder Metabolitler

Fitokimyasallar bitkiler tarafından üretilen biyoaktif bileşiklerdir ve bitkilerin predatörlerden korunmasının, tozlaşmanın, büyüme ve gelişmenin sağlanmasında rol almaktadırlar (Huang ve diğerleri, 2016b). Şekil 2.21’de de özetlendiği gibi fitokimyasallar, primer ve sekonder metabolitler olarak ikiye ayrılmaktadır. Primer metabolitler karbonhidratları, lipidleri ve nükleik asitleri içerisine alan gruptur ve üreme, büyüme ve gelişme gibi yaşamsal temel süreçlere eşlik etmektedir. Sekonder metabolitler ise büyük bir kısmı primer metabolitlerden biyosentezlenen ve çevresel streslere karşı korumadan, patojen ve predatörlerin saldırısı sırasında savunmaya kadar bitkinin ikincil metabolizmasına atfedilen çeşitli ekolojik rollerde görev almaktadır (Isah, 2019).



Şekil 2.21. Fitokimyasalların sınıflandırılması

Bitkisel kaynaklı bu metabolitler antioksidan, anti-viral, anti-fungal, anti-kanser ve nöral koruma gibi pek çok biyolojik aktiviteye sahip olması nedeniyle antik çağlardan beri hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadır (A. Hussein ve A. El-Anssary, 2019; Chitra Jain; Shivani Khatana; Rekha Vijayvergia, 2019). Bugün bile kullandığımız ilaçların %25'i bitkisel kaynaklardan üretilen bu metabolitlerden oluşmaktadır (Isah, 2019). Yüksek etki potansiyelleri nedeniyle sekonder metabolitler bitkisel kökenli ilaç etken madde araştırmalarında en çok çalışılan gruptur ve kendi içlerinde fenolik bileşikler, terpenler ve alkaloidler olmak üzere üçe ayrılmaktadır (Swamy, 2020). Sekonder metabolitlerin biyolojik aktivitesi DNA bazlarının kovalent ve kovalent olmayan modifikasyonu, biyomembranlar ve nükleik asitler ile etkileşimleri ve antioksidan özelliklerine atfedilmektedir (Wink, 2015). AH ve AH benzeri nörodejeneratif hastalılarda ise sinyal yollarının, nöroreseptörlerin, nörotransmitterlerin, iyon kanal ve pompalarının regülasyonu, oksidatif stresin baskılanması ve Proteostasis yoluyla nöral korunumu sağlayadıkları bilinmektedir (A. Hussein ve A. El-Anssary, 2019; Hussain ve diğerleri, 2019; Wink, 2015).

2.13.1. Bitkisel ilaç adayı olarak polifenoller

Polifenoller meyvelerde, sebzelerde, baklagillerde, tahıllarda, çay, kahve ve şarap gibi içeceklerde bulunan, pentoz fosfat, shikinat ve fenilpropanoid yollardan türetilen bitkisel sekonder metabolitlerdir. Başlıca fenolik asitler, flavonoidler, tanenler ve stilbenler olarak sınıflandırılmakta ve bitkilerin renk, tat, kokusundan sorumludurlar. Polifenoller serbest radikallerin temizlenmesi, endojen antioksidan enzimlerinin modülasyonu, iki değerli

katyonların şelatlanması ve stabilizasyonu sayesinde yüksek antioksidan özelliğe sahip organik bileşiklerdir (Elufioye ve diğerleri, 2017; Ozcan ve diğerleri, 2014). Antioksidan özelliklerinin yanı sıra AH ile ilişki A β , Tau ve AChE proteinlerini, hücrel sinyal yollarını ve nöral apoptozu modüle edebilmektedirler (Omar, 2017).

2.13.2. Bitkisel ilaç adayı olarak terpenoidler

İzoprenoidler olarak da bilinen terpenoidler bol miktarda bulunan ve yapısal olarak oldukça çeşitli olan doğal ürünlerdir. Terpenoidler; hemiterpenoidler, monoterpenoidler, seskiterpenoidler, diterpenoidler, sesterterpenoidler, triterpenoidler, tetraterpenoidler (karotenoidler) ve politerpenoidler olmak üzere sekiz sınıfa ayrılmaktadır (Ludwiczuk A., Skalicka-Woźniak K., 2017). Terpenoidler de antioksidan, anti-enflamatuar, Tau, AChE ve ChE özellikleri ile oksidatif stresin azalması buna karşın nörotransmitter salımının artırması ile nöroprotektif etki sağlamaktadırlar (Hazekamp ve diğerleri, 2010; Ludwiczuk A., Skalicka-Woźniak K., 2017).

2.13.3. Bitkisel ilaç adayı olarak alkaloidler

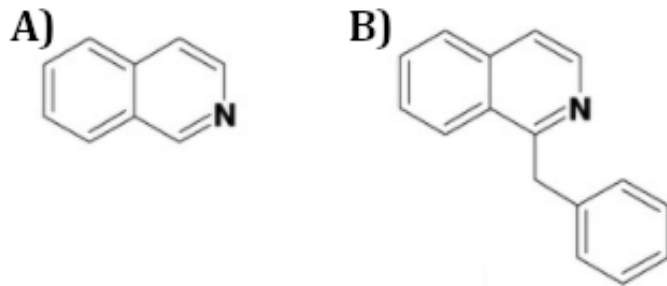
Alkaloidler, karbon, hidrojen, azot ve çoğunlukla oksijen içeren bitkisel kaynaklı sekonder metabolitlerdir (Hussain ve diğerleri, 2018a). Yapılarına göre indoller, kinolinler, izokinolinler, pirolidinlerin, piridinler, pirolizidinler, tropanlar, terpenoidlerin ve steroidler gibi sınıflara ayrılmaktadırlar (Kurek, 2019). Alkaloidler modern tıpta analjezik, anti-hiperglisemik, antikanser, anti-aritmik, anti-bakteriyel, psikotropik ve uyarıcı gibi etkileri sebebiyle kullanılmaktadır (Amirkia ve Heinrich, 2014; Hussain ve diğerleri, 2018a). Bunun yanı sıra, alkaloidlerin çoğunun iyi bir çözünürlük profiline ve düşük moleküler ağırlığa (<500Da) sahip olması, hidrojen bağ sayısını, lipofiliklik ve Lipinski beş kuralına uyması ve antioksidan, anti-A β , Anti-AChE, anti-BuChE, NMDA antagonistliği gibi çoklu etki mekanizması sayesinde AH tedavisi için de iyi bir ilaç adayı olabileceği bildirilmiştir (Kong ve diğerleri, 2021). Bu alkaloidlerden birkaçı ve etki mekanizması Çizelge 2.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Alkaloid grupları ve AH patolojisi üzerindeki etkileri

Gruplar	Alkaloidler	Bitkisel kaynaklar	Nörokoruyucu Aktivite	Kaynak
İndoller	Fizostigmin İbogain	<i>Physostigma venosum</i> <i>Uncaria tomentosa</i> <i>Tabernanthe iboga</i>	Anti-AChE, anti-BuChE, anti-A β , NMDA antagonisti	(Girdhar ve diğerleri, 2015)
Kinolinler	Kinin Kinidin Küsparin	<i>Cinchona officinalis</i> <i>Cusparia trifoliata</i> Genus <i>Peganum</i>	Anti-AChE, anti-BuChE, anti-A β ve antioksidan	(Dey ve Mukherjee, 2017; Zhao ve diğerleri, 2013)
İzokinolinler	Galantamin Papaverin Berberin Morfin	<i>Berberis vulgaris</i> <i>Papaver somniferum</i> <i>Galanthus nivalis</i>	Anti-AChE, anti-BuChE, anti-A β , ve antioksidan	(Girdhar ve diğerleri, 2015; Singh ve diğerleri, 2021)
Pirolidinler	Higrin Stahidrin Nikotin	<i>Erythroxylon coca</i> <i>Stachys tuberifera</i> <i>Nicotiana tobaccum</i>	ACh ve muskarinik reseptör modülatörü, anti-A β	(Girdhar ve diğerleri, 2015)
Piridinler	Arekolin Lobelin	<i>Areca catechu</i> <i>Lobelia inflata</i>	Muskarinik reseptör antagonisti	(Wiat, 2014)
Pirolizidin	Heliosupin	<i>Solenanthus lanatus</i>	Anti-AChE	(Moreira ve diğerleri, 2018)
Tropanlar	Skopolamin Atropin Kokain	<i>Atropa belladone</i> <i>Datura stramonium</i> <i>Erythroxylon coca</i>	Muskarinik ve nikotinik reseptör modülatörü, Anti-AChE	(Rajput ve diğerleri, 2021)
Terpenoidler	Ursolik asit Akonin	<i>Micromeria cilicica</i>	Anti-AChE ve anti-BuChE	(Ahmed ve diğerleri, 2013; Huang ve diğerleri, 2020)
Steroidler	Funtumin Solaniidin	<i>Holarrhena lancifolius</i> <i>Funtumia latifolia</i>	Anti-AChE	(Girdhar ve diğerleri, 2015)

2.14. İzokinolin Alkaloidleri ve Alzheimer Üzerindeki Etkileri

Geniş bir alkaloid grubu olan izokinolinler başlıca Papaveraceae, Berberidaceae ve Ranunculaceae gibi bitki ailelerinde bulunmaktadır. Yapıları piridin halkasına kaynaşmış benzen halkasından oluşan basit izokinolin ile ikinci bir aromatik halka içeren benzilizokinolinlerin birleşiminden meydana gelmektedir (Şekil 2.22) (Dey ve diğerleri, 2020; Khan ve Suresh Kumar, 2015).



Şekil 2.22. İzokinolin grubu alkaloidlerin temel kimyasal yapısı. A) bir izokinolin parçası; B) benzilizokinolin parçası (Khan ve Suresh Kumar, 2015)

Analjezik (morfin), anti-bakteriyel (berberin), anti-tussif (kodein), anti-romatizmal (sinomenin) ve anti-AChE (galantamin) gibi biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilinen izokinolin grubu alkaloidler ilaç keşfi ve geliştirme süreçlerinde yüksek başarı potansiyeline sahip öncü bileşikler olarak nitelendirilmektedir (Shang ve diğerleri, 2020). Ayrıca, izokinolin grubu alkaloidlerin PI3K/Akt ve JNK/Nrf2/NQO1 gibi yolların aktivesini ve mitokondriyal membran potansiyelini düzenleyerek ROS üretimini ve lipid peroksidasyon oluşumunu azaltıp, antioksidan mekanizmayı aktive edebildiği ve bu sayede nörokoruyucu aktivite gösterdiği bilinmektedir (Shang ve diğerleri, 2020). Bunu yanı sıra birçok izokinolin alkaloidinin AH patofizyolojisindeki Aβ plaklarının ve hiperfosforilasyona bağlı nörofibriler yumak oluşumunu önlediği, nöral gelişimi koruyup/desteklediği farklı çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Dahası, iyi bir AChE inhibitörü olarak tanınan ve bu etkinliği yapısal özelliklerine atfedilen izokinolin alkaloidlerinin hem galantamin gibi klinikte, hem de berberin ve pre-klinikte birçok örneği bulunmaktadır (Andrade ve diğerleri, 2019; Chlebek ve diğerleri, 2016; Iranshahy ve diğerleri, 2014; Dos Santos ve diğerleri, 2018). İzokinolin grubu alkaloidlerden bazılarının AH'deki terapötik aktiviteleri etki mekanizmaları ile birlikte Çizelge 2.3'de özetlenmiştir.

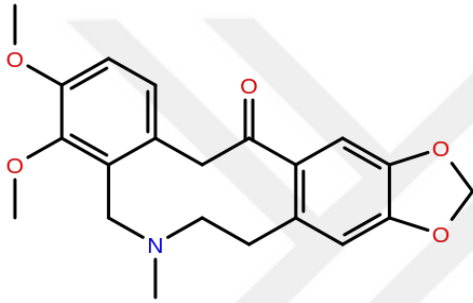
Çizelge 2.3. İzokinolin grubu alkaloidlerin nörokoruyucu etki mekanizması (Dey ve arkadaşları, 2017)

Alkaloidler	Bitkisel Kaynakları	Mekanizmaları
Berberin	<i>Coptis chinensis</i> , <i>C. japonica</i> <i>C. rhizoma</i> , <i>Phellodendron</i> <i>amurense</i> , <i>Berberis</i> sp.	↓ Oksidatif stres, ↓ AChE, ↑ Nörotransmitter akışı, ↓ Aβ, ↓ Hiperfosforile Tau, ↑ PI3K /Akt/GSK3β/ERK ½, ↓ JNK, ↑ NMDA reseptörü aracılı hücre sağkalımı, ↑ Bcl-2, ↓ Caspase-3 apoptotik sinyal yolağı, ↓ Hücre ölüm oranı, ↓ Öğrenme güçlükleri, ↑ Kısa süreli hafıza, ↑ Koordinasyon
Galantamin	<i>Galanthus</i> sp.	↓ Oxidative stress, ↓ ROS, ↑ Nöral koruma, ↓ AChE, ↑ ACh, ↓ Aβ plak birikimi, ↑ NMDA reseptörünün, ↓ GSK3α/β, ↑ sinaptik iletim, NR2B alt biriminin modülasyonu, ↑ Biliş, ↓ Apoptoz, ↑ PI3K/Akt/mTOR, ↓ Hücre ölümü, ↑ Öğrenme
Tetradin	<i>Stephania tetrandra</i> <i>S. moore</i>	↓ TNF-α, ↓ Ca ⁺²
Protopin	<i>Papaver somniferum</i>	↑ Ca ⁺² antagonisti, ↑ Antioksidan, ↑ Antiapoptotik aktivite

2.15. Allokriptopinin Genel Özellikleri

2.15.1. Allokriptopinin kimyasal özellikleri

Allokriptopin başlıca Fumariaceae, Papaveraceae, Berberidaceae, Ranunculaceae ve Rutaceae bitki familyalarında bulunan izokinolin grubu bir alkaloiddir. Kimyasal formülü $C_{21}H_{23}NO_5$ ve moleküler ağırlığı 369,4 Da olan allokriptopin amin ve karbonil gruplarını içeren heterosiklik halkalı serbest bazdan, siklik asetal ve aromatik eterden oluşmaktadır (Şekil 2.23) (İnternet 5, 2021; Vacek ve diğerleri, 2010).



Şekil 2.23. Allokriptopinin yapısı

2.15.2. Allokriptopinin biyolojik sistemler üzerindeki etkileri

Allokriptopinin başlıca anti-bakteriyel, anti-viral, anti-fungal ve anti-parazitik aktivite gibi biyoloji özelliklere sahip olduğu daha önce yapılan çalışmalarda ortaya konulmuş olup, bilinen terapötik etkileri, etki mekanizmaları ile birlikte Çizelge 2.4’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.4. Allokriptopinin terapötik aktiviteleri ve mekanizmaları

Etkisi	Etki Mekanizması	Kaynak
Anti-bakteriyel	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> üzerinde anti-bakteriyel bir aktiviteye sahiptir.	(Kosina ve diğerleri, 2010; Orhan ve diğerleri, 2007b; Su ve diğerleri, 2011)
Anti-viral	HIV virüslerinin kapsülünün CD4+ reseptörüne bağlanmasını ve hücre içi replikasyonunu baskılayan terapötik bir karışımın bileşenidir. Parainfluenza tip -3'e karşı anti-viral aktivite göstermiştir. RNA bağimli RNA polimeraz enziminin inhibisyonu yoluyla SARS-CoV-2 replikasyonunun engelleme potansiyeline sahiptir.	(Orhan ve diğerleri, 2007a; Vacek ve diğerleri, 2010) (Pandeya ve diğerleri, 2020)
Anti-fungal	<i>Candida albicans</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Microsporium gypseum</i> ve <i>Penicillium</i> sp. türleri üzerinde anti-fungal aktiviteye sahiptir.	(Morteza-Semnani ve diğerleri, 2003; Orhan ve diğerleri, 2007a)
Anti-parazitik	<i>Strongyloides stercoralis</i> üzerinde anti parazitik aktivite göstermiştir. <i>Toxocara canis</i> üzerinde anti parazitik aktivite sergilemiştir.	(Satou ve diğerleri, 2002b) (Satou ve diğerleri, 2002a)
Anti-kanser	Kanser hücrelerindeki GQDNA'ya seçici, düşük toksisiteli ve yüksek stabilizasyon ile bağlanmıştır. Prostat kanseri ve Jurkat T-lenfoma hücrelerinin gelişimini apoptoz ve nekroz aracılığıyla baskılamıştır.	(Mandal ve diğerleri, 2018) (Habermehl ve diğerleri, 2006; Liu ve diğerleri, 2013b)
İleum Rahatlatıcı	Tübülün proteinindeki post-translasyonel modifikasyonları yoluyla melanom hücrelerinde anti-tümör aktivite göstermiştir.	(Kulp ve Bragina, 2013)
Kontraktıl Etkisi	Ratlarda fosfodiesteraz enzimini inhibe ederek ileum üzerinde rahatlatıcı bir etki yaratmıştır ve hücrel cAMP'yi artırmıştır. Ratlarda alfa-adrenajik reseptörlerin modülasyonu aracılığıyla idrar kesesi üzerindeki kontraktıl etki göstermiştir.	(Abu-Ghalyun ve diğerleri, 1997) (Abu-Ghalyun ve diğerleri, 1997)

Çizelge 2.4.(devamı) Allokriptopinin terapötik aktivitesi ve mekanizmaları

	Miyositlerde dışa doğru atılan potasyum akımının regülasyonunu sağlayan kanalların bloke etmiştir	(Fu ve diğerleri, 2016)
	Sodyum kanal (G1743R, G292S, K317N ve V294M) mutasyonlarının düzenlenmesi yoluyla sodyum kanallarının alt birimi olan SCN5A'nın yavaş inaktivasyon sürecini hızlandırmaktadır. Ayrıca, zardaki T353I kanal proteininin ekspresyonunun artırmaktadır.	(Zhang ve diğerleri, 2015)
	Sodyum iyon kanal alt birimi olan Nav1.5'in plazma membran ifadesini artırarak SCN5A-T353I'nin hücrel elektrofizyolojik patolojisini onarmakta, bu sayede aritmi ve Bruguda sendromuna karşı terapötik etki göstermiştir. Ayrıca kalsiyum ve potasyum akımlarını da belirgin şekilde edebildiği gösterilmiştir.	(Zhang ve diğerleri, 2015)
Kardiyo Vasküler Koruyucu	HEK293 hücrelerinde potasyum iyon kanalının alt birimi olan hERG'ü inhibe ederek anti-aritmik aktivite sergilemiştir.	(Lin ve diğerleri, 2013)
	Fare ventriküler miyositlerinde hücre içine geçici iyon ve L tipi kalsiyum akımını azaltarak tetiklenmiş aritmiyi depolarizasyon öncesinde ve depolarizasyon sonrasında baskılamıştır.	(Xu ve diğerleri, 2015)
	Tavşan miyokardında potasyum iyon akımlarının transmembranal inhibisyonunun yoluyla kardiyak repolarizasyon sürecinin stabilizasyonuna katkı sağlamıştır ve anti-aritmik aktivite göstermiştir.	(Fu ve diğerleri, 2016)
	Domuzlarda adrenal ve epinefrin indüklü aritmiyi geciktirerek, aritmiye bağlı ölümleri ciddi oranda baskılamıştır.	(Li ve diğerleri, 2019)
Nöropsikiyatrik Korunum	GABAA reseptörü için yüksek afinite göstermekte olup, antagonistleri için sinerjistik etki sağlamıştır.	(Habertin ve diğerleri, 1996)
	Sağlıklı insan kan hücreesindeki AChE enzimini inhibe etmiştir.	(Siatka ve diğerleri, 2017)
Anti-AChE	<i>In-vitro</i> ortamda yüksek oranda AChE inhibitör aktivitesi göstermiştir.	(Orhan ve Şener, 2006)
Nörokoruyuculuk	PC12 hücrelerinde glutamat tarafından indüklenen nöral ölümü nitrik oksit sentetaz aracılığıyla baskılamıştır.	(Huang ve diğerleri, 2018a)



3. MATERYAL METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan gereçler

Çalışmada kullanılan allokriptopinin hazırlanması

Tüm çalışmalarda ticari allokriptopin kullanılmıştır (Sigma, 48316-02-0). %0,08 oranında kloroformda çözülen ticari allokriptopin kültür ortamı ile karıştırılarak 0,02 M ana çözelti hazırlanmıştır.

PC12 hücre hattı

Çalışmada *Rattus norvegicus*'dan elde edilen ve sıçan feokromasitoma hücreleri olan PC12 hücreleri kullanılmıştır. PC12 hücreleri, sinir büyüme faktörü (NGF)'ne yanıt olarak katekolamin sentezleyerek nöroblast/nöron fenotipine dönüşen hücrelerdir (Dichter, M., Tischler, 1977). NGF ile kolaylıkla farklılaşabilen bu hücrelerde, geniş aksonal ve dendritik bağlantıları ile nöral morfolojik değişimler, ROS kaynaklı yollardaki etkinliği ile de biyokimsyasal süreçler kolaylıkla incelenebilmektedir. Bu sebepten nörobiyoloji araştırmalarında hücre ölümünün ve nöral korunumunun analiz edilmesi ve karşılaştırılması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Harrill ve Mundy, 2011; Liu ve diğerleri, 2017b). Bu tez kapsamındaki çalışmalarda da NGF varlığında farklılaştırılmış PC12 hücreleri (ATCC CRL-1721) kullanılmıştır.

3.1.2. İn-siliko çalışmalarda kullanılan gereçler

Moleküler modelleme hesaplamaları için Schrödinger 2021-1 yazılımındaki Maestro, LigPrep, Epik, QikProp, Glide Grid, XP Docking ve Desmond modülleri kullanılmıştır. Ayrıca, PubChem ve Protein Data Bank (PDB) veritabanlarından da faydalanılmıştır. Hesaplamalar Linux Ubuntu Sunucu kurulu kişisel bilgisayarla yapılmış olup, MD simülasyon çalışmalarında NVIDIA Tesla K40M grafik kartı kullanılmıştır (Şimşek ve diğerleri, 2021)

3.2. Metot

3.2.1. PC12 hücrelerinin geliştirilmesi, stoklanması ve farklılaştırılması

Sıvı azot içerisinde muhafaza edilen hücrelere taze besiyeri ilave edilmiştir ve 2000 rpm’de 2-4dk boyunca santrifüj edilerek dondurma işlemleri sırasında kullanılan maddeler uzaklaştırılmıştır. Santrifüj sonrası elde edilen pellet 1 mL taze besiyeri ile süspanse edildikten sonra hücreler kültür kaplarına alınmıştır. Kültür kapları, PC12 hücrelerinin yüzeye tutunabilmesi için fosfat tamponlu tuzlu su çözeltisi (PBS) ile seyreltilmiş ticari kollajen (Gibco) ile kaplanmıştır. Kültür mediumu olarak; %10 horse serum (Biological Industries), %10 fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), %1 penisilin-streptomisin (Sigma-Aldrich) ve DMEM (Sigma-Aldrich) içeren besi ortamı hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyortamı 0,2 mikrolitre (μm)’lik filtreden geçirilerek steril edilmiş (Wu ve diğerleri, 2007). Kültüre edilen hücreler 37°C’de %5 karbondioksit (CO_2)’li etüv ortamında geliştirilmiştir. Her üç günde bir PBS ile yıkanarak besi ortamı tazelenmiştir. %80-90 yoğunluğa ulaşan hücreler PBS ile yıkandıktan sonra kültür kabından besi ortamı yardımı kaldırılmışlardır. Kaldırılan hücrelere trypan-blue boyası ile boyanarak thoma sayma lamininin 0,100 mm’lik kanalına konulmuştur. Thoma lamininin mikroskop altında incelenmesi ile 100 μl besiyortamındaki parlak ve sarı renkteki canlı hücrelerin sayısı belirlenmiştir. Çalışmalar için gereken hücre konsantrasyonu (hücre/mL), “sayım ortalaması x seyreltme faktörü x 10^4 ” formülüne göre hesaplanmıştır (Demirçak, 2012). Hesaplanan hacimdeki hücre içeren besiyortamı çalışmalarda kullanılmak üzere kollejen kaplı mikropalakalara alındıktan sonra kalan hücreler pasajlanmak üzere yeni kültür kaplarına veya stok almak için %90 besiyortamı ve %10 DMSO içeren viallere taşınmıştır (Shi ve diğerleri, 2009). PC12 hücrelerinde nöral farklılaşmanın sağlanması amacıyla mikropalakalardaki kültür ortamına 100 ng/mL NGF eklenmiştir. Dört gün boyunca farklılaştırılan PC12 hücrelerinin kültür ortamı birer gün ara ile yenilenmiştir (Orlowska ve diğerleri, 2017).

3.2.2. Allokriptopinin PC12 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi

Çalışmada allokriptopin uygulanan hücrelerin canlılığı 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Kollejen ile kaplanan 96 kuyucuklu mikropalakalara 1×10^4 hücre/kuyucuk yoğunluğunda PC12 hücreleri ekilmiştir. Hücreler 24 saat boyunca besi ortamı ile inkübe edilmiştir. Ardından farklı

konsantrasyon (20-300 $\mu\text{g/mL}$) ve inkübasyon süreleri (12, 18 ve 24 saat) ile allokriptopin uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, muamele edilen hücreler, 0,22'lik filtreden geçirilen 5 mg/mL MTT (Sigma-Aldrich, USA) solüsyonu ile dört saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. MTT'nin formazana indirgenmesi için kuyulardaki besi ortamı uzaklaştırılarak, 200 μL Dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmiştir. Beş dk oda sıcaklığında karanlık bir şekilde çalkalanarak inkübe edildikten sonra 30 dk'da etüvde inkübe edilmiştir. Oluşan mor renk Elisa mikroparka okuyucu (Epoch, BioTek) ile 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Muamele edilen hücrelerin canlılığı, kontrol grubunun OD değeri ile karşılaştırılarak hesaplanmış sonuçlar %cinsinden ifade edilmiştir (Zhang ve diğerleri, 2017). Çalışma sonucunda allokriptopin ön muamelesi için en etkili konsantrasyonlar (25-150 $\mu\text{g/mL}$) ve inkübasyon süresi (18 saat) belirlenmiş olup, daha sonra aynı yöntem uygulanarak bu konsantrasyonların 200 μM H_2O_2 maruz bırakılmış PC12 hücreleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

3.2.3. Deney modelinin oluşturulması

Çalışmalarda dPC12 hücreleri MTT çalışmaları sonucunda belirlenen uygun allokriptopin konsantrasyonları sonrasında 200 μM H_2O_2 inkübe edilmiş olup, deney modelinin planı Çizelge 3.1'de de verilmiştir. Mikroparkalara ekilen hücreler dört gün boyunca birer gün ara ile NGF içeren besi ortamı ile inkübe edilerek, farklılaştırılmıştır. Inkübasyon 37°C'de %5 CO_2 içeren etüv koşullarında gerçekleştirilmiştir. 5. gün, 3.1.1'de tarif edildiği gibi hazırlanan farklı allokriptopin konsantrasyonları hücrelere uygulanmıştır. Farklılaştırılmış PC12 (fPC12) hücreleri NGF ve allokriptopin içeren besi ortamı ile 18 saat boyunca etüv koşullarında inkübe edilmiştir. 6. gün ise hücreler 24 boyunca 200 μM H_2O_2 ile inkübe edilerek oksidatif strese indüklenmiştir. Oksidatif stres kaynaklı AH hücresel modelinin oluşturulduğu bu H_2O_2 inkübasyon süresi ve konsantrasyonu 116S299 no'lu 1001 TÜBİTAK projesi kapsamında belirlenmiş olup, tez çalışması proje kapsamında olmadığı için sonuçları verilmemiştir. Tek başına allokriptopin uygulanan gruplarda ise allokriptopin uygulaması sonrası hücreler oksidatif strese indüklenmemiş, besi ortamı ile bir gün daha inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmadaki uygulama grupları

<u>Gruplar</u>	<u>İlk 4gün</u>	<u>5. gün</u>	<u>6.gün</u>
Kontrol 1	Besi ortamı	Besi ortamı	Besi ortamı
Kontrol 2	Besi ortamı	Allokriptopin (120 ve 150 µg/mL) 18 saat	
H₂O₂	Besi ortamı	Besi ortamı	H ₂ O ₂ (200 µM) 24 saat
Deney modeli	Besi ortamı	Allokriptopin (25, 50, 100, 120, 150 µg/mL) 18 saat	H ₂ O ₂ (200 µM) 24 saat

3.2.5. Oksidatif hasar ve antioksidan çalışmaları

Tüm oksidatif hasar ve antioksidan çalışmalarında deney modeli Çizelge 3.1’de belirtildiği gibi 5×10^5 hücre/kuyucuk yoğunluğundaki hücrelerden oluşturulmuştur. 6. günün ardından, hücre kazıyıcı ile kazınan örnekler $+4^\circ\text{C}$ ’de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir (2500 g). Pelletler radyo-immünopresipitasyon tayin (RİPA, Thermo Scientific) tamponu ile çözülmüştür (Pan ve diğerleri, 2010). Elde edilen proteinlerin miktarı bisikoninik asit (BCA, Thermo Scientific) protein kiti ile belirlenerek çalışmalara başlanmıştır.

Malondialdehit düzeyinin belirlenmesi

Lipit peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit (MDA) düzeyinin ölçümü için Ohkawa ve arkadaşlarının (1979) yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır (Ohkawa ve diğerleri, 1979). Yöntem lipit peroksidasyonu sonucu oluşan MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA)’in reaksiyonu esasında dayanmaktadır ve pembe renk değişimi karakterize edilmektedir.

Her grup için %0,8 Tiyobarbitürik asit, %20 Asetik asit ve %8,1 Sodyum dodesil sülfat içeren 1,6 mL’lik çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Tüplerdeki çalışma çözeltisinin üzerine eşit konsantrasyondaki örnekler ve standart pipetlenerek eklenmiştir. Standart olarak 200, 100, 50, 25, 12,5 6,25 µmol/L konsantrasyonların 1,1,3,3 tetraetoksipropan kullanılmıştır. Körv için ise RİPA solüsyonu kullanılmıştır. Tüpler, 30dk boyunca 80°C ’de inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrası soğumaya bırakılmıştır. Deney grubuna ait tüplerin üzerlerine 2 mL isobütanol eklenerek 3000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Tüplerdeki bütanol faz 96

kuyucuklu plakalara dağıtılarak, Elisa plate okuyucu ile 532 nm’de (OD_{532}) okunmuştur. Sonuçlar standart grafiğinin denkleminde elde edilen eğim değeri (m) kullanılarak “(OD_{532}/m) x dilüsyon faktörü” formülüne göre hesaplanmıştır.

Total oksidan ve antioksidan kapasitesinin belirlenmesi

Nörodejeneratif hastalıklarda oksidatif stresin bir göstergesi olan hücre içindeki total oksidan kapasitenin (TOS) ve total antioksidan kapasitenin (TAS) değişmektedir. Bu nedenle allokriptopin ön muamelesi sonrası H_2O_2 ile oksidatif strese uğratılan hücrelerdeki TOS ve TAS seviyeleri Erel’in metodu kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler için Rel Assay Diagnostics marka TOS ve TAS kitleri kullanılmış olup, deneyler üretim talimatlarını doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (Erel, 2004, 2005).

Ortamdaki oksidanların ferröz iyon-o-dianisidini ferrik iyona oksitlemesi esasına dayanan TOS çalışmasında, gliserol varlığında oksitleme reaksiyonu hızlandırılarak, düşük pH varlığında gerçekleşen ferrik iyon-xylenol orange kompleksinin renk yoğunluğu ölçülmüştür. 500 μ L tampon çözeltisi ile karıştırılan örnekler 530nm’de ölçülmüştür. İlk okumanın ardından 25 μ L’de demir içeren substrat konsantrasyonu eklenmiştir. 10 dk oda koşullarında bekletildikten sonra karışımın ikinci okuması da gerçekleştirilmiştir.

A_1 : 530 nm’deki ilk okuma

A_2 : 530 nm’deki ikinci okuma

$A_2 - A_1$: Δ Absorbans (Örnek/Standart)

TOS (μ mol hidrojen peroksit eşdeğeri/mg): (Δ Abs Örnek) / (Δ Abs Standart) $\times$ Standartın konsantrasyonu (20 μ mol/L)

TAS çalışmasında ise, demir-o-dianisidin ile H_2O_2 reaksiyonu sonucu oluşan hidroksil radikallerinin o-dianisidinle reaksiyonu nedeniyle meydana gelen sarı ile kahverengi arasındaki renk oluşumu ölçülmüştür. 500 μ L tampon çözeltisi ile karıştırılan örnekler 660 nm’de ölçülmüştür (A_1). Ardından prokromogen çözeltisinden 75 μ L daha eklenerek, karışım oda koşullarında 10 dk bekletilerek, 660nm’deki ikinci okuması (A_2) yapılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

Δ Absorbans (Bidistile su/Örnek/Standart): $A_2 - A_1$

TAS [Trolox eşdeğeri (mmol/L)/L]: $(\Delta\text{Abs su}) - (\Delta\text{Abs Örnek}) / (\Delta\text{Abs su}) - (\Delta\text{Abs Standart})$

Sonuçlar ayrıca, oksidatif stres indeksi (OSI) olarak kabul edilen TOS'un TAS'a oranı şeklinde de verilmiştir. Bunun için elde edilen TOS ve TAS verileri aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır ve mmol Trolox eşdeğeri/L olarak ifade edilmiştir (Yumru ve diğerleri, 2009).

$$\text{OSI} = \text{TOS (H}_2\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eşdeğeri/L) / TAS (Tromol Trolox eşdeğeri/L)}$$

SOD enzim aktivitesinin belirlenmesi

Antioksidan sistemin başlıca enzimlerinden biri olan SOD aktivitesinin ölçümü Beauchamp ve Fridovich (1971)'in yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Beauchamp ve Fridovich, 1971). Yöntem süperoksit radikalleri ile nitroblue tetrazolium (NBT) arasındaki reaksiyonunun SOD varlığında gerçekleşmemesi ve formazan kristallerinin oluşumunun engellenmesi prensibine dayanmaktadır. Bu yöntemde O_2 ve metiyonin gibi elektron donörünün varlığında riboflavinin aydınlatılması süperoksit anyonlarının (O_2^-) oluşumuna neden olmaktadır. Süperoksit dismutaz aktivitesinin yokluğunda, O_2^- NBT ile etkileşime girerek sarı tetrazolumu mavi formazana indirgemektedir. Çalışma için 50 mili molar (mM) Fosfat Tamponu (pH 7,8), 2,5 mM NBT, 201 mM l-metionin ve %1 Triton X-100 içeren substrat tamponu hazırlanmıştır. Her grup için 1970 μL substrat tamponunun üzerine eşit konsantrasyonlardaki örnekler ve 300 μL riboflavin eklenmiştir. Karışım 96 kuyucuklu mikropalakaya her kuyuda 200 μL olacak şekilde dağıtılmıştır. Işık altında sekiz dakika inkübe edildikten sonra reaksiyonu durdurmak için ışık alması engellenmiştir. 560 nm'de ölçümlendi. Tüm örneklerin SOD aktivitesi %cinsinden ifade edilmiştir.

KAT enzim aktivitesinin belirlenmesi

SOD sonucu oluşan H_2O_2 'i katabolize eden KAT enziminin aktivitesi Cohen ve arkadaşlarının (1970) metodu kullanılarak belirlenmiştir (Cohen ve diğerleri, 1996). Bu yöntemde eşit konsantrasyonlardaki örnekler 10mM potasyum fosfat çözeltisi, 10mM sodyum azid ve 60mM H_2O_2 ile karıştırılarak 1mL'lik çözelti oluşturulmuştur. Diğer yandan ışık almayacak şekilde 10mM demir II sülfat ve 0,3M sülfürik asit içeren 5 mL'lik başka bir karışım daha hazırlanmıştır. Hazırlanan bu karışıma 100 μL hücre içeren çözelti eklenmiştir.

Reaksiyon 2,5M potasyum tiyosiyanat yardımı ile durdurulmuştur ve turuncu/pembe renk oluşumu gözlemlenmiştir. Durdurulan reaksiyon karışımı 96 kuyucuklu plakalara dağıtılarak, 2. ve 10. dk'da 492nm dalga boyunda okutulmuştur. KAT enziminin aktivitesi “(OD₂/OD₁₀)/8” denklemi ile hesaplanmıştır ve % cinsinde ifade edilmiştir.

GPx enzim aktivitesinin belirlenmesi

GPx enzim aktivitesi Beutler'in yöntemi kullanılarak belirlenmiştir . Bu yöntemle ile GPx aktivitesi NADPH NADP⁺'ya yükseltirirken ortaya çıkan 340 nm'deki absorbans farklı temel alınarak tayin edilmiştir. Örnek, standart ve körv grupları Çizelge 3.2'deki gibi hazırlanmıştır. Ardından 2,5dk ara ile 3 kez 340nm dalga boyunda okutulmuştur. Sonuçlar aşağıdaki formülü ile belirlenip, % formatında ifade edilmiştir.

$$(U / ml) = (\Delta OD / t) \times [(Vt) / (6,22 \times Vö)]$$

OD : Zaman aralıkları ile absorbansdaki değişim

t : Zaman

Vt : Toplam reaksiyon hacmi (mL)

Vö : Örnek hacmi (mL)

6,22 : 1 mol NADPH'ın OD değeri

Çizelge 3.2. GPx enzim aktivitesinin tayininde kullanılan kimyasallar

Çözeltiler	Örnek/Standart (µl)	Kör (µl)
Fosfat Tamponu (pH:7)	100	-
0,1M Glutasyon	10	-
0,2M EDTA	20	-
Glutasyon redüktz	100	-
0,4M Sodyum-azid	10	-
2mM NADPH	100	-
Örnek/Standart	50	-
ddH ₂ O	630	640
10mM H ₂ O ₂	10	-

3.2.6. AChE aktivite ve ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

AChE enzim aktivitesinin belirlenmesi

Kollejen ile kaplanmış altı kuyucuklu mikrolakalara 5x10⁵ hücre/kuyucuk ekilmiştir. Dört gün boyunca farklılaştırılan hücrelere önce 18 saat boyunca 25-150 µg/mL allokrriptopin,

sonra da 24 saat boyunca 200 μ M H₂O₂ uygulanmıştır. Uygulamaların sonunda soğuk PBS ve hücre kazıyıcı (Thermo Fischer Scientific) ile kazınan hücreler 10000 rpm’de +4°C’de 5dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra pelletler 1M Tris Solüsyonu (pH:7,2), 2M NaCl, 1M MgCl₂, Triton X-100 ve ddH₂O içeren soğuk çözme tamponu ile lize edilmiştir. 10000g +4°C’de 30dk santrifüj edildikten sonra çalışmalara elde edilen süpernatant ile devam edilmiştir. H₂O₂ ve allokrıptopın konsantrasyonlarının AChE aktivasyonu üzerindeki etkisinin saptanması için Ellman ve arkadaşlarının (1961) yönteminden yararlanılmıştır (Ellman ve diğerleri, 1961). 96 kuyucuklu mikropalakalara çözme tamponu ve örnekler eklenmiştir. Ayrıca, dithiobisnitrobenzoate ve asetiltiokolin iyodür çözeltileri hazırlanmıştır ve Çizelge 3.3’de belirtildiği gibi uygulanmışlardır. Dithiobisnitrobenzoate (DTNB) çözeltisi: 19,8 mg DTNB, 7,5 mg sodyum bikarbonat (NaHCO₃) içeren 5.0 mL 0,1 M fosfat tamponu (pH: 7)’unda çözöldürölerek hazırlanmıştır. Daha sonra 1/8 oranında 0,1875 mg /mL sodyum bikarbonat içeren 0,1 M fosfat tamponu ile seyreltilmiştir. Hazırlanan çözelti buz üzerinde ve karanlık bir şekilde bekletilmiştir.

Asetiltiokolin iyodür çözeltisi: 21,7 mg asetiltiokolin iyodür 1 mL dH₂O içerisinde çözölmüştür ve 1/40 oranında 0,1 M fosfat tamponu (pH:8) ile seyreltilmiştir. Hazırlanan çözelti buz üzerinde ve karanlık bir şekilde bekletilmiştir. Sonuçlar ise (örnek absorpsansların ortalaması)/(kontrol absorpsansların ortalaması)*100 formölü ile hesaplanarak, % aktivite şeklinde verilmiştir.

Çizelge 3.3. AChE enzim aktivitesinin tayininde kullanılan kimyasallar

	Kontrol	Örnek
Örnek	-	50 μ l
Çözme tamponu	200 μ l	150 μ l
DTNB	50 μ l	50 μ l
Vorteklenerek 10dk oda sıcaklığında ışık almasızın bekletildi.		
Asetilkolin iodür	50 μ l	50 μ l
Vorteklenerek 10dk oda sıcaklığında ışık almasızın bekletildi ve 412 nm’de okundu.		

AChE mRNA ifade düzeyinin belirlenmesi

Altı kuyucuklu mikropalakalarda geliştirilen hücrelere ilgili uygulamalar yapıldıktan sonra hücreler soğuk PBS ve hücre kazıyıcı ile kazınmıştır. Daha sonra elde edilen hücre

pelletinden PureLink RNA mini kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Kazınan hücreler +4°C'de 2000g ile 5dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası akış atılmıştır ve pelletler 2-mercaptoetanol (Merck) içiren lizis tamponu ile çözülmüştür. +4°C'de 16000g'de 10dk santrifüj edildikten sonra çözülmüş pelletlere etanol eklenerek vortexlenmiştir. Sonrasında örnekler döndürme kolonlu toplama tüpüne aktarılmıştır. +4°C'de 12000g ile 10dk santrifüj edildikten sonra döndürme kolonuna 700 µl yıkama tamponu I eklenmiştir ve 12000g'de 15sn santrifüj edilmiştir. Kolonun toplama tüpü değiştirilmiştir ve bu kez de etanol içeren 500 µl yıkama tamponu II eklenmiştir. 12000g'de 1-2 dk santrifüje edildikten sonra kolon kurtama tüpüne taşınmıştır ve kartuşun merkezine eklenen nükleaz içermeyen su ve santrifüj basamağının ardından kolondaki RNA'lar kurtarma tüpüne aktarılmıştır (Oda ve diğerleri, 2016).

İzole edilen RNA'ların saflığı ve miktarı mikrolaka okuyucu yardımıyla ölçülmüştür. Çalışmalara 260/280 nm değeri 2 olan RNA'lar cDNA'ya çevrilmiştir.

Elde edilen RNA'lar High-Capacity cDNA Reverse Transkripsiyon Kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak cDNA çevrilmiştir. 2X RT solüsyonu ile RNA örnekleri 1:1 oranında karıştırılmıştır. Daha sonra 25°C'de 10dk, 37°C'de 120dk ve 85°C'de 5dk PZR cihazında inkübe edilmiştir. cDNA'nın saflığı ve miktarı mikrolaka okuyucu ile ölçülmüştür ve 260/280 değeri 1,7-1,8 olan örnekler ile qRT-PZR çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Enayah ve diğerleri, 2018). Eşit miktardaki cDNA örnekleri ile AChE'nin mRNA ifade düzeyini Real-Time PZR yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç için cDNA kalıp alınarak, AChE'ye özgü F-CGCAGCAATACGTGAGCCTGAA, R-GTGGCGCTGAGCAATTTGGG (Xu ve diğerleri, 2016a) dizisi ile qRT-PZR gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon için 0,5 µl primerleri, 10 µl Sybergreen ve 6,4 µl steril edilmiş dH₂O içeren karışım ile 2 µl cDNA (1:20 sulandırılmış) PZR plakasının kuyucuklarına yüklenmiştir. Bir döngü 95°C'de 15 saniye 40 döngü 95°C'de 15 saniye, 65°C'de 20saniye, 72°C'de 20 saniye (Liao ve diğerleri, 2012) PZR koşullarında çalıştırılmıştır. İncelenen genin ifade düzeylerini normalize etmek için housekeeping bir gen olan GAPDH geninin mRNA düzeyi referans alınmıştır. PZR reaksiyonu Applied Biosystems QuantStudio 3 (Applied Biosystems QuantStudio) cihazında gerçekleştirilmiştir ve genlerin ekspresyon miktarlarındaki değişimi $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile hesaplanmıştır. Ayrıca bu çalışma için Fast SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) boyası kullanılmıştır (Lee ve diğerleri, 2018).

ACHe protein ifade düzeyinin belirlenmesi

Hücrelerden total proteinin elde edilmesi: Geliştirilen hücreler soğuk PBS ile yıkanıp, hücre kazıyıcısıyla ile kazınarak toplanmıştır. Kazınan örnekler 5 dk boyunca 2500g'de santrifüj edilmiştir ve pelletler RİPA lizis tamponu ile çözülmüştür. Total protein miktarı BCA protein kiti (Thermo Fisher Scientific) ile belirlenmiştir. Örnekler, β -mercaptoethanol'lü Laemmli karışım ile 1:1 oranında karıştırılıp 95°C'de 10 dk ısıtılarak denatüre edilmiştir. Denatüre edilen hücre lizatı, %4-12'lik hazır poliakrilamid jel üzerinde 65 dk boyunca 120 voltta yürütülmüştür. Bantların kDa tayini jele yüklenen marker ile yapılmıştır. Tanktan çıkarılan jel, PVDF membran ve transfer solüsyonunda ısıtılmış transfer pedleri ile sandviç modeli oluşturulup, transfer işlemi başlatılmıştır. Transfer işlemi 20 voltta 7dk süresince gerçekleştirilmiştir. Membran, bir saat boyunca %2'lik yağsız süttozu solüsyonu ile muamele edilerek bloklanmıştır. Membran daha sonra üç kez 5'er dk deterjan ve iyon içeren yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Ardından primer antikor ile muamele edilmiştir: Önerilen oranlarda %2'lik yağsız süttozu solüsyonu ile 1:100 oranında dilüe edilen primer antikorlar ile membran oda sıcaklığında iki saat boyunca çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinden sonra yıkanan membran %2'lik yağsız süttozu solüsyonu ile 1:500 oranında seyreltilen AChE proteinine özgü tavşan sekonder antikor ile bir saat boyunca çalkalanarak muamele edilmiştir. Sekonder antikor muamelesi sonrası yıkanan membra kromojenik AP konjuge edilmiş boya ile bir saat boyunca boyanmıştır. Bidisitle H₂O ile boya yıkanmıştır ve membran gece boyu kurumaya bırakılmıştır. Membran üzerinde elde edilen bantlar Bio-Rad görüntüle sistemi ile görüntülenip, ImageLab programı ile analizi edilmiştir. Elde edilen sonuçların normalizasyonu aynı örnekler ile çalışılan protein düzeyindeki GAPDH ile gerçekleştirilmiştir (Cervellini ve diğerleri, 2013).

3.2.4. fPC12 hücrelerindeki morfolojik değişimin mikroskopik takibi

fPC12 hücrelerindeki morfolojik değişimi takip edebilmek amacı ile Çizelge 3.1'de belirtilen deney planına uygun olarak kollejen ile kaplanmış (Frankel ve diğerleri, 2009) ve 1×10^4 /ml hücre içeren (Hur ve diğerleri, 2004) altı kuyucuklu mikropalakalar hazırlanmıştır. İnkübasyon süresinin ardından hücreler, PBS ile yıkanıp, 15 dk boyunca %1'lik toluidin mavisi ile boyanmıştır. Boyanan kuyucuklar SCMOS05000KPA mikroskop kamerası ile donatılmış LEICA marka DM IL LED inverted mikroskobu ile görüntülenerek, rastgele seçilmiş en az 10 alandan 100 hücre fotoğraflanmıştır (Liu ve diğerleri, 2018). 10X büyütme

ile elde edilen görüntüler aynı koşullar altında fotoğraflanan kalibrasyon slaytı ile kalibre edilmiş ImageJ programındaki Neurite Tracer eklentisi ile ölçümlenmiştir. Ölçüm birimi olarak μm kullanılmıştır. Ölçümler sırasında akson uzunlukları, hücre gövdesinin en az iki katı olduğunda hücreler farklılaşmış sayılmış ve ölçümlemeye alınmıştır. fPC12 hücrelerinin yarıçapı, hücrelerden çıkan dallanma miktarı ve dallanma yapan uzantılardan herhangi bir sinaptik bağ yapmamış ana uzantılar referans olarak alınmıştır (Harrill ve Mundy, 2011; Zeng ve diğerleri, 2014). Ortalama nörit uzunluğu, hücre çapı ve dallanma miktarı belirtilen formüle göre hesaplanmıştır ve her bir deney grubunun ortalama değeri kontrol grubu ile karşılaştırılıp, elde edilen sonuçlar % olarak ifade edilmiştir (Ergin ve diğerleri, 2016).

Ortalama uzunluk = Toplam uzunluk/Hücre sayısı

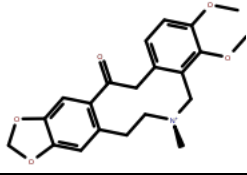
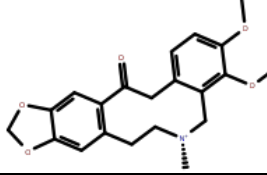
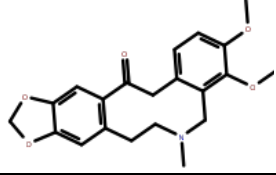
3.2.7. Verilerin değerlendirilmesi

Tüm çalışmalar iki paralel ve tekrarlı yapılmıştır. Ayrıca, bu çalışmalardan elde edilen verilerin ortalama değerleri ve standart sapmaları da hesaplanmıştır. Deney gruplarının nörit morfolojisi, oksidatif hasar ve antioksidan metabolizma ve kolinerjik iletim üzerindeki oksidatif strese karşı nörokoruyucu etkisinin istatistiksel olarak anlamlılığı Tek Yönlü Anova Post Hoc Tukey HSD testi ile kontrol grubu ile H_2O_2 uygulanmış grup arasındaki fark ise, Independent T-testi kullanılarak belirlenmiştir. Tüm istatistiksel analizler IBM SPSS 22 istatistik programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve 0,05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.2.8. Ligandların hazırlanması

Allokriptopin molekülü Schrödinger yazılımındaki LigPrep modülünde OPLS3e kuvvet alanı ve yükleri kullanılarak hazırlanmıştır. Olası konformasyonları, sterokimyasal, tautomer, protonizasyon ve iyonizasyon durumları 7,2 pH'da Epik ile hesaplanmıştır (Harder ve diğerleri, 2016). Ligand hazırlama işlemi sonucunda allokriptopine ait olası üç yapı tespit edilmiştir (Çizelge 3.4). İleri çalışmalar için (farmokokinetik, moleküler kenetlenme ve dinamik simülasyon) çizelgedeki ligandların tautomerizasyon özelliği ve iyonizasyon ceza puanı en düşük olan iki konformasyonu seçilmiştir (Schrodinger, 2021a).

Çizelge 3.4. Allokriptopinin olası konformasyonları

			
İyonizasyon ceza puanı	0,029	0,029	1,79
Durum ceza puanı	0,024	0,024	1,91
Tautomerizasyon	1,0	1,0	1,0

3.2.9. Allokriptopinin farmakokinetik özelliklerinin belirlenmesi

Emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite (EDMA-T) bir etken maddenin kinetiğini, performansını ve farmakolojik aktivitesini etkileyen başlıca parametrelerdir. Bu özelliklere ilave olarak kan-beyin bariyerini aşması, nörodejeneratif hastalıkları hedefleyen aday ilaç çalışmaları için oldukça önemlidir (Feng ve diğerleri, 2017). Bu sebepten allokriptopinin EDMA-T profili Schrödinger 2021-1 yazılımındaki Qikprop modülü kullanılarak belirlenmiştir. Toksisite profili ve ilaç olabilme potansiyeli ile ilgili parametreler (QplogPo/w, QplogHERG, QPPCaco, QPPMDCK, Yüzde İnsan Oral Emilimi ve Lipinskinin Beşinci Kural) yazılımdaki QikProp modülü kullanılarak hesaplanmıştır (Vijayakumar ve diğerleri, 2018).

3.2.10. Proteinlerin hazırlanması

Bu çalışma için, allokriptopin izomerlerinin hücresel antioksidan mekanizmanın birincil hattındaki üç enzim (SOD, KAT ve GPx) ve AH'ye yönelik tedavi yaklaşımları için altın standart olan AChE'nin üzerindeki inhibitör potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır. SOD, KAT, GPx ve AChE enzimlerine ait kristal yapıları (PDB'leri sırasıyla 5YTU, 1DGH, 5H5Q ve 4EY7) RCSB veri tabanından indirilmiştir. Çözünürlükleri sırasıyla 2 Å, 1,9 Å, 1,1 Å ve 2.35 Å olan yapıların seçiminde, aktif bölge referans almak için inhibitör ile etkileşime sahip olan yapılar, aktif bölge rezidülerinin çözünürlüğü ve kaynak organizmaları esas alınmıştır. Kristaller indirildikten sonra su molekülleri ve ligandları yapıdan çıkarılmıştır. Schrödinger yazılımının "Protein Preparation" modülü ile proteinlerdeki eksik atomlar tamamlanmıştır ve reseptör yapısı 7,2 pH değerinde OPLS3e kuvvet alanı parametreleri ile optimize ve minimize edilmiştir (Bezoari, Massimo D ve Boothe, 2019; Mazumder ve diğerleri, 2019; Schrodinger, 2021b).

3.2.11. Proteinlerin aktif bölgesinin kenetlenme hesapları için hazırlanması

Kenetlenme çalışmaları için aktif bölgeler enzim inhibitörlerinin reseptör yapılarındaki bağlanma bölgeleri esas alınarak seçilmiştir. Seçilen bölgeler için reseptör kafesleri Glide modülünün varsayılan parametreleri kullanılarak hesaplanmıştır. 20 Å boyutuna sahip ızgara merkezi, aktif bölgenin ağırlık merkezi olarak seçilmiştir (Bezoari, Massimo D ve Boothe, 2019; Mazumder ve diğerleri, 2019; Schrodinger, 2021c).

3.2.12. Moleküler kenetlenme hesaplamaları

Ligandların reseptörlerin aktif bölgelerine kenetlenme pozisyonları ve puanları Schrödinger yazılımındaki Glide modülü kullanılarak XP (yüksek) hassasiyetinin varsayılan parametreleri ile hesaplanmıştır. Ayrıca, tüm pozlar yerleştirme sonrası bir minimizasyon işlemine de tabi tutulmuştur. Her ligand-protein kompleksi için en iyi kenetlenme puanına sahip konformasyon seçilmiştir. Bu puanlar bağlanma afinitesi, iç gerginlik enerjisi, Coulomb ve van der Waals etkileşimleri gibi parametreleri barındırmaktadır .

3.2.13. Simülasyon sistemlerinin hazırlanması

MD simülasyon hesapları için ligand-protein kompleksleri oktahedral kutu içinde SPC su modeli ile çözülmüştür. Protein ile çözelti kutusunun kenarları arasında en az 10 Å'lık tampon çözelti bölgesi oluşturulmuştur. Ardından yüküne göre sisteme Na^+ veya Cl^- iyonları eklenerek nötralize edilmiştir. Ayrıca, fizyolojik koşullara yakın bir simülasyonun elde edilebilmesi için sisteme 0,15 M konsantrasyonunda tuz eklenmiştir. Tüm sistem hazırlıkları Schrödinger yazılımındaki Desmond programı ile yapılmıştır (Berendsen ve diğerleri, 1981; Bowers ve diğerleri, 2006).

3.2.14. Moleküler dinamik simülasyon

Ligand-protein kompleksinin kararlılığının testi için tüm sistemler en az 5 ns'lik simülasyona tabi tutulmuştur. Enerji minimizasyonu ve ısıtma işlemi Desmond modülündeki varsayılan işlem sırasına göre yapılmıştır. Hidrojen atomlarının dahil olduğu kovalent bağların uzunluğunun sabitlenmesi amacı ile SHAKE algoritması kullanılmıştır ve böylece hesaplamalar 2 fs'lik zaman adımı ile gerçekleştirilmiştir (Kräutler ve diğerleri, 2001).

Sistemin sıcaklığının 310 K'da dengelenebilmesi için Nose-Hoover termostadı kullanılmıştır. Elektrostatik etkileşimler ise “Partical Mesh Ewald” yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır ve hesaplama çemberi 9 Å ile sınırlandırılmıştır (Evans ve Holian, 1985). Sistem basıncı Berendsen barostat termostadının 2,0 ps'lik zaman parametresi kullanılarak 1 bar'da sabitlenmiştir. Tüm MD simülasyon hesaplamaları OPLS3e kuvvet alanı parametreleri kullanılarak Desmond programı ile yapılmıştır (Berendsen ve diğerleri, 1984).



4. BULGULAR

4.1. *İn-vitro* Çalışmalara ait Bulguları

4.1.1. Allokriptopinin PC12 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi

PC12 *Rattus norvegicus*'dan elde edilen feokromasitoma tipi hücrelerinden oluşan bir hücre hattıdır. PC12 hücreleri nöral büyüme faktörü (NGF)'ne yanıt olarak katekolamin sentezlemekte ve hem morfolojik hem de fonksiyonel olarak sempatik ganglion nöronlarına farklılaşmaktadırlar. Bu sebepten nörobiyolojik, nörofarmakolojik, nörotoksikolojik ve nöral gelişim çalışmalarında model olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada da, allokriptopinin toksik olmayan konsantrasyonun ve inkübasyon süresinin PC12 hücrelerinde MTT yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç ile PC12 hücreleri allokriptopinin 20, 25, 50, 100, 120, 150, 240 ve 300 µg/mL konsantrasyonları ile 12, 18 ve 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ayrıca, allokriptopinin çözücüsü olan %0,08'lik kloroform da kontrol olarak hücrelere uygulanmıştır, kontrol olarak da hiçbir uygulama yapılmamış sadece besi ortamı ile inkübe edilmiş PC12 hücreleri kullanılmıştır.

Sonuçlar, allokriptopinin çözücüsü olan kloroformun her üç inkübasyon süresinde de anlamlı bir ölüme neden olamadığını göstermiştir. Çizelge 4.1'de de görülebileceği üzere, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 12 saat boyunca 20-150 µg/mL, 18 saat boyunca 20 ve 25 µg/mL ve 24 saat boyunca 20µg/mL allokriptopin ile inkübe edilen hücrelerin canlılığında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Diğer yandan artan allokriptopin konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri ile birlikte hücre canlılığının azaldığı gözlemlenmiştir. 12 saat boyunca 120-300 µg/mL allokriptopin konsantrasyonları ile inkübe edilen fPC12 hücrelerinin canlılığının %6-64 oranında, 18 saat boyunca 50-300 µg/mL allokriptopin ile inkübe edilen hücrelerin hücre canlılığını ise %13-71 oranında azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Diğer yandan, 24 saat boyunca 25-300 µg/mL allokriptopine maruz kalan hücrelerin canlılığı %24-74 oranında azalmıştır ($p<0,05$). İlaç geliştirme çalışmaların da hücre canlılığının %80'nin altına düşmesi önerilmemekte olup, bu durum toksisite ile ilişkilendirilmektedir. 24 saat süren allokriptopin uygulamalarının düşük dozlarda dahi PC12 hücrelerinde yüksek yüzde ölüm oranlarına neden olması, bu sürenin toksik olacağını göstermiştir. 116S299 nolu Tübitak projesi kapsamındaki çalışmalarda ise, en iyi uyarımın

18 saatlik inkübasyonda ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Bu sebepten çalışmalarda kullanılacak allokrriptopinin uygun doz ve inkübasyon süresinin belirlendiği ön çalışma sonuçlarına göre, toksik etkisi az / olmayan ve etkinlik potansiyeline sahip olabilecek allokrriptopinin muameleleri için 25-150 µg/mL konsantrasyonlarındaki 18 saatlik inkübasyon uygulamaları seçilmiştir ve bundan sonraki çalışmalarda bu konsantrasyonlar ve süre uygulanmıştır.

Çizelge 4.1. Allokrriptopinin PC12 hücrelerinin % hücre canlılığı üzerine etkisi. Sonuçlar, ortalama±S.S. olarak verilmiştir (#: Kontrole göre allokrriptopinin etkisi $p<0,05$)

Uygulama grupları		% Hücre Canlılığı		
		12 saat	18 saat	24 saat
		100±3	100±2	100±4
Kontrol ^a Kloroform ^b		99±4	96±2	95±2
	Konsantrasyonlar (µg/mL)			
Allokrriptopin ^c	20	100±4	97±3	95±3
	25	98±6	95±5	76±4 [#]
	50	97±2	87±7 [#]	70±4 [#]
	100	96±5	85±3 [#]	68±5 [#]
	120	94±7 [#]	84±4 [#]	62±2 [#]
	150	92±2 [#]	80±2 [#]	57±3 [#]
	240	50±3 [#]	34±3 [#]	27±2 [#]
	300	34±2 [#]	29±4 [#]	26±3 [#]

^a Uygulama yapılmamış PC12 hücreleri.

^b %0,08 kloroform uygulanan PC12 hücreleri

^c 12, 18 ve 24 saat boyunca allokrriptopinin uygulanan PC12 hücreleri

4.1.2. Allokrriptopinin H₂O₂ ile indüklenmiş PC12 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi

Bu tez çalışmasında, allokrriptopinin H₂O₂ ile AH modeline indüklenen fPC12 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. 18 saat boyunca 25, 50, 100, 120 ve 150 µg/mL allokrriptopinin ile inkübe edilen hücreler daha sonra 24 saat boyunca 200 µM H₂O₂ ile oksidatif strese maruz bırakılmışlardır. fPC12 hücrelerini normal oksidatif hasar ile nöral ölüme götüren, H₂O₂ inkübasyon süresi ve konsantrasyonu 116S299 nolu Tübitak projesi kapsamında belirlenmiş olup, bu tez çalışması proje kapsamında olmadığı için sonuçları verilmemiştir. Bu çalışmada kontrol grubu olarak ise yalnızca besi

ortamı ile inkübe edilmiş hücreler referans alınmış olup, allokriptopinin çözücüsü olan kloroform ayrıca denenmemiştir.

Çizelge 4.2’de de görüldüğü üzere, 200 μM H_2O_2 uygulaması hücre canlılığını %47 azaltmıştır ($^{\#}p<0,05$). Diğer yandan allokriptopinin ön muamelesinden sonra 200 μM H_2O_2 uygulandığında, allokriptopinin H_2O_2 ’nin oluşturduğu toksisiteye karşı koruyucu etki gösterdiği gözlemlenmiş olup, farklı allokriptopin konsantrasyonlarında %6-17 aralığında nöroprotektif etki tespit edilmiştir ($^*p<0,05$). Ancak, artan allokriptopin konsantrasyonları (25-150 $\mu\text{g/mL}$) ile birlikte koruyucu etkinin azaldığı, 150 $\mu\text{g/mL}$ allokriptopin uygulamasının H_2O_2 ile birlikte kısmi de olsa toksisite gösterdiği dikkat çekmiştir. H_2O_2 uygulamasına göre en yüksek canlılık sırasıyla %70 ve %69 oranları ile 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında gözlemlenmiştir. Yalnızca allokriptopin uygulamasında olduğu gibi H_2O_2 ile indüklenen hücrelerde de artan allokriptopin konsantrasyonları ile birlikte hücre canlılığının azalma eğiliminde olduğu fark edilmiştir. Ancak, 25-120 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki hücre canlılık oranı H_2O_2 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Diğer yandan, 150 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki hücre canlılık oranının ise H_2O_2 ’in altında ve istatistiksel açıdan anlamsız olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçların ışığında, allokriptopin ön muamelesi sonrası H_2O_2 uygulanarak oluşturulan hücre modelinde 25-120 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığındaki allokriptopin uygulamalarının model için daha uygun olacağı ortaya konulmuştur.

Çizelge 4.2. Allokriptopinin H_2O_2 ile AH modeline indüklenen PC12 hücrelerinin % hücre canlılığı üzerine etkisi. (Sonuçlar, % ortalama $\pm$ S.S. olarak verilmiştir. $^{\#}$: Kontrole göre H_2O_2 ’nin etkisi, * : H_2O_2 ’ye göre allokriptopin konsantrasyonlarının etkisi $p<0,05$)

Uygulama grupları	% Hücre Canlılığı	
Kontrol ^a		100 $\pm$ 2
H_2O_2 ^b		53 $\pm$ 1 [#]
	Konsantrasyonlar ($\mu\text{g/mL}$)	
	25	70 $\pm$ 6 [*]
Allokriptopin	50	69 $\pm$ 7 [*]
+	100	66 $\pm$ 5 [*]
H_2O_2 ^c	120	59 $\pm$ 8 [*]
	150	48 $\pm$ 3

a Uygulama yapılmamış PC12 hücreleri

b 24 saat boyunca 200 μM H_2O_2 uygulanan PC12 hücreleri

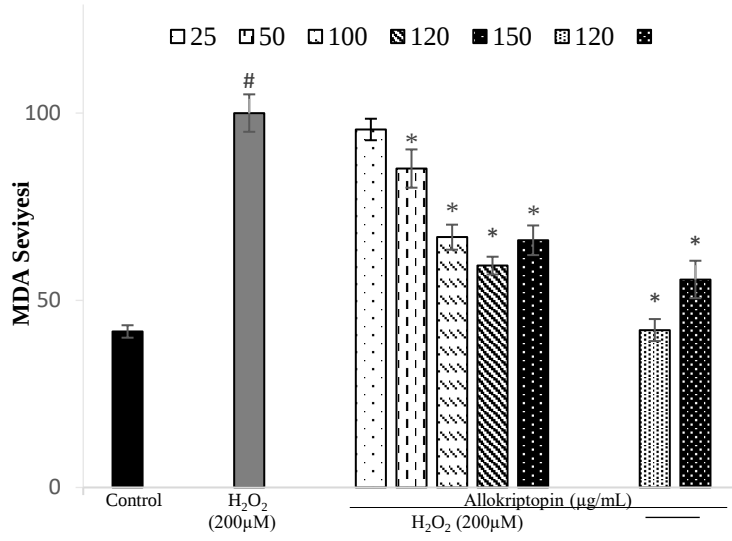
c 18 saatlik allokriptopin ön muamelesi sonrası 24 saat boyunca 200 μM H_2O_2 uygulanan PC12 hücreleri

4.1.3 Allokriptopinin lipit peroksidasyonu üzerindeki etkisi

Bu çalışma ile H_2O_2 tarafından tetiklenen lipit peroksidasyon düzeyinin ve farklı allokriptopin konsantrasyonlarının H_2O_2 ile indüklenen lipit peroksidasyonu üzerindeki etkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaçla allokriptopin konsantrasyonlarının (25-150 $\mu\text{g/mL}$) H_2O_2 ile AH modeline indüklenen fPC12 hücrelerindeki MDA seviyesi üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Ayrıca, en yüksek iki konsantrasyon olan 120 ve 150 $\mu\text{g/mL}$ allokriptopinin oksidatif stres olmaksızın tek başına muamelesinin fPC12 hücrelerinin MDA düzeyi üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Kontrol olarak ise, yalnızca besi ortamı ile inkübe edilen fPC12 hücreleri kullanılmıştır.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, H_2O_2 muamelesi ile fPC12 hücrelerindeki MDA seviyesi %85 oranında artmıştır ($\#p<0,05$). Bu durum, 200 μM H_2O_2 ile indüklenen fPC12 hücrelerinde oksidatif stresin oluşturulduğunu göstermektedir.

Allokriptopin ön muamelesi ile ise Şekil 4.1’de de görüldüğü üzere MDA seviyesinin artışı %4-41 oranında baskılanmıştır ($*p<0,05$). H_2O_2 ile karşılaştırıldığında en düşük konsantrasyon olan 25 $\mu\text{g/mL}$ allokriptopinin MDA baskılanması üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı, buna karşın 120 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonun MDA’nın baskılanmasında en etkili konsantrasyon olduğu görülmektedir. 120 $\mu\text{g/mL}$ ’den daha yüksek bir konsantrasyon olan 150 $\mu\text{g/mL}$ allokriptopinin ise H_2O_2 göre MDA oluşumunu baskılayabildiği ancak bu değer 120 $\mu\text{g/mL}$ ’nin etkinliği kadar etkili olmadığı tespit edilmiştir. Diğer yandan tek başına allokriptopin uygulamaları ile 120 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonun kontrol ile karşılaştırıldığında MDA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim neden olmadığı, 150 $\mu\text{g/mL}$ allokriptopinin ise MDA düzeyinin yaklaşık %33 oranında artmasına neden olduğu belirlenmiştir. Bu durum hem allokriptopin ön muamelesi sonrası H_2O_2 ile oksidatif strese indüklenen fPC12 hücrelerinde hem tek başına allokriptopin ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde 150 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonun MDA düzeyinin artmasına neden olduğunu göstermektedir. Sonuçlar ile H_2O_2 ile arttırılan lipit peroksidasyon düzeyinin 50-120 $\mu\text{g/mL}$ allokriptopin ile konsantrasyona bağımlı bir şekilde korunduğunu ve en etkili konsantrasyonun 120 $\mu\text{g/mL}$ olduğu ortaya konulmuştur.



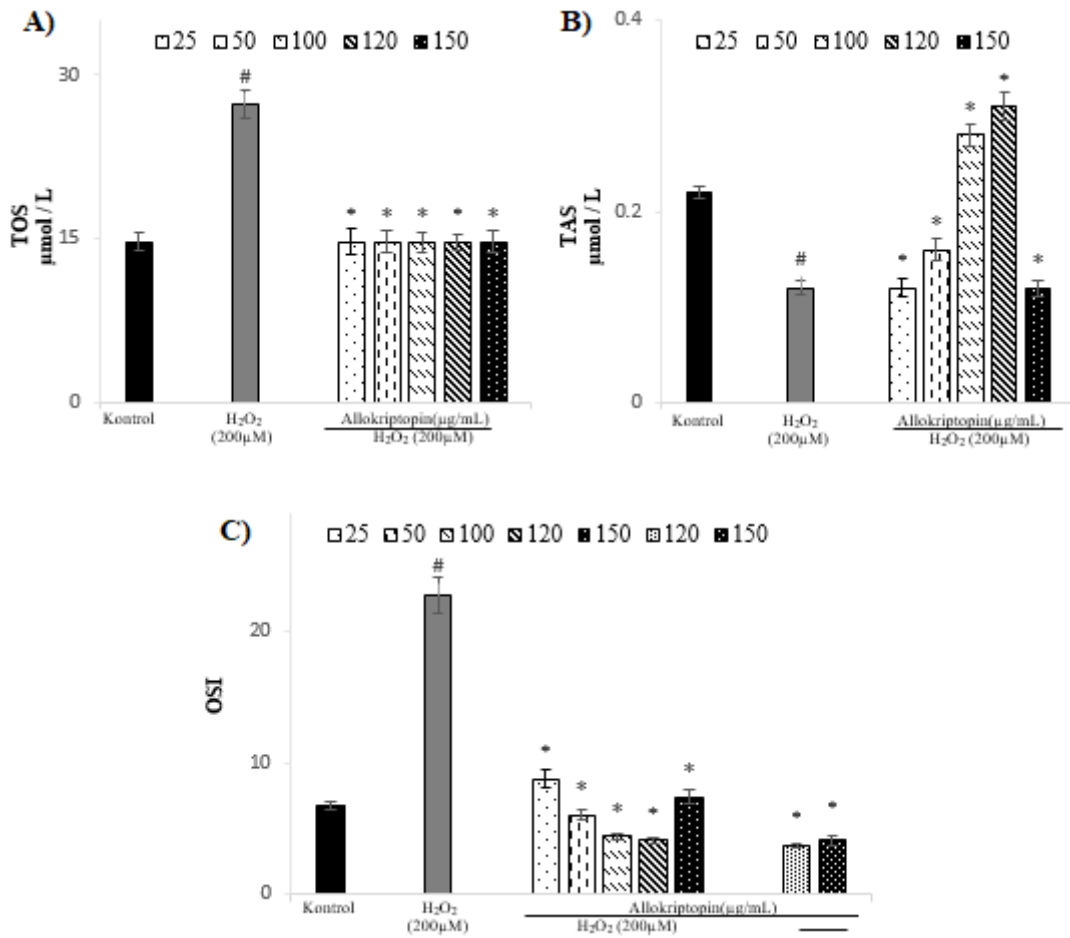
Şekil 4.1. Allokriptopinin lipid peroksidasyonu üzerine etkisi (#: Kontrole göre H₂O₂'nin etkisi, * H₂O₂'ye göre allokriptopinin etkisi p<0,05)

4.1.4. Allokriptopinin toplam oksidan ve antioksidan kapasite üzerindeki etkisi

Bu çalışma ile H₂O₂ tarafından oksidatif strese indüklenen fPC12 hücrelerinde allokriptopinin oksidatif strese karşı nörokoruyucu etkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaçla allokriptopin konsantrasyonlarının (25-150 µg/mL) H₂O₂ ile AH modeline indüklenen fPC12 hücrelerinin TOS'u ve TAS'ı üzerindeki etkileri belirlenmiştir ve elde edilen TOS ve TAS sonuçlarından allokriptopinin oksidatif stres üzerindeki etkinliği ortaya konulmuştur. Kontrol olarak ise, yalnızca besi ortamı ile inkübe edilen fPC12 hücreleri kullanılmıştır.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, H₂O₂ muamelesi TOS'u %85 oranında arttırmış, TAS ise %45 oranında azaltmıştır ([#]p<0,05). Bu durum, 200 µM H₂O₂ ile indüklenen fPC12 hücrelerinde oksidatif stresin başarı bir şekilde oluşturulduğunu göstermektedir. Diğer yandan, Şekil 4.2A ve 4.2B'de görüldüğü üzere konsantrasyona bağlı olarak allokriptopin uygulamaları TOS'u kontrol grubu seviyelerine kadar baskılamış, TAS'ı ise %35-160 oranlarında arttırmıştır (^{*}p<0,05). Özellikle, 100 ve 120 µg/mL allokriptopin konsantrasyonlarında TAS'ın kontrol grubundan da yüksek olduğu gözlemlenmiştir. En yüksek TAS değeri 0,31 µmol/L değeri ile 120 µg/mL allokriptopin ile muamele edilen hücrelerde tespit edilmiş olup, bu değer kontrol grubunun da üzerinde olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan 150 µg/mL allokriptopinin TAS seviyesi üzerindeki etkisinin

H₂O₂ ile aynı olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen TOS ve TAS sonuçlarından hesaplanan OSI de H₂O₂ tarafından hücre içerisindeki oksidatif stresin artırıldığını buna karşın allokriptopin ön muamelesi sonrası tüm konsantrasyonlar ile artan bu oksidatif stresin baskılandığını ve en etkili konsantrasyonun 120 µg/mL olduğu, buna karşı 150 µg/mL allokriptopin ön muamelesinin ise OSI değerini arttığı göstermektedir (Şekil 4.2C). Antioksidan kapasiteyi zayıflatığı ve oksidatif strese karşı daha az koruma gösterdiği tespit edilen 150 µg/mL konsantrasyondaki bu etki toksisitesinin yüksek olması ile ilişkilendirilebilir. Allokriptopin ön muamelesi sonrası H₂O₂ uygulanan hücrelerdeki ölüm oranının yüksek olması önerimizi destekler niteliktedir. Bu durum 25-120 µg/mL allokriptopinin H₂O₂ ile indüklenen fPC12 hücrelerinde oksidan ürünlerin azaltılması ve antioksidan sistemlerin aktive edilmesi yoluyla oksidatif strese karşı nörokoruyucu aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

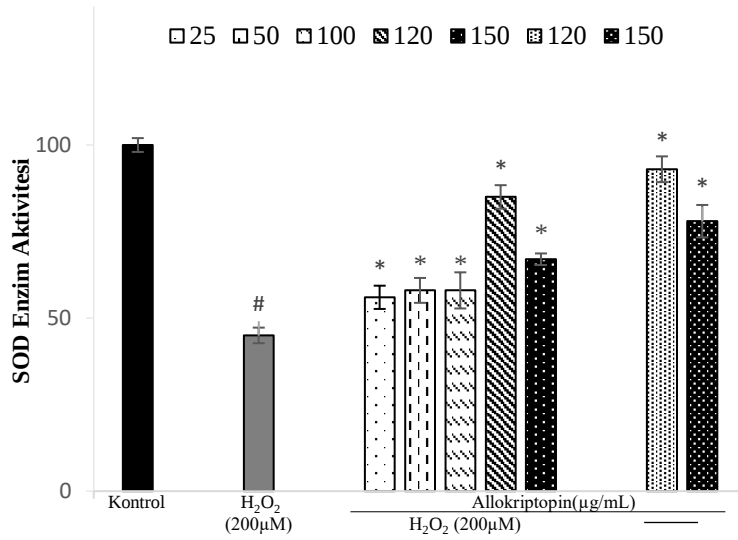


Şekil 4.2. Allokriptopinin TOS, TAS ve OSI üzerindeki etkisi. A) TOS, B) TAS ve C) OSI (#: Kontrole göre H₂O₂'nin etkisi, * H₂O₂'ye göre allokriptopinin etkisi $p<0,05$)

4.1.5. Allokriptopinin süperoksit dismutaz enzimi üzerindeki etkisi

Bu çalışma ile, allokriptopin konsantrasyonlarının (25-150 µg/mL) H₂O₂ ile AH modeline indüklenen fPC12 hücrelerindeki, süperoksit radikalının moleküler oksijen ve hidrojen peroksit'e dönüştüren, SOD enziminin aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, bu kapsamda 120 ve 150 µg/mL allokriptopinin tek başına fPC12 hücreleri üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Kontrol grubu olarak ise, yalnızca besi ortamı ile inkübe edilen fPC12 hücreleri kullanılmıştır.

Kontrol grubu ile kıyaslandığında, H₂O₂'nin fPC12 hücrelerindeki SOD enzim aktivitesini %55 oranında azalttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Antioksidan savunma sisteminin birincil hattındaki enzimlerden biri olan SOD'un inhibisyonu ile fPC12 hücreleri oksidatif strese karşı savunmasız hale gelmektedir. Buna karşın, SOD enzim aktivitesindeki bu düşüşün artan allokriptopin konsantrasyonları ile birlikte doza bağımlı olarak %11-40 oranlarında arttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.3). 25 µg/mL konsantrasyonun bu artışa anlamlı bir katkısı sağlamadığı gözlemlenmiştir. Öte yandan, 120 µg/mL allokriptopin konsantrasyonun SOD enzim aktivitesinin artırılmasında en etkili doz olduğu ortaya konulmuş olup, 150 µg/mL daha yüksek konsantrasyondaki bir uygulama olmasına rağmen SOD enzim aktivitesinde düşüş gözlemlenmiştir. Ayrıca, tek başına 120 µg/mL allokriptopin uygulanan fPC12 hücrelerinin SOD enzim aktivitesinde kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. Ancak, 150 µg/mL konsantrasyonun enzim aktivitesinde %22 oranında azalmaya neden olduğu fark edilmiştir. Hem allokriptopin ön muamelesi sonrası H₂O₂ ile oksidatif strese indüklenen fPC12 hücrelerinde hem tek başına allokriptopin ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde 150 µg/mL konsantrasyonun SOD enzim aktivitesinde düşüşe neden olduğu görülmektedir, bu durumun 150 µg/mL konsantrasyonun neden olduğu nöral hücre ölümü ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar ışığında H₂O₂ ile baskılanan SOD aktivitesinin 25-150 µg/mL allokriptopin konsantrasyonları ile doza bağlı bir şekilde arttırıldığı ve en yüksek koruyucu etki gösteren 120 µg/mL allokriptopin uygulamalarının SOD aktivitesi üzerinde dikkate değer olumsuz bir etkiye neden olmadığı ortaya konmuştur. Ayrıca, bu konsantrasyonların SOD enzim aktivitesi üzerindeki koruyucu etkilerinin TAS'daki artış ile ilişkili olabileceği tespit edilmiştir.



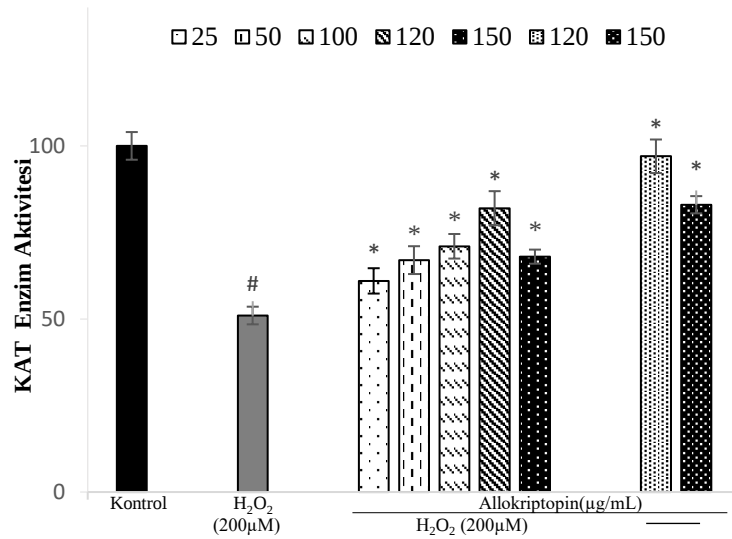
Şekil 4.3. Allokriptopinin SOD enzim aktivitesi üzerindeki etkisi. (#: Kontrole göre H₂O₂'nin etkisi, * H₂O₂'ye göre allokriptopinin etkisi p<0,05)

4.1.6. Allokriptopinin katalaz enzimi üzerindeki etkisi

Bu çalışmada, allokriptopin konsantrasyonlarının (25-150 µg/mL) H₂O₂ ile AH modeline indüklenen fPC12 hücrelerindeki, H₂O₂'yi su ve moleküler oksijene katabolize edebilen, KAT enziminin aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, bu kapsamda 120 ve 150 µg/mL allokriptopinin tek başına fPC12 hücreleri üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Kontrol olarak ise, yalnızca besi ortamı ile inkübe edilen fPC12 hücreleri kullanılmıştır.

Şekil 4.4'de de görüldüğü üzere, H₂O₂'nin fPC12 hücrelerindeki KAT enzim aktivitesini %49 oranında azalttığı tespit edilmiştir (#p<0,05). KAT'ın inhibisyonu, toksik H₂O₂'nin katabolizasyonun gerçekleşmemesine ve H₂O₂'den fenton yolağı aracılığı ile daha toksik olan OH⁻'nin üretilmesine neden olmaktadır. Buna karşın, tüm allokriptopin konsantrasyonlarının ön muamelesi ile KAT enzim aktivitesinin %10-31 oranlarında anlamlı bir şekilde arttırıldığı tespit edilmiştir (*p<0,05). 120 µg/mL H₂O₂ bağlı KAT inhibisyonuna karşı en iyi koruyucu etki gösteren allokriptopin konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. 150 µg/mL konsantrasyondaki KAT enzim aktivitesinin 120 µg/mL göre düşük olması SOD aktivitesinde de olduğu gibi TAS'daki azalışa aracılık ettiğini ve nöral hücre ölümü ile ilişkili olduğu düşündürmektedir.

Tek başına 120 ve 150 µg/mL allokriptopin uygulanan hücrelerde ise, enzim aktivitesi sırasıyla %97 ve %83 olarak belirlenmiştir. 120 µg/mL allokriptopinin kontrol ile karşılaştırıldığında enzim aktivitesinde anlamlı bir değişime neden olmadığı ve tek başına bu konsantrasyonun KAT enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon göstermediği görülmektedir. Diğer yandan, kontrol ile kıyaslandığında tek başına 150 µg/mL allokriptopin uygulaması KAT aktivitesinin %17 oranında azalmasına neden olmuştur. Bu durum 150 µg/mL allokriptopin ön muamelesi sonrası H₂O₂ ile indüklenen fPC12 hücrelerindeki TAS ve nöral ölüm ile ilişkili olabileceği düşüncesini destekler niteliktedir. Elde edilen sonuçlar ışığında H₂O₂ tarafından baskılanan KAT aktivitesinin 25-150 µg/mL allokriptopin konsantrasyonları ile doza bağlı bir şekilde arttırıldığı gözlemlenmiştir. En yüksek koruyucu etkiyi gösteren konsantrasyonun 120 µg/mL olduğu tespit edilmiş olup, bu konsantrasyonun enzim aktivitesi üzerinde dikkate değer olumsuz bir etkiye neden olmadığı da ortaya konulmuştur.



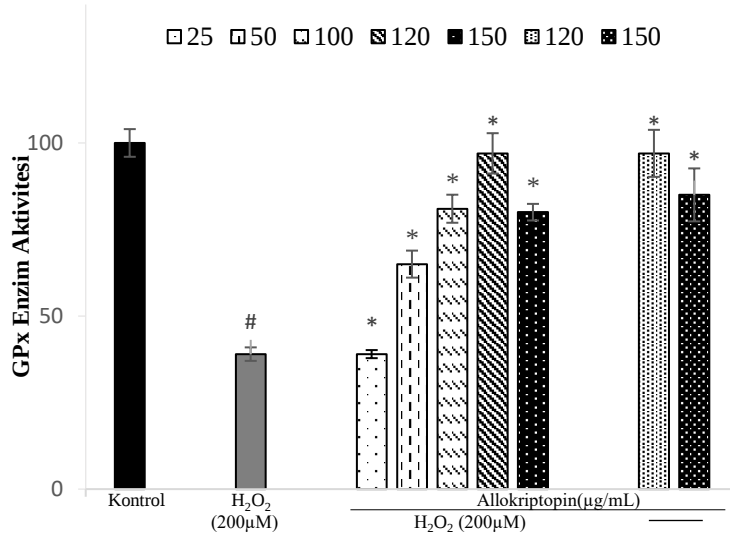
Şekil 4.4. Allokriptopinin KAT enzim aktivitesi üzerindeki etkisi (#: Kontrole göre H₂O₂'nin etkisi, * H₂O₂'ye göre allokriptopinin etkisi p<0,05)

4.1.7. Allokriptopinin glutatyon peroksidaz enzimi üzerindeki etkisi

Bu çalışma ile, allokriptopin konsantrasyonlarının (25-150 µg/mL) H₂O₂ ile AH modeline indüklenen fPC12 hücrelerindeki, hidrojen peroksidin su molekülü ve alkole indirgenmesinde rol alana bir diğer enzim olan, GPx aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, bu kapsamda en yüksek konsantrasyonlardan seçilen

120 ve 150 µg/mL allokriptopinin tek başına H₂O₂ uygulanmamış fPC12 hücreleri üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Kontrol olarak ise, yalnızca besi ortamı ile inkübe edilen fPC12 hücreleri kullanılmıştır.

Şekil 4.5’de görüldüğü üzere H₂O₂’nin kontrol grubuna göre fPC12 hücrelerindeki GPx enzim aktivitesini %62 oranında azalttığı belirlenmiştir ([#]*p*<0,05). KAT’ın yanı sıra GPx’in inhibisyonu da, biriken H₂O₂’nin fenton yolağı aracılığı ile OH⁻’e dönüştürülmesine ve hücrel hasara katkıda bulunmasına neden olmaktadır. Bu da nöral hücrelerde oksidatif hasar modelinin başarı ile oluşturulduğunu göstermektedir. Diğer bir yandan, azalan GPx enzim aktivitesinin allokriptopin ön muamelesi ile doza bağımlı olarak %27-57 oranlarında arttığı tespit edilmiştir (^{*}*p*<0,05). Allokriptopinin 25 µg/mL konsantrasyonu ile GPx aktivitesinde anlamlı bir artış saptanamamıştır. En yüksek enzim aktivitesi 120 µg/mL allokriptopin ön muamelesi sonrası H₂O₂ uygulanmış fPC12 hücrelerinde belirlenmiş olup, bu aktivitenin kontrol grubuna yakın olması, 120 µg/mL konsantrasyonun GPx enzimini H₂O₂’ye bağlı inhibisyonundan koruduğunu göstermiştir. Ayrıca, 150 µg/mL konsantrasyonda GPx enzim aktivitesinin 120 µg/mL’ye göre %16 daha az olduğu fark edilmiştir. Tek başına 120 ve 150 µg/mL allokriptopin uygulanan fPC12 hücrelerinde ise, enzim aktivitesinin sırasıyla %97 ve %85 olduğu tespit edilmiştir. 120 µg/mL allokriptopinin GPx enzim aktivitesi üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı ancak 150 µg/mL allokriptopinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GPx aktivitesini %15 oranında azalmasına neden olduğu gözlemlenmiştir. Hem allokriptopin ön muamelesinden sonra H₂O₂ ile oksidatif strese indüklenen hem de tek başına allokriptopin ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde 150 µg/mL konsantrasyonun enzim aktivitesinde düşüşe neden olduğu görülmektedir. Hücre canlılığı deneylerinde de görüldüğü üzere bu konsantrasyon fPC12 hücrelerinde hasar yaratmaktadır ve bu hasar ile antioksidan enzimler etkilemektedir. Elde edilen sonuçlar ışığında H₂O₂ tarafından baskılanan GPx aktivitesinin 25-150 µg/mL allokriptopin konsantrasyonları ile doza bağlı bir şekilde arttırıldığı ortaya konmuştur. Tüm bu uygulamalarda enzim aktivitesinin inhibisyonuna karşı en iyi korumanın 120 µg/mL ile sağlandığı ve bu konsantrasyonun enzim aktivitesi üzerinde dikkate değer olumsuz bir etkiye neden olmadığı da ortaya konulmuştur.

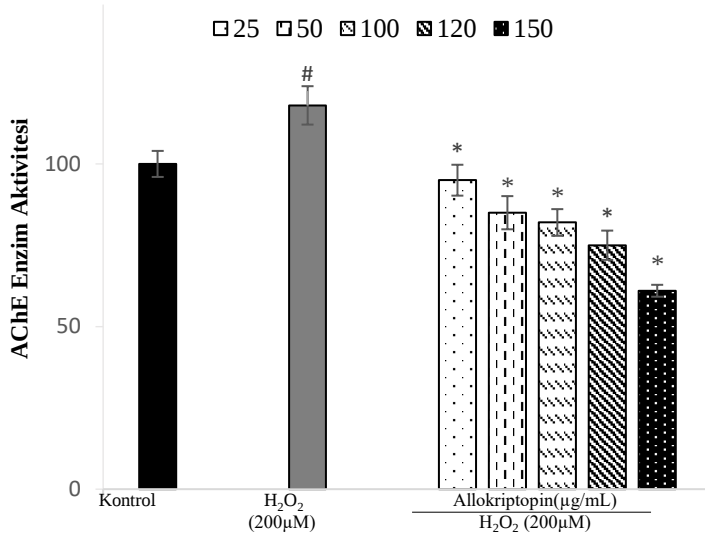


Şekil 4.5. Allokriptopinin GPx enzim aktivitesi üzerindeki etkisi (#: Kontrole göre H₂O₂'nin etkisi, *: H₂O₂'ye göre allokriptopinin etkisi p<0,05)

4.1.8. Allokriptopinin asetilkolin esterase enziminin aktivitesinin üzerindeki etkisinin Ellman yöntemi ile değerlendirilmesi

Bu çalışma ile, allokriptopin konsantrasyonlarının (25-150 µg/mL) H₂O₂ ile AH modeline indüklenen fPC12 hücrelerindeki artan AChE enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin *in-vitro* Ellman yöntemi kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Kontrol olarak yalnızca besi ortamı ile inkübe edilen fPC12 hücreleri kullanılmıştır.

Şekil 4.6'da görüldüğü üzere, H₂O₂ ile oluşturulan deney modelinde AChE enzim aktivitesinin %18 oranında arttığı tespit edilmiştir (#p<0,05). Diğer yandan artan AChE enzim aktivitesinin allokriptopinin ön muamelesi ile %23-57 oranında inhibe edildiği ve tüm allokriptopinin konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin kontrol grubunun altında olduğu belirlenmiştir. En yüksek inhibisyon 150 µg/mL allokriptopin uygulamasında belirlenmiş olup (#p<0,05), elde edilen sonuçlar ışığında, allokriptopinin güçlü bir AChE inhibitörü olma potansiyeline sahip olduğu ortaya konulmuştur.

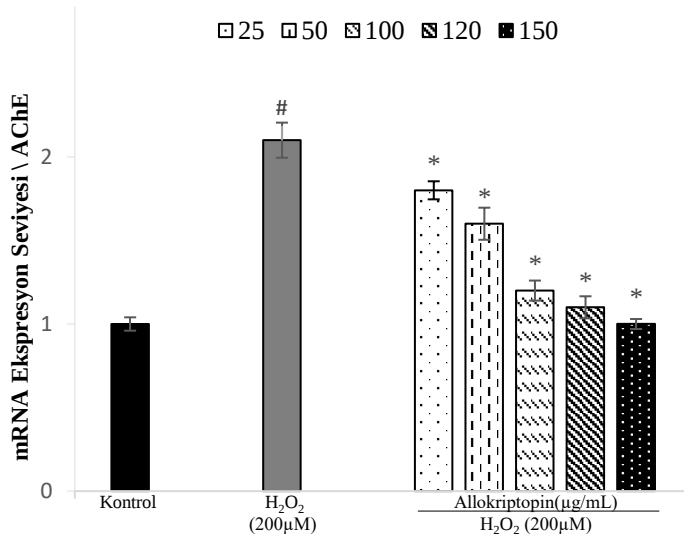


Şekil 4.6. Allokriptopinin H₂O₂ ile indüklenen AChE enzim aktivitesi üzerindeki etkisi (#: Kontrole göre H₂O₂'nin etkisi, *: H₂O₂'ye göre allokriptopinin etkisi p<0,05)

4.1.9. Allokriptopinin asetilkolin esteraz enziminin mRNA ifade düzeyi üzerindeki etkisi

Bu çalışmada, allokriptopin konsantrasyonlarının (25-150 µg/mL) H₂O₂ ile AH modeline indüklenen fPC12 hücrelerindeki AChE ekspresyon düzeyi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç ile AChE mRNA ekspresyon düzeyi qRT-PZR yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Kontrol olarak ise yalnızca besi ortamı ile inkübe edilen fPC12 hücreleri kullanılmıştır.

Şekil 6'da görüldüğü üzere kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, H₂O₂ fPC12 hücrelerindeki AChE mRNA düzeyini 2,1 kat arttırmıştır (#p<0,05). Buna karşın artan AChE mRNA ifade düzeyinin allokriptopin konsantrasyonları ile 1,8-1'e kadar inhibe edildiği gözlemlenmiştir (*p<0,05). En yüksek etki 150 µg/mL konsantrasyonunda tespit edilmiş olup, bu konsantrasyon AChE mRNA ifade düzeyinin neredeyse kontrol grubuna kadar baskılayaklaşık %50 oranında inhibe olmasını sağlamıştır (*p<0,05). En düşük etkiyi ise 25 µg/mL allokriptopin konsantrasyonu göstermiştir. mRNA ifade düzeyinin 1,8'e düştüğü bu konsantrasyon ile H₂O₂ ile artan gen ekspresyonu %14 oranında baskılanmıştır (*p<0,05) (Şekil 4.7). Elde edilen sonuçlar ışığında, tüm allokriptopin konsantrasyonlarının H₂O₂ ile arttırılan AChE'yi mRNA düzeyinde de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe ettiği ortaya konulmuştur.



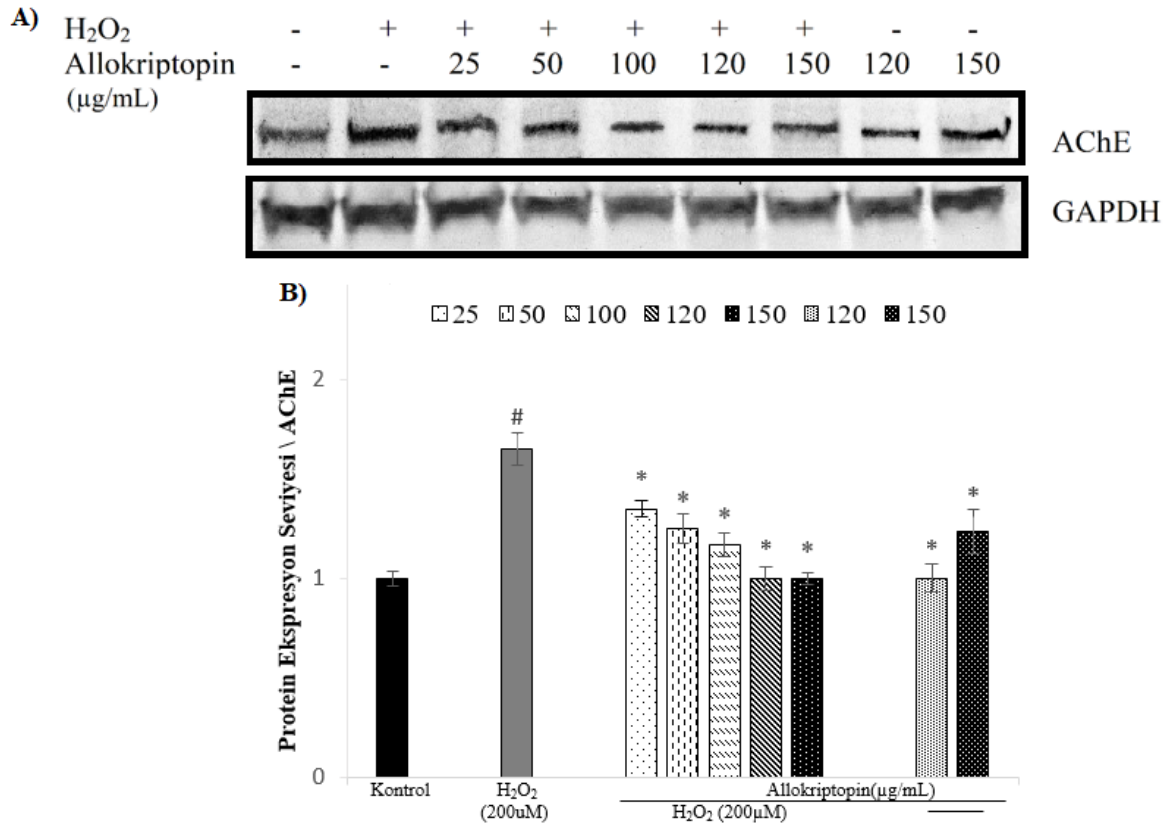
Şekil 4.7. Allokriptopinin H₂O₂ ile indüklenen AChE mRNA ifadesi üzerindeki etkisi (#: Kontrole göre H₂O₂'nin etkisi, *: H₂O₂'ye göre allokriptopinin etkisi $p<0,05$)

4.1.10. Allokriptopinin asetilkolin esteraz enziminin protein ifade düzeyi üzerindeki etkisi

Bu çalışmada, allokriptopin konsantrasyonlarının (25-150 µg/mL) ile AH modeline indüklenen fPC12 hücrelerindeki AChE enzimi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç ile AChE ekspresyon Western blot hibridizasyon tekniği kullanılarak protein düzeyinde ölçülmüştür. Kontrol olarak yalnızca besi ortamı ile inkübe edilen fPC12 hücreleri kullanılmıştır.

Şekil 4.8'de görüldüğü üzere, H₂O₂ ile muamele edilen hücrelerdeki AChE protein ekspresyonunun kontrol grubuna göre 1,6 kat arttığı tespit edilmiştir ($^{\#}p<0,05$). Diğer yandan artan AChE protein ekspresyonu allokriptopinin ön muamelesi ile anlamlı bir şekilde $1,4\pm0,01$ - $1\pm0,03$ 'e kadar inhibe edilmiştir ($*p<0,05$). En yüksek inhibisyon 120 ve 150 µg/mL allokriptopin uygulamalarında gözlemlenmiştir. Bu iki uygulamada da protein ifade düzeyi %37 oranında inhibe edilerek, kontrol grubuna kadar baskılanmıştır ($*p<0,05$).

Yalnızca allokriptopinin uygulanan hücrelerde ise, AChE protein ekspresyon düzeyinin sırasıyla $1\pm0,04$ ve $1,2\pm0,03$ olduğu tespit edilmiştir. 120 $\mu\text{g/mL}$ allokriptopinin kontrol grubuna göre protein ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişime neden olmadığı ancak bu oranın H_2O_2 'den %37 daha fazla olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Diğer yandan, kontrol ile kıyaslandığında 150 $\mu\text{g/mL}$ allokriptopinin protein ekspresyon düzeyini %20 oranında arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu oranın H_2O_2 'de saptanan ifade düzeyinden %25 daha az olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Elde edilen sonuçlar ışığında, tüm allokriptopinin konsantrasyonlarının H_2O_2 ile arttırılan AChE protein ifadesi düzeyini de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe ettiği ortaya konulmuştur.

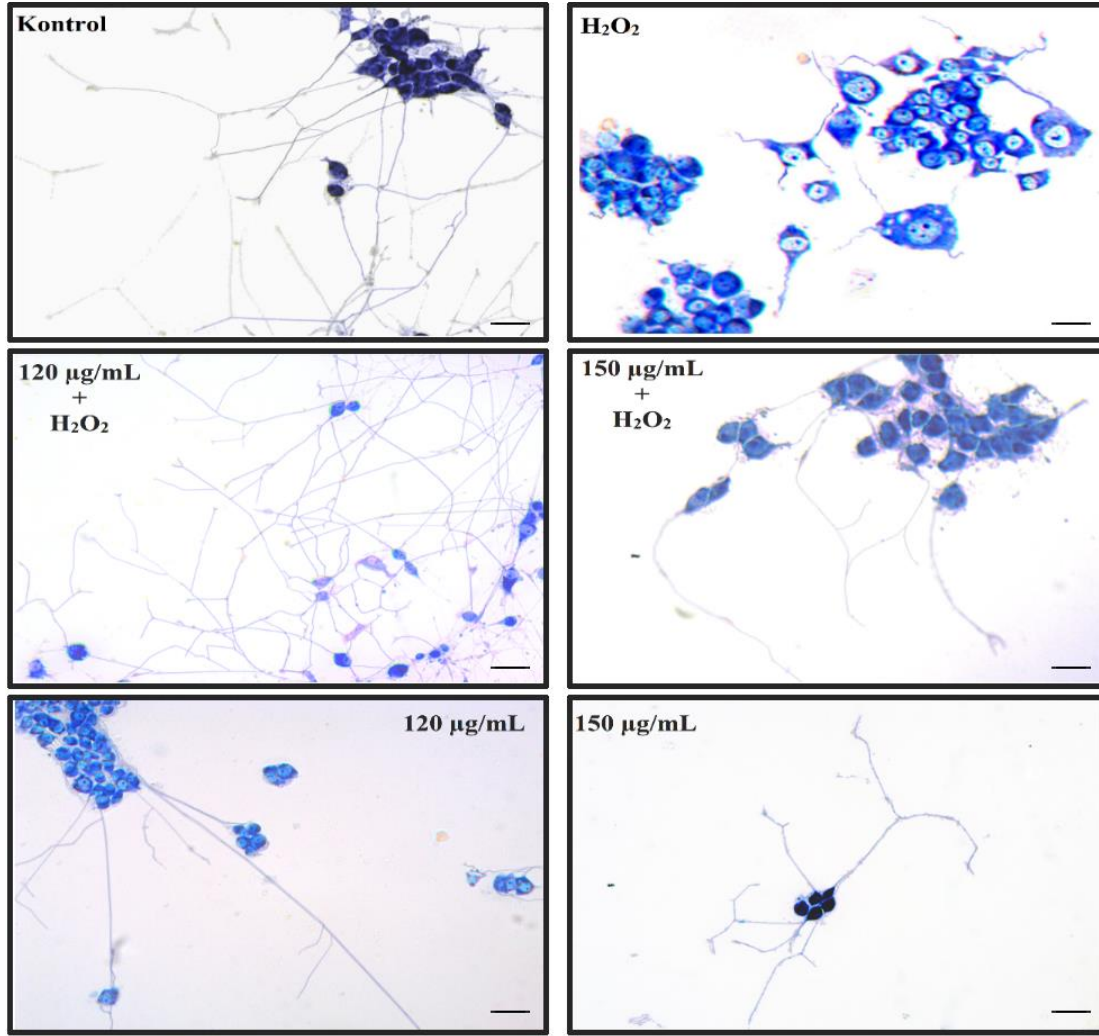


Şekil 4.8. Allokriptopinin H_2O_2 ile indüklenen AChE proteinin ifadesi üzerindeki etkisi. A) Western blot görüntüsü. B) Ekspresyon seviyesindeki değişimin grafiği (#: Kontrole göre H_2O_2 'nin etkisi, *: H_2O_2 'ye göre allokriptopinin etkisi $p<0,05$)

4.1.11. Allokriptopinin fPC12 hücrelerinin morfolojileri üzerindeki etkisi

Bu çalışma ile, allokriptopin konsantrasyonlarının (25-150 µg/mL) H₂O₂ ile AH modeline indüklenen fPC12 hücrelerinin morfolojisi üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, bu kapsamda 120 ve 150 µg/mL allokriptopinin AH'ye indüklenmemiş fPC12 hücreleri üzerindeki 18 saatlik etkisi de incelenmiştir. Uygulama yapılan hücreler fotoğraflanarak, hücre çapı, nörit boyu ve dallanma miktarı açısından analiz edilmişlerdir. Kontrol olarak ise yalnızca besi ortamı ile inkübe edilen fPC12 hücreleri kullanılmıştır.

Resim 4.1'de görülebileceği üzere, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 200 µM H₂O₂'e maruz kalan fPC12 hücrelerinde, hücre çapının %15 oranında arttığı, buna karşın nörit uzunluğu ve dallanma miktarının sırasıyla %40 ve %38 oranında azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Diğer yandan allokriptopin ön muamelesi ile artan hücre çapının neredeyse kontrol seviyelerine kadar baskılandığı, nörit uzunluğu ve dallanma miktarının ise kayda değer bir şekilde arttırıldığı gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Ölçümler sonucunda hücre çapının baskılanmasında en etkin uygulamanın %13'lük azalış oranı ile 150 µg/mL allokriptopin olduğu tespit edilmiştir. Nörit uzunluğu ve dallanma miktarında ise 120 µg/mL allokriptopin konsantrasyonunun sırasıyla %15 ve %29 oranları ile en iyi artışı indüklediği belirlenmiştir. Öte yandan, 25 µg/mL konsantrasyonunda nörit uzunluğu açısından anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (Çizelge 3). Yalnızca allokriptopin uygulanan fPC12 hücrelerinde ise, 120 µg/mL allokriptopinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında nöral morfolojide anlamlı bir değişimi tetiklemediği, fakat H₂O₂ ile karşılaştırıldığında hücre çapının %14 oranında az, nörit uzunluğu ve dallanma miktarını ise sırasıyla %30 ve %36 oranlarında fazla olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan, 150 µg/mL allokriptopinin ise kontrol ile karşılaştırıldığında nörit uzunluğunun %10 daha az olduğu buna karşın, H₂O₂ ile karşılaştırıldığında hücre çapını %22 oranında az, nörit uzunluğu ve dallanma miktarının ise sırasıyla %10 ve %27 daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar allokriptopinin hücre çapını azaltarak, nörit uzunluğu ve dallanma miktarını ise artırarak H₂O₂'nin olumsuz etkilerine karşı nöral morfolojiyi koruduğunu göstermektedir (Resim 4.1).



Resim 4.1. Allokriptopinin fPC12 hücrelerinin morfolojisi üzerindeki etkisi (10X büyütme), ölçek çubuğu 5µm'ı ifade etmektedir

Çizelge 4.3. Allokriptopinin fPC12 hücreleri üzerindeki etkisinin morfolojik analizi. Sonuçlar, ortalama $\pm$ S.S. olarak verilmiştir (#: Kontrole göre H₂O₂'nin etkisi, *: H₂O₂'ye göre allokriptopinin etkisi $p<0,05$)

Uygulama grupları		%Hücre çapı	%Nörit uzunluğu	%Dallanma miktarı
Kontrol^a		100 $\pm$ 3	100 $\pm$ 5	100 $\pm$ 2
H₂O₂^b		115 $\pm$ 3 [#]	60 $\pm$ 4 [#]	62 $\pm$ 5 [#]
Konsantrasyonlar (μg/mL)				
Allokriptopin + H₂O₂^c	25	116 $\pm$ 2*	60 $\pm$ 2	74 $\pm$ 4*
	50	111 $\pm$ 3*	64 $\pm$ 1*	81 $\pm$ 2*
	100	111 $\pm$ 2*	70 $\pm$ 3*	84 $\pm$ 1*
	120	104 $\pm$ 4*	75 $\pm$ 5*	93 $\pm$ 2*
	150	102 $\pm$ 4*	69 $\pm$ 2	80 $\pm$ 5*
Allokriptopin^d	120	101 $\pm$ 3*	90 $\pm$ 5*	98 $\pm$ 4*
	150	93 $\pm$ 5*	70 $\pm$ 4	89 $\pm$ 3*

^a Uygulama yapılmamış fPC12 hücreleri.

^b 24 saat boyunca 200 μ M H₂O₂ uygulanan fPC12 hücreleri

^c 18 saat boyunca allokriptopin, ardından da 24 saat boyunca 200 μ M H₂O₂ uygulanan fPC12 hücreleri

^d 18 saat boyunca allokriptopin uygulanan fPC12 hücreleri

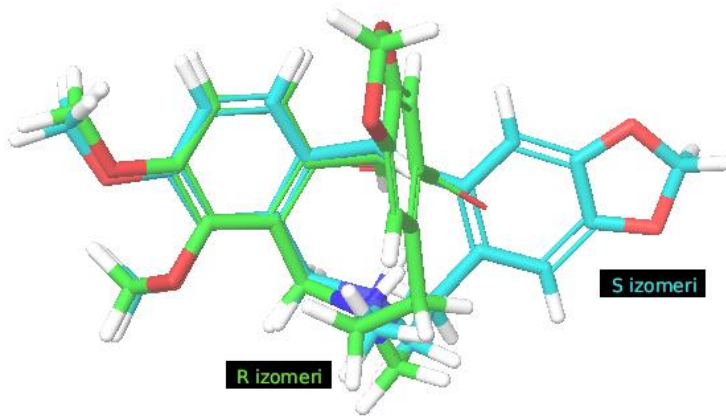
4.2. İn-siliko Çalışmalara ait Bulgular

4.2.1. Allokriptopinin farmakokinetik özelliklerinin ve ilaç olabilme potansiyeli

Bu çalışma ile allokriptopinin farmakokinetik özelliklerinin ve ilaç olabilme potansiyelinin Schrödinger yazılımındaki QikProp modülü kullanılarak ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaç ile ilk olarak allokriptopin ligand hazırlama işlemine tabii tutulmuştur. Ligand hazırlama işlemi stereokimyasal, tautomerizasyon ve protonizasyon durumları gibi liganda ait farklı yapısal ve kimyasal varyasyonları ortaya koyan bir basamaktır.

Ligand hazırlama işlemi sonucunda allokriptopinin azonane grubundaki birbirine bağlı aynı atomların uzaysal düzlemde kirallite (birbiri ile çakışmayan) ve çift izomeri gösterdiği tespit edilmiştir. Atom gruplarını atom numarasını baz alarak önceliklendirip, sıralayan mutlak (absolu) konfigürasyon sistemine göre S ve R olarak adlandırılan bu çift izomerik konfigürasyon durumu Şekil 4.9'da verilmiştir. Farklı 3B yapıları sahip olan bu izomerlerin farmakokinetik özelliklerinin ve ilaç olabilme potansiyelinin belirlenmesi için QPlogPo/w

(oktanol/su partisyen katsayısı katsayısı), QPPCaco (tahmini Caco-2 hücre geçirgenliği), #rtvFG (reaktif fonksiyonel grupların sayısı), QPlogHERG (HERG K⁺ kanal bloklayıcı toksik potansiyelin IC₅₀ değeri), QPlogBB (öngörülen beyin / kan partisyen katsayısı), QPPMDCK (tahmini MDCK hücre geçirgenliği) ve CNS (öngörülen merkezi sinir sistemi aktivitesi) değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca, iki izomerin % tahmini oral emilimi ve Lipinski'nin beş kuralına uyma durumu da değerlendirilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4'de verilmiştir.



Şekil 4.9. Allokriptopin izomerlerinin 3B yapısı. Karbon atomları mavi ile renklendirilen yapı S izomeri, yeşil ile renklendirilen yapı ise R izomeridir; oksijenler kırmızı ile, azotlar ise mor renk ile gösterilmiştir

Maddenin lipofilikliğini veya hidrofilikliğini ifade eden QPlogPo/w değeri, bileşiğin yağ veya sudaki çözünürlüğünün göstergesidir. Bu nedenle bu değer hem bileşik için çözücü olabilecek kimyasalların seçiminde, hem de vücuttaki ilaç metabolizasyonun ve yararlanımının bir göstergesi olan emilim, dağılım, metabolizma ve atılım (EDMA) özelliklerinin saptanmasında önemli bir parametredir. Bu kapsamda allokriptopine ait S ve R izomerlerinin QPlogPo/w değeri sırasıyla 2,385 ve 2,246 olarak tespit edilmiştir. Literatürce kabul gören -2 ile 6 değer aralığının referans alındığında, sonuçlar allokriptopinin iki izomerin de lipofilik bir yapıya sahip olduğunu, pasif difüzyon yoluyla bilayer lipid tabakaları ile kaplı membranlardan geçebileceğini ve hücrelerdeki hidrofobik bölgelerde toplanabileceğini göstermektedir. İlaç keşif çalışmaları kapsamında ele alındığında bu durum allokriptopinin gastrointestinal olarak emilebileceğini ve kan beyin bariyeri boyunca difüze edebileceğini bu sayede nöral sistemde ilaç olarak kullanılabileceğini işaret etmektedir.

İlaç adaylarının biyoyararlanımını ve aktivitesini etkileyen en önemli nokta toksisitedir. Bileşiklerdeki reaktif fonksiyonel gruplarının yapısal toksisite sorunlarına neden olduğu bilinmektedir. Bu nedenle allokriptopinin izomerlerinin yapısındaki reaktif fonksiyonel grupların sayısı (#rtvFG) hesaplanmıştır. İki izomerin de bir reaktif fonksiyonel gruba sahip olduğu ve bunun izokinolin halkasındaki keton yapısı olduğu tespit edilmiştir. Bileşikteki #rtvFG sayısının 1'den fazla olmaması önerilmekte olup, allokriptopine ait iki izomer için de #rtvFG değeri kabul edilen aralıktaki sınır içerisinde dir.

Toksisiteye neden olan bir diğer şey de ilaç adayları tarafından hem kalbin atışını ve elektriksel aktivitesini hem de nöral sistemdeki hücresel işlevleri koordine eden HERG K⁺ iyon kanallarının bloke edilmesidir. Bloke edilen HERG K⁺ kanalları kardiyak ve nöral toksisiteye bağlı ölümler ile ilişkilendirilmektedir. Bu sebepten, allokriptopinin her iki izomerinin de QPlogHERG değeri hesaplanmış olup, bu değerlerin S ve R izomerleri için sırasıyla -4,751 ve -4,402 olarak tahmin edilmiştir. Kullanılan Qikprop modülünde QPlogHERG değerinin -5'in altında olması endişe verici olarak nitelendirilmekte olup, önerilmemektedir. Bu kapsamda allokriptopinin iki izomeri için de saptanan değerlerin kabul edilen sınır içerisinde olduğunu ve iki izomerin de HERG K⁺ iyon kanallarını bloke etmede sorun oluşturmayaçağını göstermektedir. #rtvFG ve QPlogHERG değerleri birlikte ele alındığında izomerlerin olası ciddi bir toksisiteye neden olmayacağı ön görülmektedir.

Diğer yandan, gastrointestinal sistem emilimi, bir ilaç adayının biyoyararlanımı için oldukça önemlidir. Kolorektal adenokarsinom (Caco-2) hücreleri, enterositlerle olan morfolojik ve fonksiyonel benzerliği nedeniyle ilaç emiliminin çalışmalarında kullanılmakta olan bir modeldir. Bu model ile etken maddenin bağırsak-kan bariyer geçirgenliği tahmin edilmektedir. QPPCaco değeri ise değeri ilaç adaylarının Caco-2 hücrelerindeki geçirgenliğini ifade etmektedir ve bu değerin 500'ün üzerinde olması bileşiğin iyi bir emilim profiline sahip olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada iki izomerin de QPPCaco değerleri hesaplanmıştır. S ve R izomerlerinin QPPCaco değerlerinin sırasıyla 1235,090 nm/sn ve 1203,961 nm/sn olduğu tespit edilmiştir. Bu durum iki izomerinde iyi düzeyde emilim profiline sahip olduğunu ve bağırsak-kan bariyerini geçebileceğini göstermiştir.

Nörodejeneratif hastalıklara yönelik ilaç geliştirme çalışmalarında bileşiğin kan beyin bariyerini aşarak nöral sisteme erişimi farmakodinamik ve terapötik etkisi açısından önemlidir. Bu kapsamda, allokriptopine ait izomerlerin beyin/kan partiyon kat sayısını ifade

eden QPlogBB, Madin-Darby köpek böbrek hücrelerinin geçirgenliğini öngören QPPMDCK ve merkezi sinir sistemindeki aktiviteyi tahmin eden CNS değerleri hesaplanmıştır. Allokriptopinin S izomeri için bu değerler sırası 0,574, 687,615 ve +2 olarak, R izomeri için ise 0,571, 668,901 ve +2, olarak belirlenmiştir. Çizelge 4’de de görüldüğü üzere sonuçlar 3 parametre için de kabul edilen aralıklarda olduğu tespit edilmiştir.

Bu durum allokriptopinin her iki izomer formunun da kan-beyin bariyerini geçerek, merkezi sinir sistemine ulaşabileceğini ve nöral sisteme yönelik ilaç adayı olabilme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

Kaynak araştırmasında da belirtildiği gibi Lipinski’nin beş kuralını karşılayan bileşiklerin ilaç olabilme potansiyelinin yüksek olması nedeniyle allokriptopinin de bu açıdan analiz edilmiştir. Analiz sonucunda allokriptopinin iki izomerinin de Lipinski’nin kuralındaki hiçbir parametreyi ihlal etmediği tespit edilmiştir. Bu durum iki izomerin de oral kullanıma uygun, yüksek biyoyararlanımlı iyi bir ilaç adayı olabileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.4. Allokriptopinin farmakokinetik özellikleri ve ilaç olabilme potansiyeli

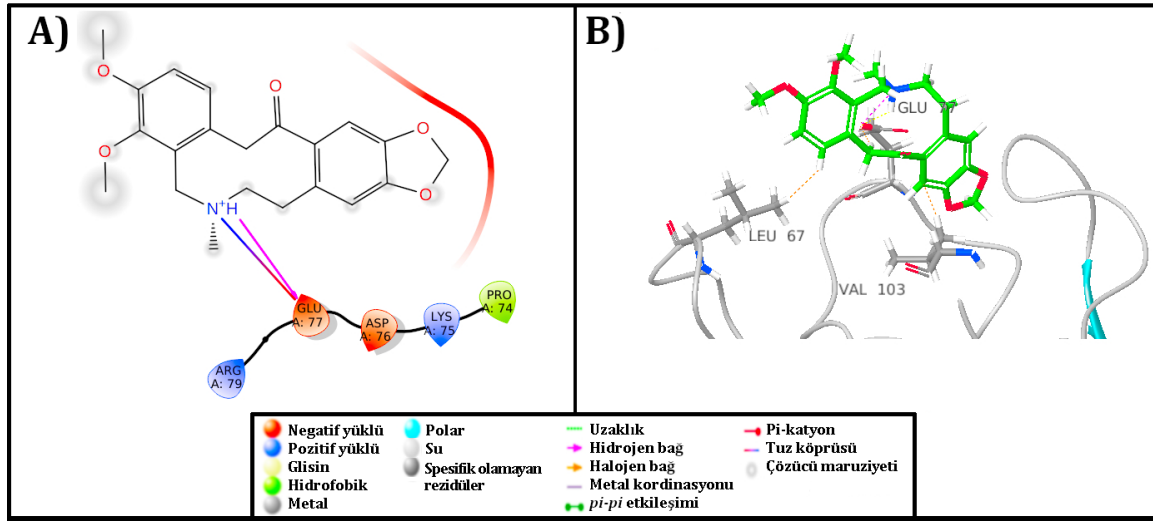
Allokriptopinin İzomerleri			
	Referans Değerler	S İzomeri	R İzomeri
Öngörülen oktanol / su partisyon katsayısı (QPlogPo/w)	-2 -6,5	2,385	2,246
Reaktif fonksiyonel grupların sayısı (#rtvFG)	0 veya 1	1	1
Tahmini HERG K + kanalını bloke eden IC ₅₀ değeri (QPlogHERG)	>-5	-4,751	-4,402
Tahmini Caco-2 hücre geçirgenliği (nm/s) (QPPCaco)	>500	1235,090	1203,961
Öngörülen beyin / kan partisyon katsayısı (QPlogBB)	-3- 1,2	0,574	0,571
Tahmini MDCK hücre geçirgenliği (nm/s) (QPPMDCK)	>500	687,615	668,901
Öngörülen merkezi sinir sistemi aktivitesi (CNS)	-2;inaktif, +2; aktif	2	2
Öngörülen %insan oral emilimi	>%80	96,248	95,231
Lipinski'nin beş kuralı ihlallerinin sayısı	<4	0	0

4.2.2. Allokriptopinin süperoksit dismutaz enzimi ile etkileşiminin modellenmesi

Kenetlenme çalışmaları

Moleküler kenetlenme çalışmaları, ilaç keşfinde yaygın olarak kullanılan, *in-siliko* bir yöntemdir. İlaç adayı etken madde ile hedef protein arasındaki bağlanma mekanizmalarının atomik düzeyde anlaşılabilmesini sağlamaktadır. İlaç adayları ile terapötik açıdan değerli proteinlerin inhibisyonundan/aktivasyonundan sorumlu bölgeleri arasındaki etkileşiminin moleküler kenetlenme araçları kullanılarak tahmin edilmesi farmakolojik olarak ilgi çekici ve daha etkin yeni bileşiklerin tanımlanmasında büyük öneme sahiptir.

Bu nedenle bu çalışmada, moleküler kenetlenme yöntemleri kullanılarak allokriptopinin SOD enziminin inhibisyonu yoluyla oluşabilecek olası pro-oksidan aktivitesinin moleküler temellerinin ortaya konulması hedeflenmiştir. Bu amaçla allokriptopin izomerlerinin, SOD enziminin kristal yapısı üzerindeki literatürce belirlenmiş inhibitör bağlanma alanı ile etkileşimi ve bu etkileşime aracılık eden bağ türleri hesaplanmıştır. Moleküler kenetlenme çalışmaları sonucunda allokriptopine ait R izomeri ile SOD enzimi üzerindeki inhibitör bağlanma alanı arasında herhangi bir kenetlenme pozu ve puanı tespit edilememiştir. Buna karşın S izomerinin -2,07 kcal/mol kenetlenme puanı ile SOD enziminin inhibitör bağlanma alanı ile etkileşime girdiği gözlemlenmiştir. S izomerinin bağlanma alanı ile etkileşimi temelde tersiyer amin grubunun azotu ile GLU77 arasında kurulmuş olan hidrojen bağı ve tuz köprüsüne dayanmaktadır (Şekil 4.10). Hem tersiyer amin grubunun iki izomer arasındaki tek fark olması hem de S izomerindeki kenetlenme durumunun amin grubu aracılığı ile gerçekleşmesi, bu gruptaki stereoizomerik fark dolayısıyla oluşan 3B yapısal çeşitliliğin SOD enzimi üzerindeki inhibisyon bağlanma alanı ile etkileşimde önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir. Kenetlenme sonuçları ile R izomerinin, tersiyer amin grubundaki yapısal farklılığı sayesinde antioksidan savunma sisteminin ana enzimlerinden biri olan SOD'u inhibe edemeyeceği belirlenmiştir. Bu sebepten R izomerinin ilaç etken maddesi olarak kullanılmasının daha faydalı olabileceği düşünülmektedir. Buna karşın S izomeri ve inhibitör bağlanma alanı arasındaki tespit edilen zayıf etkileşim ile allokriptopin aracılı SOD inhibisyonun olası moleküler temelleri ortaya konulmuştur.



Şekil 4.10. Allokriptopinin SOD enzim inhibitörü bağlanma alanı ile etkileşim haritası. A) R izomeri ile inhibitör bağlanma alanının etkileşim haritası B) R izomeri ile olan etkileşimin kristal yapısı üzerinde gösterimi

Moleküler dinamik simülasyon çalışmaları

Moleküler kenetlenme çalışmaları proteinlerin anlık görüntüsü ile ligandların etkileşimini ortaya koymaktadır. Ancak proteinler biyolojik sistemlerin bir parçasıdır ve dinamik bir yapıya sahiptir. İlaç adayları ile etkileşimleri de dinamik bir süreçtir ve proteinlerin anlık görüntüsü ile gerçekleştirilen hesaplamalar moleküler etkileşimlerin değerlendirilmesinde yetersiz kalmaktadır. MD simülasyon hesaplamaları ise atomik ve moleküller etkileşimdeki değişimleri simülasyon süresi boyunca anlık hesaplayarak, protein-ligand kompleksindeki moleküler etkileşimlerin incelenmesine olanak sağlamaktadır. Bu nedenle özellikle ilaç adaylarının proteinler ile etkileşimindeki kararlılığının ve sürekliliğinin MD simülasyon yöntemleri ile araştırılması ilaç keşif çalışmalarında önemlidir.

Bu çalışma ile de allokriptopine ait S izomerinin kenetlenme çalışması ile belirlenen SOD enzimi üzerindeki olası inhibitör etkisinin sürekliliğinin ve stabilitesinin test edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç ile kenetlenme çalışması sonu elde edilen ve Şekil 4.10'da da verilen kenetlenme pozunu MD simülasyonları için başlangıç pozunu olarak belirlenmiştir ve Schrödinger programının Desmond modülü kullanılarak hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. Allokriptopine ait R izomeri ile SOD enziminin inhibitör bağlanma alanı arasındaki etkileşimin MD simülasyonu incelendiğinde S izomerinin 1,1. nanosaniye (ns)'de yapıdan ayrıldığı tespit edilmiştir. Bu sebepten 5 ns'lik simülasyon etkileşiminin moleküler

temellerinin ve stabilitesinin anlaşılabilmesi için yeterli olmuştur. Hesaplamalar sonucu elde edilen MD simülasyondan, etkileşimin stabilitesi ve moleküler temelleri hakkında bilgi veren RMSD (kök-ortalama-kare sapma), RMSF (kök-ortalama-kare dalgalanması) ve moleküler etkileşim değerleri analiz edilmiştir.

a) Allokriptopin-SOD kompleksinin RMSD ve RMSF analizi

Proteinler ilaç adayları ile etkileşime girdiğinde stabiliteyi bozulabilmekte ve konformasyonel değişimlere uğrayabilmektedir. Ancak bu özellikle ilaç keşif ve geliştirme çalışmalarında proteinlerin işlevsizleşmesine neden olabileceği için istenmeyen bir durumdur. Bu sebepten bilgisayar destekli moleküler modelleme araçları ile ilaç adaylarının neden olduğu protein stabilitesi ve proteinin konformasyonel yapısındaki değişimlerin derecesini tahmin eden RMSD değerinin analiz edilmektedir.

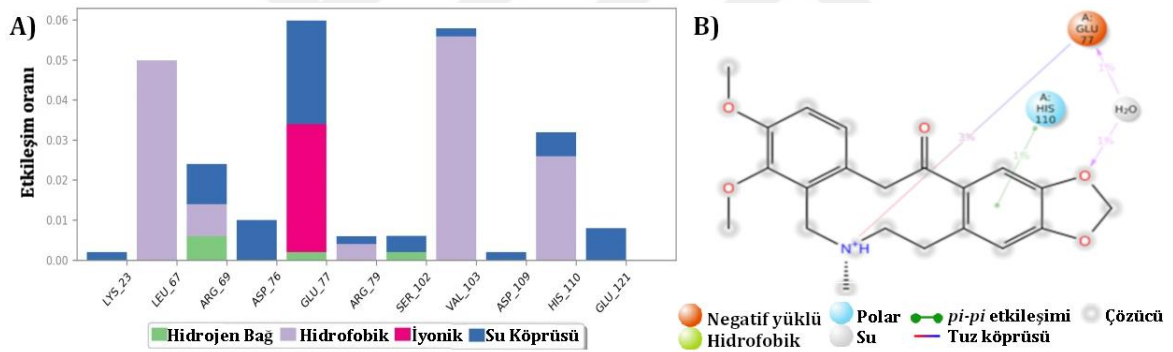
Bu çalışma ile R izomeri ile etkileşime giren SOD enzimindeki yapısal değişim, MD simülasyon sonrası enzimin C α atomlarına ait RMSD değerleri analizi ile tespit edilmiştir. 5 ns'lik simülasyon süresi boyunca R izomeri ile kompleks oluşturan SOD enziminin ortalama RMSD değeri 0,89 Å olarak hesaplanmıştır (EK-1, Şekil 1.1). Simülasyon süresi boyunca saptanan en yüksek RMSD değerleri ise 1,65 Å'dur. Stabil bir protein aktivitesi için RMSD'nin 3 Å'un altında olması önerilmektedir. Bu durum göz önüne alındığında, SOD enzim yapısının hem ilk 1,1ns boyunca allokriptopin ile etkileşim halindeyken hem de allokriptopin sistemden ayrıldığında kararlı olduğu görülmektedir. Bu durum allokriptopine ait S izomerinin SOD enziminin yapı veya stabilitesinde işlevsizliğe neden olabilecek bir değişikliğe neden olmadığını göstermektedir. Diğer yandan simülasyon süresi boyunca proteindeki konformasyonel değişime başka bir deyiş ile RMSD'ye katkıda bulunan her bir rezidüdeki konformasyonel değişimin incelenmesi, hem etkileşim dinamiğinin hem de bunun proteindeki her bir rezidü üzerindeki etkisinin anlaşılabilmesi açısından önemlidir. Bu değişimler RMSF değeri ile ifade edilmektedir. Bu nedenle S izomeri ile etkileşime giren SOD enzimine ait rezidülerdeki konformasyonel değişimin saptanması amacıyla enzimin ağır atomlarına ait RMSF değerleri analiz edilmiştir. Analiz sonucunda en çok dalgalanma, enzimin N- ve C- terminal bölgelerindeki MET ve GLN rezidülerinde gözlemlenmiştir ve bu dalgalanmaların RMSF değerleri sırasıyla 5,72 ve 3,05 Å olarak hesaplanmıştır. Bunun dışında yapıdaki diğer dalgalanmalar 9 - 14, 21 - 28, 48 - 84 ve 120 - 140 numaralı rezidülerde tespit edilmiştir. Bu rezidüler kristaldeki döngü bölgelerine karşılık gelmektedir.

(döngü bölgeleri EK-1'deki Şekil 1.2'de beyaz zemin ile gösterilmiştir). Terminal uçları ve döngü bölgeleri proteinlerin esnek ve hareketliliğe daha yatkın olan bölgeleridir. Bu sebepten simülasyon süresi boyunca bu bölgelerde daha yüksek dalgalanma oranlarının tespit edilmesi normaldir. Diğer yandan, SOD enzimi üzerindeki 11 rezidünün (23, 66, 69, 77–79, 102–104, 108–110 ve 121 numaralı) alloktopinin R izomeri ile etkileşime girdiği tespit edilmiştir (yeşil çubuklar ile gösterilmiştir). SOD'un inhibitör bağlanma alanındaki bu 11 rezidüye ait RMSF değerleri 2 Å'un altındadır. Bu durum etkileşim süresi boyunca (1,1 ns) R izomeri ile inhibitör bağlanma alanı arasında kurulan bağların stabil olduğunu ve bu süre boyunca R izomerinin SOD enzimi üzerinde inhibitör aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir.

b) Alloktopin-SOD kompleksindeki moleküler etkileşimlerin analizi

Bu bölümde alloktopine ait S izomeri ile SOD enziminin simülasyon süresi boyunca süren etkileşimi ve bu etkileşime aracılık eden rezidüler analiz edilmiştir. Simülasyonun her adımındaki toplam etkileşim miktarındaki değişimin gösterildiği diagramda da görüldüğü üzere (EK-1, Şekil 1.3-A), sonuçlar alloktopinin S izomeri ile SOD enziminin inhibitör bağlanma alanı arasındaki etkileşiminin 1,1. ns'ye kadar sürdüğünü göstermektedir. Sonrasında ise etkileşim miktarının sıfıra indiği görülmektedir. Diğer yandan, 1,1. ns boyunca süren etkileşime inhibitör bağlanma alanındaki LEU67, ARG69, ASP76, GLU77, ARG79, SER102, VAL103, ASP109 ve HIS110 rezidülerinin eşlik ettiği tespit edilmiştir (EK-1, Şekil 1.3-B). Zamana bağlı değişen etkileşim grafiği incelendiğinde 1,1 ns'lik etkileşimde en çok katkırı GLU77 ve VAL103 rezidülerinin sağladığı gözlemlenmiştir. Sonuçlar alloktopinin S izomeri ile SOD enziminin inhibitör bağlanma alanı arasında, özellikle de GLU77 ve VAL103 rezidüleri ile, bir etkileşimin söz konusu olduğunu ancak bu etkileşimlerin süreklilik göstermediğini ortaya koymaktadır. Diğer yandan inhibisyona aracılık eden etkileşimler ve bu etkileşimlerin simülasyon süresindeki oranları belirlenmiştir. Sonuçlar zamana bağlı değişen etkileşim grafiği ile uyumlu olarak simülasyon süresi boyunca etkileşim oranı en yüksek olan rezidünün LEU67, GLU77 ve VAL103 olduğunu göstermektedir (Şekil 4.11A). GLU77'nin bu etkileşimine hidrojen bağı, tuz ve su köprüsü aracılık etmektedir. 5 ns'lik simülasyonun yalnızca %3'ünde kurulan GLU77 ile S izomeri arasında tuz köprüsünün, kenetlenme çalışmasında olduğu gibi alloktopine ait amin grubunun azot atomu ile oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 4.11B). Diğer yandan su köprüsünün ise R izomerinin siklik asetal grubunun oksijen atomu ile kurduğu ve

simülasyon süresinin yalnızca %1'i boyunca sürdürülebildiği belirlenmiştir. Ayrıca, HIS110'nun da metoksi grubuna komşu fenol halkası ile simülasyon süresinin %1'inde *pi-pi* etkileşimi sergilediği gözlemlenmiştir. Öte yandan, GLU77'nin kurduğu hidrojen bağı simülasyon süresinin %1'inden daha da kısa bir zaman diliminde gerçekleşmektedir. LEU67 ve VAL103 rezidüleri ise neredeyse tamamen hidrofobik etkileşimlerde yer almaktadır. Bu sebepten bunlar %1'den kuvvetli etkileşimlerin bağlanma stabilitesinin verildiği haritada gösterilmemiştir. Tüm bu sonuçlar allokriptopine ait S izomerinin SOD enzimi üzerindeki inhibitör etkisinin sürekli ve kararlı bir şekilde sürmesinin olası olmadığını, ancak zayıf etkileşimler vasıtasıyla kısa süreli etkileşimler kurabileceğini ve bu etkileşimlere de LEU67, GLU77 ve VAL103 rezidülerinin aracılık edebileceğini göstermektedir. İlaç geliştirme çalışmaları kapsamında ele alındığında bu durum allokriptopinin R izomeri gibi S izomerinin de SOD enzimi üzerindeki inhibitör aktivitesinin enzimdeki konformasyonel değişim veya bağlanma alanı ile etkileşime dayanmadığını göstermektedir.



Şekil 4.11. S izomeri ile SOD enzimi arasındaki etkileşimler. A) Simülasyon boyunca rezidüler ile kurulan etkileşimlerin oranı B) %1'den kuvvetli etkileşimlerin bağlanma stabilitesinin 2B etkileşim grafiği üzerinde gösterimi

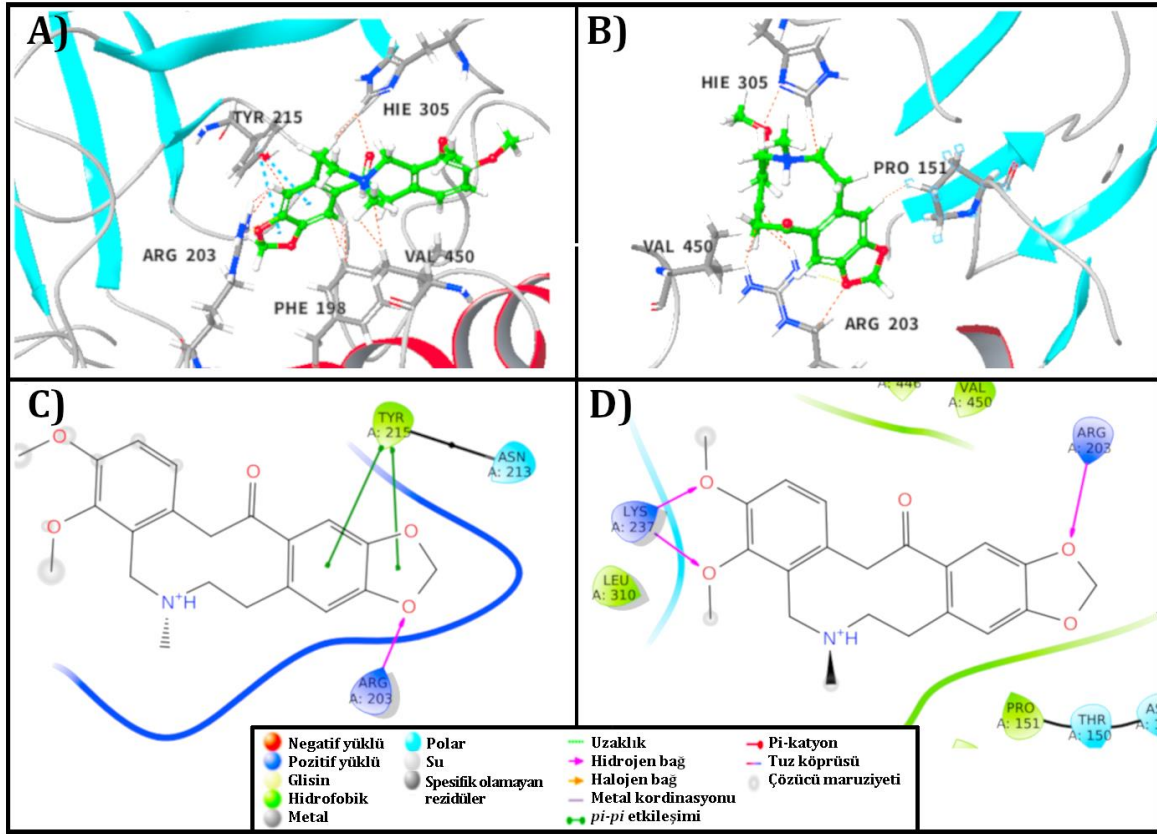
4.2.3. Allokriptopinin katalaz enzimi ile etkileşiminin modellenmesi

Kenetlenme çalışmaları

Bu çalışmada, allokriptopinin olası KAT enzim inhibitör aktivitesinin moleküler etkileşimsel temellerinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaçla allokriptopin izomerlerinin, KAT enziminin kristal yapısı üzerindeki literatürde belirlenmiş inhibitörü bağlanma alanı ile etkileşimi moleküler kenetlenme hesaplamaları kullanılarak araştırılmıştır.

Sonuçlar allokriptopinin her iki izomerlerinin de KAT enziminin inhibitör bağlanma alanı ile etkileşime girdiği göstermektedir. Bu etkileşimlerin kenetlenme puanı ise S ve R izomerleri için sırasıyla -2,83 kcal/mol ve -0,43 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Her iki izomerde de etkileşime hidrofobik etkileşimlerin ve hidrojen bağlarının aracılık ettiği gözlemlenmiştir. S izomerinde tespit edilen hidrofobik etkileşimlerin TYR215 ile allokriptopinin siklik asetal grubu ve ona komşu fenol halkası ile kurulduğu, hidrojen bağlarının ise siklik asetal grubundaki oksijen atomu ile ARG203 arasında olduğu gözlemlenmiştir. Diğer yandan R izomerinin inhibitör bağlanma alanı ile etkileşiminde yalnızca hidrojen bağlarının rol oynadığı ve bu hidrojen bağlarının da siklik asetal ve metoksi gruplarının oksijen atomu ile ARG203 ve LYS237 rezidüleri arasında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.12).

Sonuçlar allokriptopinin iki izomerinin de yüksek bir kenetlenme puanı ile olmasa da KAT enziminin inhibitör bağlanma alanı ile etkileşimi aracılığı ile enzim üzerinde inhibitör aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir. Kenetlenme çalışmaları ile öngörülen bu etkileşimlerin stabilitesinin ve sürekliliğinin MD simülasyon çalışmaları ile araştırılması gerekmektedir.



Şekil 4.12. Allokriptopinin KAT enzim inhibitörünün bağlanma alanı ile etkileşiminin haritası. A) S izomeri ile olan etkileşimin kristal yapısı üzerinde gösterimi, B) R izomeri ile olan etkileşimin kristal yapısı üzerinde gösterimi, C) S izomeri ile inhibitör bağlanma alanının etkileşim haritası, D) R izomeri ile inhibitör bağlanma alanının etkileşim haritası, A ve B'deki turuncu kesit çizgiler zayıf bağları temsil etmektedir

Moleküler dinamik çalışmaları

Bu çalışma ile, allokriptopinin izomerleri ile KAT enziminin inhibitör bağlanma alanı arasındaki kenetlenme durumunun sürekliliğinin ve stabilitesinin test edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç ile kenetlenme çalışmaları sonucu elde edilen ve Şekil 4.12'de de verilen allokriptopin-KAT kompleksinin kenetlenme pozu MD simülasyonları için başlangıç pozu olarak belirlenmiştir ve Schrödinger programının Desmond modülü kullanılarak hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. S izomeri-KAT kompleksi için 100 ns'lik simülasyon hesabı gerçekleştirilmiştir. Buna karşın R izomerinin 45. ns'de kompleksten ayrıldığı tespit edilmiştir ve 50 ns'lik simülasyona hesabı yeterli olmuştur. Simülasyonun RMSD, RMSF ve moleküler etkileşim değerleri analiz edilmiştir.

a) Allokriptopin-KAT kompleksine ait RMSD ve RMSF değerlerinin analizi

KAT enzimidaki konformasyonel değişimlerin derecesinin belirlenmesi amacıyla hem S izomerli hem de R izomerli kompleks için enzimin C α atomlarına ait RMSD değerleri analiz edilmiştir.

100 ns'lik simülasyon süresi boyunca S izomeri ile etkileşime giren KAT enziminin RMSD değerlerinin 0,99 Å – 9,24 Å arasında olduğu tespit edilmiştir (EK-2, Şekil 2.1-A). Simülasyon süresince ortalama RMSD değeri ise $6,15 \pm 0,95$ Å olarak bulunmuştur. S izomeri ile etkileşime giren KAT enziminin RMSF analizine göre en yüksek dalgalanma 18.04 Å ile 43. rezidüdeki ARG'de tespit edilmiştir. Bunun dışında enzimde dalgalanmalara neden olan diğer yapıların ise 0- 15, 171 ve 385 – 427 nolu rezidüler olduğu görülmektedir. Bu bölgeler enzimin döngü bölgelerine denk gelmektedir. Ayrıca 148–152, 194–243, 300–310 ve 442-449 numaralı rezidülerin allokriptopinin S izomeri ile etkileşime girdiği gözlemlenmiştir (EK-2, Şekil 2.2-A).

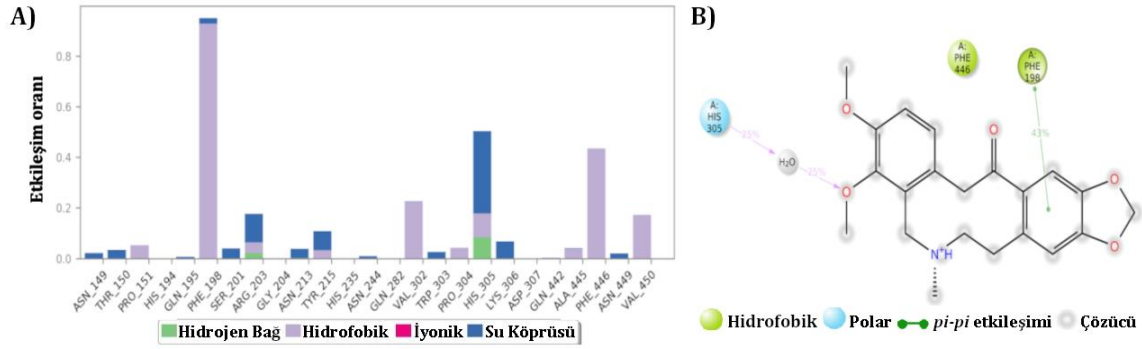
Diğer yandan, 50 ns'lik simülasyon süresi boyunca R izomeri ile etkileşime giren KAT enziminin RMSD değerlerinin ise 1,77 Å – 7,35 Å arasında olduğu tespit edilmiştir (EK-2, Şekil 2.1-B). Tüm simülasyon süresi boyunca enzimin ortalama RMSD değerleri ise $6,44 \pm 0,93$ Å olarak hesaplanmıştır. RMSF analizine bakıldığında, en çok dalgalanma RMSF değeri 10,45 Å olan 45 nolu GLY de gözlemlenmiştir. KAT enziminde dalgalanmalara neden olan diğer başlıca yapılar ise 20 – 59, 173 ve 389 – 436 nolu rezidülerdir. Bu rezidüler enzimin döngü bölgelerine denk gelmektedir. Ayrıca 194–243, 279–282 ve 442-449 numaralı rezidülerin allokriptopinin R izomeri ile etkileşime girdiği gözlemlenmiştir (EK-2, Şekil 2.2-B).

S ve R izomerleri ile etkileşime giren KAT'ın RMSD değerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu duruma izomerlerin neden olup-olmadığını belirleyebilmek için enzimin apo (ligandsız) halinin de 100 ns'lik simülasyonu yapılarak, RMSD'si hesaplanmıştır. Apo ve ligandlı KAT enziminin RMSD değerleri karşılaştırmalı olarak EK-2, Şekil 2.1-A ve B'de verilmiştir. Sonuçlar KAT enziminin kristal yapısının RMSD değerinin yüksek olduğunu, S izomerinin tüm simülasyon süresi boyunca, R izomerinin ise 50 ns boyunca enzim ile yaptığı etkileşimler sayesinde enzime ait RMSD değerinde azalışa neden olabileceğini göstermiştir. Apo form ile karşılaştırıldığında allokriptopinin KAT enzimin inhibitör bağlanma alanı ile

yaptığı etkileşimler sonucunda KAT enziminde konformasyonel değişikliklerin meydana gelebileceği görülmektedir. Bu durumun allokriptopinin KAT enzimi üzerinde inhibitör etkisi ve buna bağlı olarak gelişebilecek olası pro-oksidan aktivitesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

b) Allokriptopin-KAT kompleksindeki moleküler etkileşimler

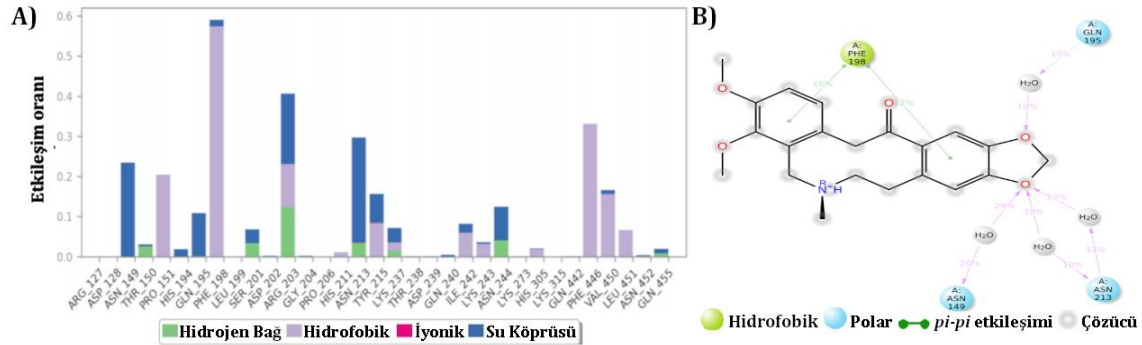
Allokriptopinin izomerleri ile KAT enziminin simülasyon süresi boyunca süren etkileşimi ve bu etkileşime aracılık eden rezidüler analiz edilmiştir. Toplam etkileşim miktarı grafiğinde incelendiğinde (EK-2, Şekil 2.3-A) allokriptopinin S izomeri ile KAT enzimindeki inhibitör bağlanma alanı arasındaki etkileşimin 100 ns boyunca sürdüğünü ve her simülasyon adımıdaki etkileşim sayısının 0 ile 9 arasında değiştiği görülmektedir. Bu bağlara PHE198, ARG203, VAL302, HIS305, PHE446 ve VAL450 rezidüleri aracılık etmektedir. Rezidülerden etkileşime en büyük katkıyı sırasıyla neredeyse tüm simülasyon süresi boyunca bağ kuran PHE198, HIS305 ve PHE446'nın yaptığı tespit edilmiştir (EK-2, Şekil 2.3-B). Bunlardan PHE198 ve PHE446'nın neredeyse kurduğu tüm etkileşimlerin hidrofobik bağdan oluştuğu, buna karşın HIS305'in ise hidrojen bağları, su köprüsü ve hidrofobik etkileşimler yaptığı görülmektedir. PHE198'in S izomerinin fenol halkası ile *pi-pi* etkileşimi yaptığı ve bu etkileşimin 100 ns'lik simülasyonun %43'ünde sürdüğü gözlemlenmiştir. Diğer yandan S izomerli KAT kompleksinin %10'dan kuvvetli etkileşimleri incelendiğinde, HIS305'in S izomerine ait metoksi grubunun oksijen atomu ile simülasyon süresi boyunca kurduğu etkileşimlerin %25'inin su köprüsü olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.13). Sonuçlar S izomerinin KAT enzimindeki inhibitör bağlanma alanında ayrılmadan simülasyon süresi boyunca etkileşime devam ettiğini ancak bu etkileşimlerin çoğunun hidrofobik olduğunu göstermektedir. Hidrofobik bağlar, hidrojen bağları ile karşılaştırıldığında zayıf bağlardır. Bu sebepten bu etkileşimlerin enzimin inhibisyonundan sorumlu olması olası değildir.



Şekil 4.13. S izomeri ile KAT enzimi arasındaki etkileşimler. A) Tüm simülasyon boyunca residüler ile kurulan etkileşim türlerinin oranının B) %10'dan kuvvetli etkileşimlerin bağlanma stabilitesinin 2B etkileşim grafiği üzerinde gösterimi

R izomeri ile KAT enzimindeki inhibitör bağlanma alanı arasında etkileşim 50 ns boyunca simüle edilmiş olup, simülasyon analizinde R izomeri ile KAT enzimi arasındaki etkileşim miktarının 45. ns'ye kadar 0 ile 9 arasında değiştiği, 45. ns'den sonra tamamen kaybolduğu görülmektedir (EK-2, Şekil 2.4-A). R izomerinin inhibitör bağlanma alanı arasındaki bu etkileşime ağırlıklı olarak ASP128, ASN149, PHE198, ARG203, ASN213, TYR215 ve PHE446 residülerinin aracılık etmektedir. Etkileşime en çok katkısı ise PHE198, ARG203, ASN213 ve PHE446'nın sağladığı görülmektedir (EK-2, Şekil 2.4-B). Diğer yandan bu residülerden PHE198 ve PHE446'nın etkileşimine yalnızca hidrofobik bağlar, ARG203 ve ASN213 etkileşimine ise hidrofobik bağın yanı sıra, su köprüleri ve zayıf hidrojen bağları eşlik etmektedir. Bu kompleksin %10'dan kuvvetli etkileşimlerin bağlanma stabilitesi incelendiğinde PHE198'ün R izomerinin iki fenol halkasıyla da 50 ns'lik simülasyon süresinin %12 ve %16'sında *pi-pi* etkileşimi kurduğunu görülmektedir. ASN149, GLN195 ve ASN 213 ise siklik asetatın oksijen atomları ile su köprüleri oluşturmuştur. Bu kapsamda ASN149 ve GLN195'e ait su köprüleri sırasıyla simülasyon süresinin %20 ve %10'u boyunca gözlemlenmiştir. ASN213'ün ise siklik asetatın bir oksijeni ile biri simülasyon süresinin %13 diğeri ise %10'u boyunca süren iki farklı su köprüsü kurduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14). Sonuçlar R izomeri ile KAT enzimi arasındaki etkileşiminin 45 ns sürdüğünü ve başlıca etkileşime ASN149, GLN195 ve ASN 21 residülerinin kurduğu su köprüleri ile birlikte PHE198'in hidrofobik *pi-pi* etkileşiminin aracılık ettiğini göstermektedir.

45. ns’de ise R izomeri enzim yapıdaki inhibitör bağlanma alanından kopmuştur. R izomerinin inhibitör bağlanma alanı ile moleküler etkileşiminin çok büyük bir bölümünü su köprüleri ve zayıf hidroforbik bağlardan oluşturmaktadır. Dolayısıyla allokrriptopinin KAT enziminin inhibisyonu üzerindeki etkisinin karasız olabileceği öngörülmektedir.

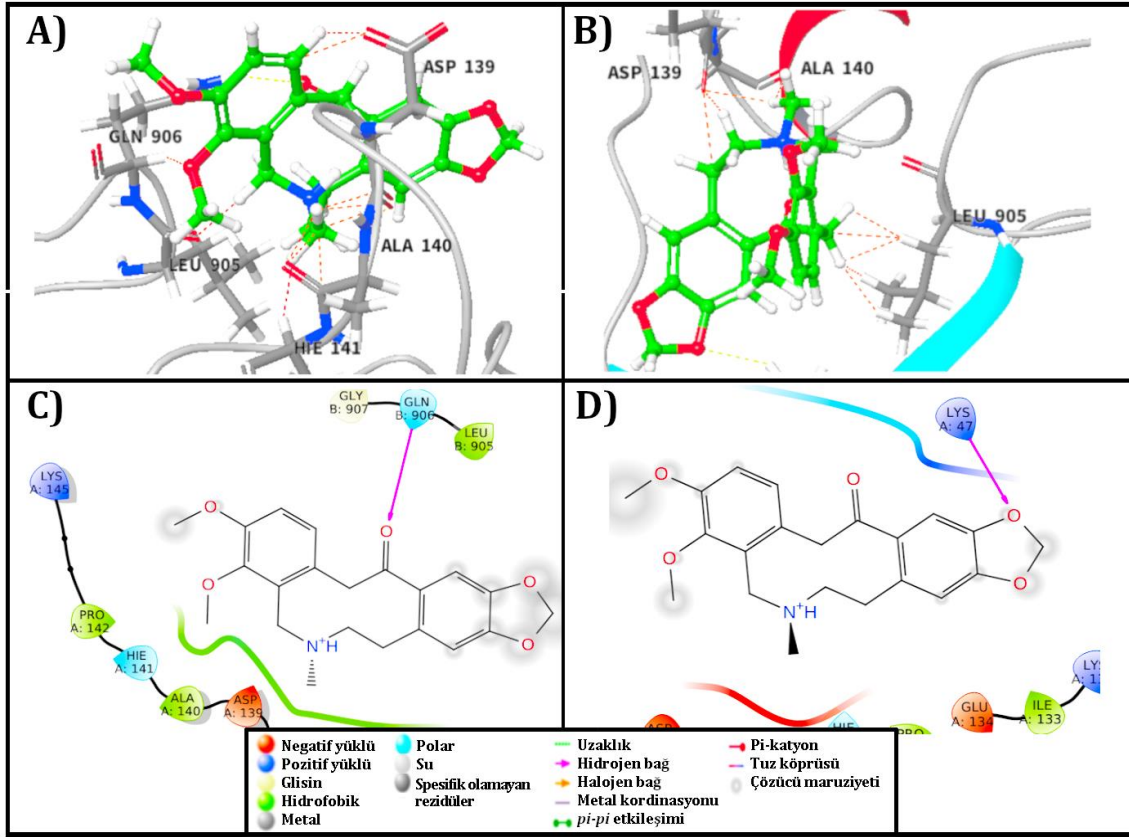


Şekil 4.14. R izomeri ile KAT enzimi arasındaki etkileşimler. A) Tüm simülasyon boyunca residüler ile kurulan etkileşim türlerinin oranı B) %10’dan kuvvetli etkileşimlerin bağlanma stabilitesinin 2B etkileşim grafiği üzerinde gösterimi

4.2.4. Allokrriptopinin glutatyon peroksidaz enzimi ile etkileşiminin modellenmesi

Kenetlenme çalışmaları

Bu bölümde, moleküler kenetlenme yöntemleri kullanılarak allokrriptopinin SOD enziminin inhibisyonu yoluyla oluşabilecek olası pro-oksidan aktivitesinin moleküler temellerinin ortaya konulması hedeflenmiştir. Bu amaçla allokrriptopinin izomerlerin, SOD enziminin kristal yapısı üzerindeki literatürde belirlenmiş inhibitör bağlanma alanı ile etkileşimi ve bu etkileşime aracılık eden bağ türleri hesaplanmıştır. Moleküler kenetlenme çalışmaları sonucunda allokrriptopine ait S ve R izomerlerinin GPx enziminin inhibitör bağlanma alanı ile kenetlenme puanı sırasıyla 1,58 kcal/mol ve -0,43 kcal/mol olarak bulunmuştur. S izomerinin kenetlenmesinde, amin gruplarındaki azot atomu ile GLU43 arasındaki tuz köprüsünün ve metoksi grubunun oksijen atomu ile ARG39 arasındaki hidrojen bağının rol aldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.15A). R izomerinin ise siklik asetal grubunun oksijeni aracılığıyla inhibitör bağlanma alanındaki ARG39 ile hidrojen bağ kurduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.15B).



Allokriptopinin GPx enzim inhibitörü bağlanma alanı ile etkileşim haritası. A) S izomeri ile olan etkileşimin kristal yapısı üzerinde gösterimi, B) R izomeri ile olan etkileşimin kristal yapısı üzerinde gösterimi, C) S izomeri ile inhibitör bağlanma alanının etkileşim haritası, D) R izomeri ile inhibitör bağlanma alanının etkileşim haritası, C ve D'deki kesik çizgiler zayıf bağları temsil etmektedir

Moleküler dinamik çalışmaları

MD simülasyon çalışmalarıyla allokriptopinin izomerleri ile GPx enziminin inhibitör bağlanma alanı arasındaki kenetlenme durumunun kararlılığının ve sürekliliğinin test edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç ile kenetlenme çalışması sonu elde edilen ve Şekil 4.15'de de verilen kenetlenme pozu MD simülasyonları için başlangıç pozu olarak belirlenmiştir ve Schrödinger programının Desmond modülü kullanılarak hesaplamalar gerçekleştirilmiştir.

S izomerinin hedef bölgede kararlı bir moleküler etkileşim göstermemesi nedeniyle S izomeri için 10 ns'lik simülasyon gerçekleştirilmiştir. R izomerinin ise 2. ns'den sonra inhibisyonundan sorumlu rezidülerin komşuları ile etkileşime girdiği tespit edilmiştir. Bu

sebepten R izomeri için de 5 ns'lik simülasyon yeterli görülmüştür. Hesaplamalar sonucunda her iki kompleksin de RMSD, RMSF ve moleküler etkileşimleri analiz edilmiştir.

a) Allokriptopin-GPx kompleksinin RMSD ve RMSF analizi

GPx enzimidaki yapısal değişimlerin belirlenmesi amacıyla hem S izomerli hem de R izomerli kompleks için enzimin RMSD değerleri Ca atomları dikkate alınarak hesaplanmıştır.

S izomeri ile etkileşime giren GPx enziminin RMSD değeri 10 ns'lik simülasyon süresi boyunca 0,68–1,91 Å arasındadır. Ortalama RMSD değeri ise $1,33 \pm 0,15$ Å olarak hesaplanmıştır (Ek-3 Şekil 3.1-A). Gerçekleştirilen RMSF analizi sonucunda kompleksteki en çok dalgalanmanın 3,35 Å'luk RMSF değeri ile N- terminal ucundaki ASP rezidüsünde olduğu tespit edilmiştir. Simülasyon boyunca tespit edilen diğer kayda değer dalgalanmaların proteinin döngü bölgelerinde olduğu görülmüştür. Ayrıca, S izomerinin etkileşime girdiği bölgeler 37–43, 56, 60, 71–75, 105–115, 138–140 ve 154–162 numaralı rezidülerdir (Bkz şekilde de yeşil çubuklar Ek-3 Şekil 3.2-A). 5 ns'lik MD simülasyon sonucunda, R izomeri ile etkileşime giren GPx enzimine ait RMSD değerlerinin ise 0,69–1,30 Å arasında ve ortalamasının $1,05 \pm 0,09$ Å olduğu belirlenmiştir (Ek-3 Şekil 3.1-B). R izomeri ile etkileşime giren GPx enziminin RMSF analizinde ise üç bölgede yüksek dalgalanmaya rastlanmıştır. Bunlardan ilki ve en yüksek RMSF değeri 3,35 Å olan enzimin N- terminal ucundaki ASP rezidüsüdür. Diğerleri ise S izomerindeki gibi döngü bölgelerindedir (Ek-3 Şekil 3.2-B). RMSD ve RMSF analizleri sonucunda her iki izomerinde enzimde ciddi bir yapısal değişikliğe neden olmadığını görülmüştür.

b) Allokriptopin-GPx kompleksindeki moleküler etkileşimi

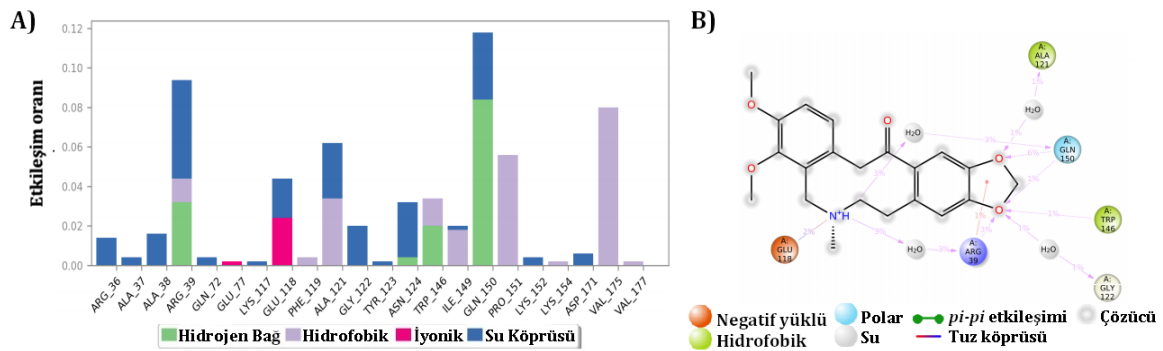
Allokriptopinin izomerleri ile GPx enziminin simülasyon süresi boyunca moleküler etkileşime katkı yapan hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, su ve iyon köprüleri ve bunların etkileşim oranları hesaplanmıştır.

Toplam etkileşim miktarı grafiği incelendiğinde, allokriptopinin S izomeri ile GPx enziminin inhibitör bağlanma alanı arasındaki 10 ns'lik etkileşimin süreklilik göstermediği ve kopmalar olduğu gözlemlenmiştir. Bu etkileşimlerden ilki 0–0,4 ns arasında meydana

gelmiştir. Koptuktan sonraki ikinci etkileşim ise 4,2–5 ns arasında oluşmuştur. Fakat her iki zaman aralığındaki etkileşimlerin kararsız ve sayıca az olduğu tespit edilmiştir.

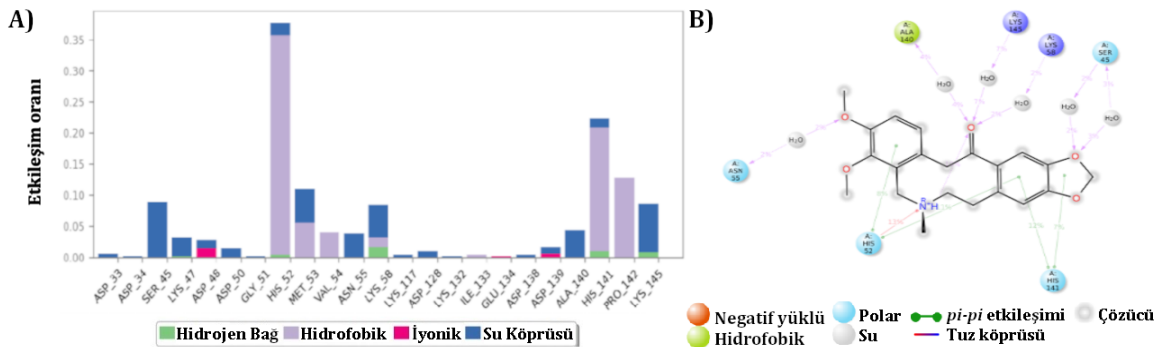
Diğer yandan, 5. ns'den sonra S izomerinin enzimin inhibitör bağlanma alanı ile arasındaki bu zayıf etkileşim tamamen son bulmuştur (Ek-3 Şekil 3.3-A). 0–0,4 ve 4,2–5 ns'ler arasındaki kısa etkileşimine ARG39 ve GLU43'ün eşlik ettiği saptanmıştır (Ek-3 Şekil 3.3-B).

Allokriptopinin S izomeri ile ARG39 ve GLU43 rezidüleri arasındaki etkileşimler ve oranları analiz edildiğinde, ARG39'un etkileşimine su köprüsü, hidrofobik ve hidrojen bağlarının, GLU43'e ise hidrofobik etkileşimlerin ve iyon köprülerinin aracılık ettiği tespit edilmiştir. Simülasyon boyunca %1'den kuvvetli etkileşimlerin bağlanma stabilitesi incelendiğinde ise ARG39'un simülasyonu süresinin yalnızca %1'i boyunca su köprüsü ve hidrofobik etkileşime girdiği gözlemlenmiştir. Su köprüsünün metoksi grubunun oksijen atomu ile, hidrofobik etkileşimin ise siklik asetal halkasıyla yapılan *pi-pi* etkileşimi ile gerçekleştiği tespit edilmiştir. GLU43'ün ise tersiyer amin grubundaki azot atomu ile simülasyonu süresinin yalnızca %2'si boyunca tuz köprüsü kurduğu belirlenmiştir. Öte yandan ARG39 ve GLU43'ün yanı sıra inhibisyon ile ilişkilendirilmeyen ARG60, GLN108 ve GLY155 rezidülerinin de simülasyon süresinin %1'inde allokriptopinin S izomeri ile etkileşime girdiği saptanmıştır (Şekil 4.16). Sonuçlar allokriptopinin S izomeri ile GPx enziminin inhibitör bağlanma alanı arasındaki etkileşimin toplamda yalnızca toplamda 1,2 ns'lik zaman aralığında meydana geldiğini ve sonrasında ise etkileşimin bozulduğu göstermektedir. Tüm bunları ışığında S izomerinin GPx enzimi üzerinde inhibitör bir aktiviteye sahip olmayacağı düşünülmektedir.



Şekil 4.16. S izomeri ile GPx enzimi arasındaki etkileşimler. A) Tüm simülasyon boyunca rezidüleri ile kurulan etkileşim türlerinin oranı B) %1'den kuvvetli etkileşimlerin bağlanma stabilitesinin 2B etkileşim grafiği üzerinde gösterimi

R izomerinin GPx'in inhibitör bağlanma alanı ile etkileşimi için ise 5 ns'lik MD simülasyon hesaplamaları yapılmıştır. Simülasyon analizi R izomeri ile GPx enzimi arasındaki etkileşimin 5 ns boyunca sürdüğünü ve etkileşim miktarının birim zaman da 0–5 arasında değiştiğini göstermektedir (Ek-3 Şekil 3.4-A). Ancak etkileşime dâhil olan rezidülerin zamana göre değişiminin yer aldığı (Ek-3 Şekil 3.4-A) incelendiğinde, ASP33, ASP34 ve SER45 gibi inhibisyonundan sorumlu olan rezidüler ile kurulan bağların az miktarda ve ilk 2 ns içerisinde oluşturulduğu gözlemlenmektedir. Sonrasında ise HIS52 ve MET53 gibi enzimin inhibisyonuna aracılık etmeyen rezidüler ile etkileşimlerin oluştuğu görülmektedir. Bu durum R izomerinin bağlanma alanında hareket ederek, diğer rezidüler ile etkileşimi tercih ettiğini ve inhibisyon sorumlu rezidüler ile olan etkileşiminin zayıf olduğunu göstermektedir. Diğer yandan inhibisyonundan sorumlu rezidüler ile kurulan etkileşim türleri ve oranları analiz edilmiştir. Üç rezidünün R izomeri ile etkileşimine su köprülerinin aracılık ettiğini tespit edilmiştir. ASP33 ve ASP34 ile kurulan etkileşim simülasyon süresinin %1'inden de az bir zaman aralığında gerçekleşmiştir. SER45'in ise simülasyon süresinin %2 ve %3'ü boyunca sıklıkla asetalın bir oksijen atomu ile iki farklı su köprüsü bağı kurduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, LYS50, ASN55, ALA140 ve LYS145'in R izomeri ile %2-7 oranında su köprüsü kurduğu belirlenmiştir (Şekil 4.17). Sonuçlar allokriptopine ait R izomerinin, GPx enziminin inhibisyonunda sorumlu olan rezidüler ile etkileşiminin de kısa süreli ve kararsız olduğunu bu nedenle daha yüksek afinite ile bağlanabileceği başka rezidüler ile etkileşimi tercih ettiğini göstermektedir. Bu durum R izomerinin GPx enzimi üzerinde inhibisyona bağlanma alanı aracılığıyla kararlı bir inhibitör bir aktiviteye sahip olmayacağını işaret etmektedir.



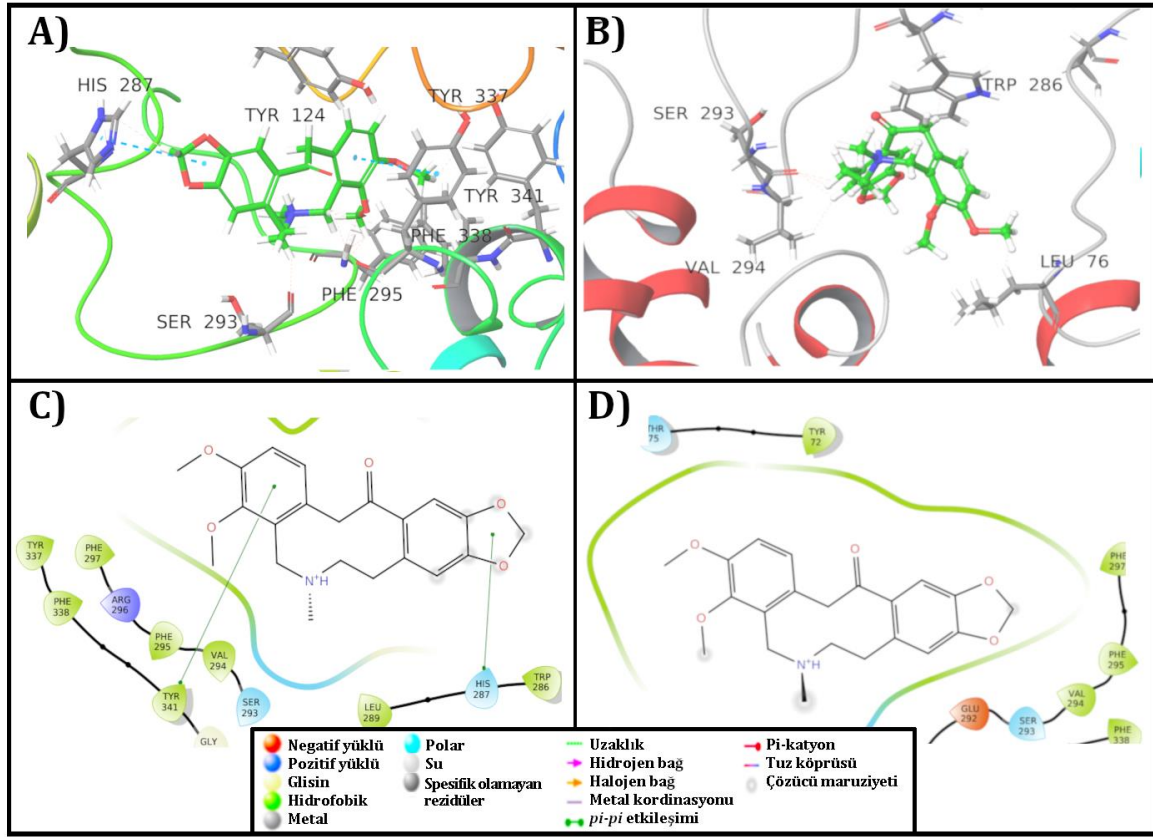
Şekil 4.17. R izomeri ile GPx enzimi arasındaki etkileşimler. A) Tüm simülasyon boyunca rezidüler ile kurulan etkileşim türlerinin oranı B) %1'den kuvvetli etkileşimlerin bağlanma stabilitesinin 2B etkileşim grafiği üzerinde gösterimi

4.2.4. Allokriptopinin AChE enzimi ile etkileşiminin modellenmesi

Kenetlenme çalışmaları

Bu son bölümde, allokriptopinin AChE enzimi üzerindeki inhibitör aktivitesinin moleküler temellerinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaçla allokriptopin izomerlerinin, AChE enziminin kristal yapısı üzerindeki literatürde belirlenmiş inhibitör bağlanma alanı ile etkileşimi ve bu etkileşime aracılık eden bağ türleri hesaplanmıştır.

Sonuçlar ile allokriptopinin her iki izomerlerinin de AChE enziminin inhibitör bağlanma alanına kenetlenebildiğini tespit edilmiştir. S ve R izomerleri için kenetlenme puanları sırasıyla -5,77 kcal/mol ve -5,47 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. S izomerinin kenetlenme durumu esasen siklik asetal halkası ile HIS287 ve orto-difenol halkası ile TYR341 rezidüleri arasındaki *pi-pi* etkileşimine dayanmaktadır (Şekil 4.18A). Bunun yanı sıra yapıdaki metil gruplarının ucundaki hidrojen atomları aracılığıyla SER293, HIS287, PHE295, PHE338 ve TYR341 rezidüleri ile etkileşimler kurduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.21C). R izomerlerinin kenetlenme durumu ise zayıf etkileşimlerden (hidrofobik) oluşmaktadır. Bu sebepten etkileşim haritasında görüntülenememiştir (Şekil 4.18B). Ancak, Şekil 4.21D'deki AChE'nin kristal yapısı ile olan pozunda bu etkileşim verilmiştir. S izomerinde olduğu gibi bu etkileşimler metil gruplarının ucundaki hidrojen atomları ile LEU76, SER293, VAL294 ve TRP286 rezidüleri arasında oluşmuştur.



Şekil 4.18. Allokriptopin AChE enzim inhibitörü bağlanma alanı ile etkileşim haritası. A) S izomeri ile olan etkileşimin kristal yapısı üzerinde gösterimi, B) R izomeri ile olan etkileşimin kristal yapısı üzerinde gösterimi, C) S izomeri ile inhibitör bağlanma alanının etkileşimi, D) R izomeri ile inhibitör bağlanma alanının etkileşimi, C ve D'deki turuncu kesik çizgiler zayıf bağları temsil etmektedir

Moleküler dinamik çalışmaları

Gerçekleştirilen MD simülasyon çalışmalarıyla, allokriptopinin izomerleri ile AChE enziminin inhibitör bağlanma alanı arasındaki kenetlenme durumunun kararlılığının ve sürekliliğinin test edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç ile kenetlenme çalışmaları sonucu elde edilen ve Şekil 4.18'de de verilen allokriptopin-AChE komplekslesinin kenetlenme pozu MD simülasyonları için başlangıç pozu olarak belirlenmiştir ve Schrödinger programının Desmond modülü kullanılarak hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. Her iki izomer için de 100 ns'lik simülasyon hesabı gerçekleştirilmiştir.

a) Allokriptopin-AChE kompleksine ait RMSD ve RMSF değerlerinin analizi

Ca atomlarına ait RMSD değerlerinin analizi, 100 ns'lik simülasyon süresi boyunca S izomeri- AChE kompleksinin RMSD değerlerinin 0,72–2,23 Å arasında ve ortalama $64 \pm 0,21$ Å olduğu göstermektedir (EK-4, Şekil.4.1-A). Enzimdeki en yüksek RMSF 494. rezidü olan ASP'dedir ve 5,49 Å büyüklüğündedir. Ayrıca 74–85, 165–170, 341–343, 385 ve 492–500 rezidüelerinde de önemli dalgalanmalar görülmüştür. Bu bölgeler enzimin döngü bölgesinde denk gelmektedir. Ayrıca 72–75, 121–124, 250, 280–298 ve 336–341 numaralı rezidülerinin S izomeri ile etkileşime girdiği belirlenmiştir (EK-4, Şekil.4.2-A).

100 ns'lik simülasyon süresi boyunca R izomeri ile etkileşime giren AChE enziminin RMSD değerlerinin ise 0,67–2,56 Å ortalama RMSD değerlerinin ise $1,89 \pm 0,30$ Å olduğu tespit edilmiştir (EK-4, Şekil.4.1-B). R izomeri-AChE kompleksinin ağır atomlarına göre hesaplanan RMSF değerleri simülasyon süresi boyunca en yüksek dalgalanmanın 8 Å ile 542. rezidü olan ALA'da olduğunu göstermektedir. Diğer yandan simülasyon süresi boyunca 9 farklı bölgedeki rezidülerde de dalgalanmalar olduğu tespit edilmiştir. Bunlardan bazıları 1 ve 2. rezidüler olan GLU ve ASP, 334'deki TYR, 385'deki TRP, 437'deki LEU, 494–497'deki ASP-ACE ve 534 ile başlayan terminal uçtaki rezidülerdir. Diğer yandan 71–75, 121–124, 250, 280–296 ve 336–343 numaralı rezidülerinin R izomeri ile etkileşime girdiği belirlenmiştir (EK-4, Şekil.4.2-B).

İki izomerinde enzimin inhibisyonundan sorumlu bağlanma alanındaki aynı rezidülere bağlandığı ancak iki kompleks arasındaki rezidülere ait RMSF değerlerinin farklılık gösterdiği, R izomeri ile etkileşime giren AChE enziminin daha çok dalgalanma gösterdiği tespit edilmiştir. İki izomerin farklılığın iki izomerin kurduğu farklı bağ ve etkileşimler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

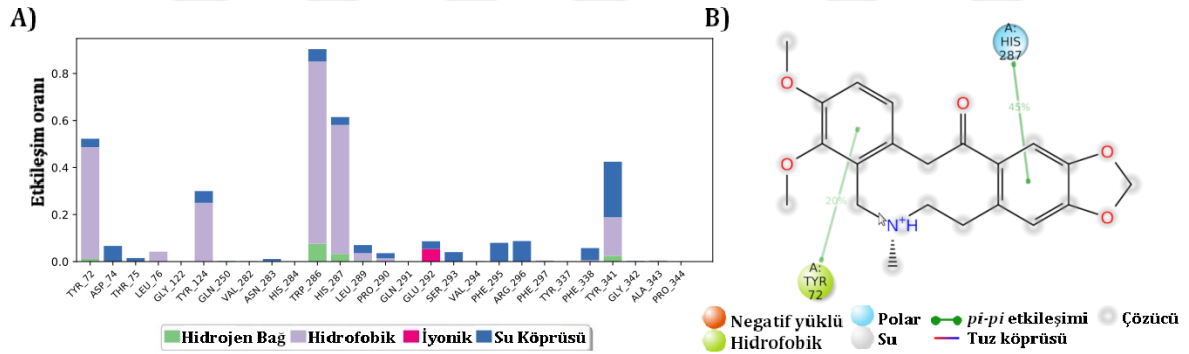
b) Allokriptopin-AChE kompleksinin moleküler etkileşimi

Allokriptopinin izomerleri ile AChE enziminin MD simülasyon süresi boyunca süren etkileşimi ve bu etkileşime aracılık eden rezidüler de analiz edilmiştir.

Toplam etkileşim miktarı grafiğinde de görüldüğü üzere, allokriptopinin S izomeri ile AChE enziminin inhibitör bağlanma alanı arasındaki etkileşim 100 ns'lik MD simülasyonun

tamamında görülmektedir (EK-4, Şekil.4.3-A). Her bir simülasyon adımındaki toplam etkileşim sayısının 0 ile 9 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Simülasyon boyunca etkileşimlere başlıca TYR72, TRY124, TRP286, HIS287 ve GLU341 rezidülerinin eşlik ettiği saptanmıştır (EK-4, Şekil.4.3-B).

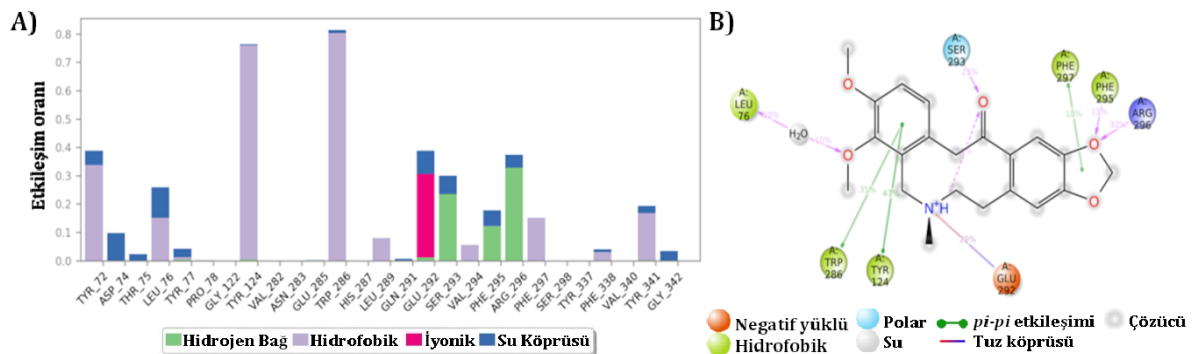
TYR72, TRP286, HIS287 ve GLU341 rezidüleri büyük oranda hidrofobik etkileşimin yanı sıra az miktarda su köprüsü ve hidrojen bağ kurmuştur. Diğer yandan, TRY124'ün ise S izomerinin hidrofobik etkileşim ve eser miktarda su köprüsü aracılığıyla bağ kurulduğu belirlenmiştir. Simülasyon boyunca %10'dan kuvvetli etkileşimlerin bağlanma stabilitesi incelendiğinde ise TYR72 ile izomerinin orta-difenol halkası arasında simülasyon süresinin %20'si boyunca, HIS287 ile siklik asetal arasında ise %45'i boyunca *pi-pi* etkileşiminin kurulduğu görülmektedir (Şekil 4.19). Sonuçlar alloktopine ait S izomeri ile AChE enziminin inhibitör bağlanma alanı arasındaki etkileşimin simülasyon süresi boyunca, enzim yapısında bozulmaya neden olmaksızın sürdüğünü göstermektedir. Hesaplamalar ayrıca, kompleksteki inhibisyona aracılık eden anahtar yapıların izomerde orta-difenol ve C halkaları, enzimde ise TYR72 ve HIS287 rezidüleri olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.19. S izomeri ile AChE enzimi arasındaki etkileşimlerin. A) Tüm simülasyon boyunca rezidüler ile kurulan etkileşim türlerinin oranını gösteren grafik B) %10'dan kuvvetli etkileşimlerin bağlanma stabilitesinin 2B etkileşim grafiği üzerinde gösterimi

R izomeri ile AChE enziminin inhibitör bağlanma alanı arasındaki toplam etkileşim miktarının grafiği S izomerinde olduğu gibi 100 ns boyunca etkileşimin devam ettiğini ve her bir simülasyon adımındaki etkileşim miktarının 0 ile 9 arasında değiştiğini göstermektedir (EK-4, Şekil.4.4-A).. Diğer yandan, bu etkileşimlerden sorumlu olan başlıca rezidülerin TYR72, LEU76, TRY124, TRP286, GLU292, SER293, PHE295, ARG296, PHE297 ve TYR341 olduğu belirlenmiştir.

R izomeri ile bu rezidüler arasındaki etkileşimler ve oranları incelendiğinde, bu rezidülerden TYR72, LEU76, TRY124, TRP286 ve TYR341'in hidroforik bağlar ve kısa su köprüleri ile etkileşime aracılık ettiği tespit edilmiştir (EK-4, Şekil.4.4-B). Diğer yandan SER293, PHE295 ve ARG296'nın etkileşimde ise hidrojen bağlarının ve az sayıda su köprülerinin rol aldığı bilinmektedir. GLU292'nin ise iyonik bağlar ve çok az sayıda su köprüleri ile etkileşime eşlik ettiği gözlemlenmiştir. %10'dan kuvvetli etkileşimlerin bağlanma stabilitesi incelendiğinde ise TYR124 ve TRP286'nın orta-difenol halkası ile sırasıyla simülasyon süresinin %47 ve %35'i boyunca *pi-pi* etkileşimi, LEU76'nın ise aynı yapının metoksi grubunun oksijen atomu ile simülasyon süresinin %10'u boyunca su köprüsü kurduğu gözlemlenmiştir. Öte yandan, ARG296 ve PHE295 rezidülerinin siklik asetal yapısı üzerindeki aynı oksijen atomu ile simülasyon süresinin sırasıyla %32 ve %11'i boyunca hidrojen bağ kurduğu, bunlara komşu olan PHE297'nin de bu yapı ile *pi-pi* etkileşimi yaptığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra GLU292'nin amin grubunun azot atomu ile simülasyon süresinin %29'u boyunca tuz köprüsü, SER293'ün ise keton grubundaki oksijen atomu ile simülasyon süresinin %23'ü boyunca hidrojen bağ yaptığı tespit edilmiştir (Şekil 4.20). Sonuçlar allokriptopine ait R izomeri ile AChE enziminin inhibitör bağlanma alanı arasındaki etkileşimin tüm simülasyon süresi boyunca, enzim yapısında bozulmaya neden olmaksızın sürdüğünü göstermektedir. Hesaplamalar ayrıca, kompleksteki inhibisyona aracılık eden anahtar yapıların izomerde orta-difenol ve siklik asetal halkası, keton, amin ve metoksi grupları olduğunu enzimde ise TYR124, TRP286 ve ARG296 rezidüleri olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.20. R izomeri ile AChE enzimi arasındaki etkileşimler A) Tüm simülasyon boyunca rezidüler ile kurulan etkileşim türlerinin oranını gösteren grafik B) %10'dan kuvvetli etkileşimlerin bağlanma stabilitesinin 2B etkileşim grafiği üzerinde gösteri



5. TARTIŞMA

AH dejeneratif değişimlere bağlı olarak gelişen, nöronal kayıp sonucu bilişsel ve kognitif fonksiyonların yitirilmesi ile karakterize edilen progresif bir nörodejeneratif hastalıktır. Sıklık ile 60 yaş üzeri kişilerde rastalanan bu hastalık demansın en yaygın formudur ve küresel nüfusun her geçen gün daha da yaşlanması ile birlikte bu hastalığın prevalansının da artması beklenmektedir (Cummings ve diğerleri, 2021; Durães ve diğerleri, 2018; Li ve diğerleri, 2020a). Diğer yandan ciddi bir küresel sağlık sorunu olan AH aynı zamanda takip, tedavi ve bakım süreçlerinin yönetilmesinin zorluğu nedeniyle sosyo-ekonomik anlamda da toplum ve bireyler için büyük bir yüküdür (Akyar ve Akdemir, 2009; Eroymak ve Yiğit, 2017).

AH patofizyolojisinin ardındaki temel moleküler mekanizmalar incelendiğinde oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, antioksidan ve nörotransmitter mekanizmaların zayıflaması, kolinerjik iletimin bozulması ve plak ve protein agregasyonu gibi diğer nörodejeratif hastalıklarda da ortaya çıkan ortak mekanizmaların AH'nin oluşumunda ve ilerlemesinde rol oynadığı görülmüştür (Di Paolo ve diğerleri, 2019; Taso ve diğerleri, 2019; Yacoubian, 2016; Yurtkap ve Arslan, 2018). Buna karşın, uzun yıllardır yalnızca AChE inhibitörleri ve NMDA antagonistlerinin kullanımı ile sınırlı olan AH tedavilerine 2021 yılı itibari ile Aβ'yı hedef alan yeni bir antikor tedavisi eklenmiştir (İnternet 1; Korabecny ve diğerleri, 2015). Ancak bu tedavilerin hastalığı modifiye etmeksizin yalnızca semptomları hafiflettiği bilinmekte olup, uzun vadedeki güvenilirlikleri hakkında ciddi şüphe ve tartışmalar bulunmaktadır (İnternet 1; Graham ve diğerleri, 2017; Selkoe, 2019). Güncel terapötik yaklaşımların tedavi sağlayamaması nedeniyle bu hastalıklardaki morbidite ve mortalite oranlarının giderek daha da artması beklenmektedir (Girdhar ve diğerleri, 2015). Bu sebepten AH ve AH'nin yanı sıra benzer nörodejeneratif hastalıklarda da etkin olabilecek yeni ilaç etken maddelerinin bulunması ve buna bağlı yeni ilaç adaylarının geliştirilmesi son derece önemli bir konudur.

Bitkisel sekonder metabolitler içerisinde yer alan alkaloidlerin, nöronlardaki oksidatif stresi, agregasyonu ve nöral apoptozu baskılayarak, antioksidan sistemleri güçlendirerek, sinyal yollarını ve iyon homeostazisini düzenleyerek nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu veya tedavi edici etkilere sahip oldukları da bilinmektedir (Dey ve Mukherjee, 2017; Hussain ve diğerleri, 2019). İzokinolin grubu bir alkaloid olan allokriptopinin ise antibakteriyel, antiviral, antifungal, antiparazitik, antikanser, anti-aritmik, anti-hepatositik, anti-anjiyojenik

ve illeum rahatlatma gibi biyolojik aktivitelere sahip olduğu ortaya konulmuş olmakla birlikte, nörodejeneratif hastalıklardaki etkinliğinin ortaya konulduğu ön çalışma niteliğinde sınırlı araştırmalar bulunmaktadır (Fu ve diğerleri, 2016; Haberlein ve diğerleri, 1996; Herrmann ve diğerleri, 2020; Morteza-Semnani ve diğerleri, 2003; Orhan ve diğerleri, 2007a; Şener ve Orhan, 2005; Siatka ve diğerleri, 2017; Su ve diğerleri, 2011; Vacek ve diğerleri, 2010; Zhang ve diğerleri, 2015). Bu sebepten bu tez çalışmasında allokriptopinin oksidatif stres ile AH modeline indüklenmiş hücrelerdeki lipit peroksidasyonu, oksidan düzeyi ve antioksidan mekanizma, AChE inhibisyon potansiyeli ve nöral morfoloji üzerindeki nörokoruyucu etkisinin belirlenerek, bu sistemler arasındaki ilişkinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Allokriptopinin toksik olmayan etkin uygulama konsantrasyonunun ve inkübasyon süresinin bulunması amacıyla farklı konsantrasyon (20 ve 300 µg/mL) ve inkübasyon sürelerindeki (12, 24 ve 48 saat) allokriptopin uygulamalarının PC12 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Üç inkübasyon süresi için de IC₅₀ değeri (hücre canlılığını %50 oranında inhibe eden konsantrasyon) sırasıyla 215, 183 ve 163 µg/mL olarak belirlenmiştir. Yüksek allokriptopin konsantrasyonları (150, 240 ve 300 µg/mL) ve 24 saatlik inkübasyon süresi ile birlikte hücre canlılığında azalma gözlemlenmiş olup, hücre canlılığının %80'nin altına düşmesi toksisite ile ilişkilendirilmesi nedeniyle, canlılığın %95-80 oranları arasında olduğu 25-150 µg/mL allokriptopinin 18 saatlik uygulaması devam edecek çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

Aslında aerobik organizmalar için oksijen metabolizmasının normal bir yan ürünü olan ve düşük konsantrasyonları hücre sinyalleşmesinde görev alan H₂O₂, yüksek konsantrasyonlarda ve uzun süreli maruz kalımda oksidatif strese yol açmaktadır (Othman ve Yabe, 2015). H₂O₂'nin neden olduğu oksidatif stres ise membran depolarizasyonu aracılığı ile membran yapısında bozulmalara, DNA, protein ve lipit gibi hücresel makromoleküllerin hasarına ve nöral dejenerasyona aracılık etmektedir (Bao ve diğerleri, 2017; Chen ve diğerleri, 2016). Ayrıca, H₂O₂ patolojik Aβ üretimi için kritik olan sekretazların aktivasyonunu artırmaktadır ve protein kinazların/fosfatazların modülasyonu ile tau proteinin hiperfosforilasyon ve polimerizasyonuna neden olmaktadır (Hadipour ve diğerleri, 2018; Tan ve diğerleri, 2015). Bu sebepten literatürde H₂O₂ oksidatif stres kaynaklı hücresel Alzheimer modelleri için kullanılmakta olup, (Hadipour ve diğerleri, 2018; Rafieipour ve diğerleri, 2019) bu tez çalışmasında da oksidatif hasara bağlı AH hücre

modelinin oluşturulmasında H_2O_2 kullanılmıştır. 116S299 no'lu Tübitak projesi kapsamında yapılan çalışmalarda oksidatif stres ile indüklenmiş AH hücresel modeli oluşturmak için en uygun inkübasyon süresi ve konsantrasyon olduğu belirlenen, 24 saat boyunca $200 \mu M H_2O_2$ uygulanmış fPC12 hücreleri iyi sonuç vermiş olduğundan, bu tez çalışmasında da aynı konsantrasyon ve süredeki H_2O_2 ile model oluşturulmuştur.

Literatürde, $200 \mu M H_2O_2$ 'in PC12 hücrelerinde ROS oluşumunu tetikleyerek hücre canlılığını %50'lere kadar indirdiğine dair pek çok kanıt bulunmaktadır (Gao ve diğerleri, 2012; Lee ve diğerleri, 2014; Luo ve diğerleri, 2011; Othman ve Yabe, 2015). Kanıtlar ile uyumlu olarak, bu çalışmada da 24 saat boyunca $200 \mu M H_2O_2$ 'ye maruz kalan PC12 hücrelerinin canlılığı %53 olarak belirlenmiş olup ($p < 0,05$), bu uygulama ile yüksek ölümcül etkiye neden olmayan oksidatif stres ile indüklenmiş hücresel AH modeli PC12 hücrelerinde başarı ile oluşturulmuştur. Allokriptopinin AH modelindeki biyolojik etkinliği, 18 saatlik 25-150 $\mu g/mL$ allokriptopin konsantrasyonlarının ön muamelesi sonrası H_2O_2 uygulanan PC12 hücrelerinde çalışılacağından, bu modelde de allokriptopinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi belirlenmiştir ve hücre canlılığının doza bağımlı bir şekilde %11-32 oranlarında korunduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan, allokriptopinin oksidatif stres ile indüklenmiş PC12 hücrelerindeki etkisinin IC_{50} (canlılığı %50 oranında inhibe eden konsantrasyon) değeri 165,54 $\mu g/mL$ olarak belirlenmiştir. Farklı allokriptopin konsantrasyonları oksidatif stres ile indüklenen PC12 hücrelerine uygulandığında IC_{50} değerinin 165,54 $\mu g/mL$ olarak bulunmuş olması, 165 $\mu g/mL$ 'nin altındaki konsantrasyonların yüksek toksisite göstermeyen konsantrasyonlar olarak denemelerde kullanılabileceğinin kanıtı olmuştur.

Huang ve arkadaşları tarafından da 10 mmol/L glutamat uygulanarak hücre canlılığının %50'ye düşürüldüğü PC12 hücrelerinde allokriptopinin bu hasara karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu raporlanmış olup, bu etkinin IC_{50} değerleri 33.453 $\mu mol/L$ olarak belirlenmiştir (Huang ve diğerleri, 2018a). Her iki çalışma verileri de allokriptopinin nöral hasar grubu ile karşılaştırıldığında hücre ölümünü doza bağımlı olarak baskılayabildiğini göstermektedir. Ancak, allokriptopinin H_2O_2 ile oksidatif stresin oluşturulduğu bu tez çalışmasındaki saptanan IC_{50} değerinin Huang ve arkadaşlarının tarafından belirlenen değerden çok daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Bu durumun Huang ve arkadaşları tarafından hasar modeli oluşturmak için tercih edilen glutamatın etkili olduğu yollar ve glutamat

konsantrasyonunun tez çalışmasında kullanılan H_2O_2 'den beş kat daha yüksek olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Diğer yandan fenton yolağı aracılığıyla PC12 hücrelerinde ROS oluşumunu tetikleyen H_2O_2 'nin, hücre içi pro-oksidan-antioksidan dengesini bozarak; protein, lipit ve nükleik asitler gibi hücrel makromoleküllere zarar veren oksidatif strese ve oksidatif stres kaynaklı nöral hücrel ölüme neden olduğu bilinmektedir (Chen ve diğerleri, 2016; Feng ve diğerleri, 2021; Hadipour ve diğerleri, 2018; Jiang ve diğerleri, 2016; Li ve diğerleri, 2020b; Zhao, 2019). H_2O_2 uygulanan PC12 hücrelerinin yüzde canlılığı ile karşılaştırıldığında allokriptopin ön muamelesinden sonrası H_2O_2 ile oksidatif strese indüklenen hücrelerde 25-120 $\mu\text{g/mL}$ allokriptopin konsantrasyonlarının sırasıyla %32, %30, %25 ve %11 oranlarında nörokoruyuculuk gösterdiği ve artan konsantrasyonlar ile birlikte bu koruyuculuğun azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Daha önce aynı konsantrasyonlardaki allokriptopinin H_2O_2 ile indüklenen Bax, Bcl-2, Kaspaz-9 ve Kaspaz-3'ü içeren apoptotik yolların inhibisyonunda rol alabileceği gösterilmiş olup (Baran ve diğerleri, 2020), hücre canlılığı üzerindeki koruyucuyu etkisinin bu anti-apoptotik aktivitesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Diğer yandan, artan allokriptopin konsantrasyonu ile nörokoruyucu etkinin azaldığı ve 150 $\mu\text{g/mL}$ allokriptopinin hücre ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir. Bu durum tek başına allokriptopin uygulanan hücrelerdeki yüzde canlılık oranı ile paralellik göstermekte olup, allokriptopin uygulamalarının H_2O_2 muamelesi ile birleşince bir miktar sinerjik etkiye neden olduğu ortaya konmuştur. İzokinolin grubu bir alkaloid olan berberinin de benzer şekilde düşük dozları ile nörokoruyucu, yüksek dozları ile ise nörotoksisite gösteren hormetik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiş olup, bu etkiye MAPK/ERK1/2, PI3K/AKT gibi hücre sağ kalımı ile ve Nrf2/ARE/HO-1 gibi antioksidan sistem ile ilişkili sinyal yollar üzerindeki farklı konsantrasyon yanıtlarının neden olduğu vurgulanmıştır (Bao ve diğerleri, 2015; Calabrese, 2018; Zhang ve diğerleri, 2017). Hormetik etki aslında etken maddenin düşük dozu ile uyarıma/inhibisyona, yüksek dozu ile ise inhibisyona/ uyarıma neden olduğu iki fazlı bir doz yanıtına sahip olması durumudur ve son yıllarda özellikle toksikolojik çalışmalarda önem kazanmaya başlamıştır (Calabrese ve diğerleri, 2015). Allokriptopinin oksidatif stres merkezli AH'de ilaç etken maddesi olabilme potansiyelin araştırıldığı bu çalışmada, allokriptopinin de hormetik aktivite gösterdiği ve toksisiteye neden olan ikincil konsantrasyon yanıtında 150 $\mu\text{g/mL}$ 'nin kritik role sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu durum galantamin gibi allokriptopinin de canlılık ve antioksidan mekanizma ile ilişkili yollar

üzerinde iki fazlı etkinliğe sahip olabileceğini ve bunun ileri düzey moleküler teknikler ile aydınlatılması gerektiğini düşündürmektedir.

Oksidatif stresin neden olduğu makro moleküller değişikliklerden biri lipit peroksidasyonudur (Nunomura ve diğerleri, 2001). Lipitler, hücrel sinyalleşme, enerji dengesi, kan-beyin bariyer geçirgenliği ve iltihaplanma ile yakından ilişkili moleküllerdir. Buna karşın oksidatif olarak hasar görmüş lipitlerin hücre ve organel membranlarında yapısal hasara ve peroksidasyon ürünlerinin üretimine neden olarak, yüksek nörotoksiteleri sebebiyle AH patolojisine katkı sağladığı bilinmektedir (Chew ve diğerleri, 2020). Bu sebepten allokriptopin ön muamelesi sonrası H_2O_2 ile oksidatif strese indüklenen fPC12 hücrelerinde lipit peroksidasyon düzeyindeki değişiminin belirlenmesi amaçlanmıştır. H_2O_2 'ye maruz bırakılan fPC12 hücrelerinde MDA düzeyinin neredeyse %60 oranında arttığı gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Literatürdeki farklı çalışmalarda da 200 μM H_2O_2 'nin MDA düzeyini %45-72 oranında artırdığı raporlanmıştır (Gao ve diğerleri, 2012; Hong ve Liu, 2007; Liang ve diğerleri, 2016; Zheng ve diğerleri, 2014). Lipit peroksidasyonun son ürünü olan MDA aynı zamanda bir oksidatif stres belirtecidir (Bao ve diğerleri, 2017) ve literatür ile uyumlu olan bulgularımız, hem 200 μM H_2O_2 'nin fPC12 hücrelerinde oksidatif strese bağlı lipit peroksidasyonun oluşumuna neden olduğunu, hem de oksidatif strese indüklenmiş AH hücrel modelinin başarılı bir şekilde oluşturulduğunu göstermektedir. Sonuçlar ile ayrıca, allokriptopin ön muamelesinin H_2O_2 'ye bağlı MDA düzeyindeki artışı konsantrasyona bağlı bir şekilde %4-41 oranlarında engellediği tespit edilmiştir ($p<0,05$). En etkili koruma ise 120 $\mu g/mL$ allokriptopinde gözlemlenmiştir. Allokriptopinin oksidatif stres nedeniyle fPC12 hücrelerinde oluşan lipit peroksidasyonuna karşı koruyucu etki göstererek, lipit peroksidasyon artışını büyük oranda önlediği ortaya konulmuştur. Tek başına allokriptopin uygulamalarında ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 120 $\mu g/mL$ 'nin lipit peroksidasyon düzeyinde artışa neden olmaması, tek başına oksidatif stres yaratmadığını ve bu konsantrasyonun güvenli bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir. Buna karşın, hem 150 $\mu g/mL$ allokriptopin ön muamelesi sonrasında oksidatif strese indüklenen, hem de tek başına 150 $\mu g/mL$ uygulanan hücrelerin MDA düzeyinde artış tespit edilmiş olmak ile birlikte, bunun çok yüksek bir artış olmadığı belirlenmiştir. Lipit peroksidasyon oluşumunu engelleyen biyolojik aktiviteye sahip bazı bileşiklerin singlet oksijenleri temizleyerek, peroksit veya radikal ara ürün oluşumunu engelleyerek ve/veya oluşan ara ürünleri daha az sitotoksik bir bileşiğe indirgeyerek MDA düzeyini baskılayabileceği ortaya konulmuştur (Gaschlera ve Stockwellb, 2016; Kim ve Kim, 2018).

Allokriptopinin lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisinin de bu aktivitelerden bir veya birkaçı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Öte yandan, 150 µg/mL allokriptopinin lipid peroksidasyonu üzerindeki etkisinin, hücre canlılık çalışmasında tespit edilen ve bu konsantrasyonun hormetik etkisinden kaynaklanabileceği düşünülen hücre ölümü ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Literatürde berberin, protopin, palmatin ve jatrorrhizin gibi izokinolin grubu alkaloidlerin artan MDA düzeyini baskılayabildiğine dair çalışmalar mevcuttur (Luo ve diğerleri, 2011; Mojarad ve Roghani, 2014; Tang ve diğerleri, 2021). Ancak, allokriptopin etkisinin araştırıldığı ve en etkili konsantrasyonunun belirlendiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sebepten bulgularımız, allokriptopinin nöral hücrelerde oksidatif stres nedeniyle artan lipid peroksidasyonu üzerindeki koruyucu etkisinin ortaya konulduğu ilk çalışma olma niteliğine sahiptir.

ROS'un doğrudan veya peroksidasyon ürünleri aracılığı ile hücre içerisindeki toplam oksidanların seviyesini (TOS) artırdığı bilinmektedir (Altunkılıç, 2010). Artan oksidanlar, oksidasyon-redüksiyon dengesizliğine ve neticesinde AH'de merkezi rol oynayan oksidatif strese neden olmaktadır (Benhar, 2020; Devi ve Syad, 2014; Singh ve diğerleri, 2019). H₂O₂ iyi bilinen bir oksidandır ve redoksa duyarlı sistein kalıntılarının oksidasyonuna neden olarak, sinyalleşme kaskadlarını negatif olarak düzenleyen fosfatazların geri dönüşümlü inhibisyonuna yol açtığı ve böylelikle hücrelerdeki TOS'un artmasına neden olduğu bilinmektedir (Gough ve Cotter, 2011). Farklı çalışmalarda H₂O₂ nedeniyle artan TOS'un oksidan-antioksidan dengesinin bozulması yoluyla oksidatif stresin ve oksidatif stres ile ilişkili hücresel nörodejeneratif süreçlerin artmasına neden olduğu ortaya konulmuştur (Alvariño ve diğerleri, 2017; Küçükgül, 2016). Allokriptopinin fPC12 hücrelerindeki H₂O₂ ile artan TOS üzerinde de koruyucu etkiye sahip olabileceği ve oksidan seviyesini koruyarak lipid peroksidasyonunu engellemiş olabileceği düşünülmüştür. Bu sebepten allokriptopin ön muamelesinin H₂O₂ ile indüklenen fPC12 hücrelerinin TOS seviyesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Sonuçlar 200 µM H₂O₂ ile fPC12 hücrelerindeki TOS seviyesini %85 oranında belirgin bir şekilde arttığını göstermektedir ($p<0,05$). Lin ve arkadaşları tarafından PC12 hücreleri ile gerçekleştirilen bir çalışmada 24 saat boyunca 150 µM H₂O₂ ile artan TOS seviyesinin hücresel bir ölüm yolağı olan apoptozun indüklenmesi ile yakından ilişkili olduğunu belirtilmiştir (Lin ve diğerleri, 2016). Bu durum tez çalışmasındaki 200 µM H₂O₂ uygulaması ile oluşturulan AH modelinin hücre içi TOS seviyesindeki artış ile indüklenen

apoptotik ölüm yolağının aktivasyonu neticesinde nöral hücrelölümüne neden olduğunu ve oksidatif stres modelinin başarılı bir şekilde oluşturulduğunu düşündürmektedir. Hücre canlılığı bulgularının tartışmasında da belirtildiği üzere, önceki çalışmamızda 24 saatlik 200 μM H_2O_2 uygulaması ile Bax, Bcl-2, Kaspaz-9 ve -3'ü içeren apoptotik ölüm yolağının aktive olduğunu raporlanmıştır (Baran ve diğerleri, 2020). Birlikte ele alındığında sonuçlar PC12 hücrelerinin canlılığındaki azalışa 200 μM H_2O_2 ile artan TOS'un aracılık ettiğini destekler niteliktedir. Buna karşı allokrriptopin ön muamelesi sonrası H_2O_2 ile oksidatif strese indüklenen hücrelerde, tüm konsantrasyonların H_2O_2 ile indüklenen TOS seviyesindeki artışı ciddi bir şekilde baskıladığı ve hatta TOS seviyesini kontrol düzeylerine kadar indirdiği belirlenmiştir ($p<0,05$). Bazı moleküllerin oksidan oluşumunu elimine etmek için elektronları kabul ederek veya bağışlayarak serbest radikalleri nötralize edebildiği bilinmektedir (Querobino ve diğerleri, 2018). Serbest radikallerin süpürülmesinin yapı-aktivite düzeyinde değerlendirildiği Račková ve arkadaşlarının çalışmasında bir izokinolin grubu alkaloidi olan ve kimyasal yapı bakımından allokrriptopine benzeyen berberinin, polisiklik yapısı sayesinde redoks reaksiyonlarına (oksidasyon-redüksiyon) katılabileceği raporlanmıştır (Račková ve diğerleri, 2004). Allokrriptopinin TOS baskılayıcı aktivitesinin serbest radikallerin nörolizasyonu aracılığıyla gerçekleşebileceği ve nörolizasyonun yapısındaki çoklu polisiklik halkalar sayesinde katılabileceği redoks reaksiyonları ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Oksidanların karbon-karbon çift bağ içeren lipidlerin çoklu doymamış yağ asitlerine saldırdığı bir süreç olarak tanımlanan lipid peroksidasyonun inhibisyonu ile TOS'un yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (Cobley ve diğerleri, 2018; Sirin ve diğerleri, 2021). Bu tez çalışmasındaki sonuçlar da artan MDA ve TOS'un allokrriptopin ön muamelesi sonrası baskılanması arasında istatistiksel olarak güçlü ve anlamlı bir ilişki olduğunu göstermektedir ($r=0,553$, $p<0,01$). Bu durum allokrriptopinin H_2O_2 'nin neden olduğu hücre içi oksidan oluşumunu engelleyerek, oksidatif stresin baskılanmasını sağlayabileceğini böylelikle oksidatif stres nedeniyle artan lipid peroksidasyonuna karşı fPC12 hücrelerini koruduğunu düşündürmektedir. Diğer yandan daha önce hücre canlılığı çalışması ile 150 $\mu\text{g/mL}$ allokrriptopinin kısmi ölümcül etkisinin olduğu belirlenmiş olup, bu konsantrasyon ile H_2O_2 tarafından artırılan TOS'un baskılanması allokrriptopinin ölümcül etkisinin oksidan artışı ve oksidatif stres ile gerçekleşmediğini göstermektedir. Allokrriptopinin TOS üzerindeki etkisine dair daha önce hiçbir çalışma yapılmamış olup, allokrriptopin ön muamelesinin oksidatif strese indüklenmiş fPC12 hücrelerindeki TOS seviyesinin artışına karşı koruyucu etki gösterdiği ilk kez bu tez çalışması ile ortaya konmuştur.

Serbest radikal ve oksidanların oluşumunu geciktiren, azaltan veya tamamen engelleyen ana mekanizma antioksidan savunma sistemidir (Ali ve diğerleri, 2020). Bu sebepten ROS üretimine bağlı TOS'daki artışın yanı sıra, antioksidan sistemdeki bozukluklar da oksidatif strese neden olmaktadır ve bu durum AH patolojisinin başlıca nedenlerinden biri olarak görülmektedir (Chen ve diğerleri, 2012; Liu ve diğerleri, 2017c). Öyle ki, yapılan bir çalışmada hastalığın tüm evrelerinde AH'li bireylerdeki TAS'ın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında oldukça ciddi ve anlamlı bir oranda düştüğü raporlanmıştır (Moslemnezhad ve diğerleri, 2016). Öte yandan, PC12 hücrelerindeki H_2O_2 uygulamalarının da TAS'ın önemli şekilde baskılanmasına neden olduğu (Küçükgül, 2016; Song ve diğerleri, 2018) ve allokriptopinin olmasa da izokinolin grubu alkaloidlerin nöral sistemlerdeki antioksidan mekanizmalarını aktifleştirerek, oksidasyon oranını azaltabildikleri bilinmektedir. Bu sebepten tez kapsamında TOS seviyesinin yanı sıra, allokriptopin ön muamelesinin H_2O_2 ile indüklenen fPC12 hücrelerindeki TAS seviyesi üzerindeki etkisi de çalışılmıştır. Literatür ile paralel olarak, 200 μM H_2O_2 ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde TAS'ın %45 oranında azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, TAS'daki bu önemli düşüş, H_2O_2 'nin antioksidan mekanizmayı etkileyerek de TOS'un artmasına neden olabileceğini ve oksidatif hasarı tetikleyebileceğini işaret etmektedir. Literatürde öngörüldüğü gibi bu çalışmada da TAS'ın düşmesi oksidatif strese bağlı AH modelinin oluşturulduğunu göstermiştir (Şirin, 2021). Buna karşın, allokriptopin ön muamelesi sonrası H_2O_2 'ye maruz bırakılan hücrelerde, artan konsantrasyonlardaki allokriptopinin fPC12 hücrelerindeki TAS'ı H_2O_2 hasarından koruduğu gözlemlenmiştir ($p<0,05$). 120 $\mu g/mL$ allokriptopin uygulamasının H_2O_2 hasarına karşı %158 oranında koruyuculuk ile en yüksek koruyucu etkiyi gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,05$). Diğer yandan 150 $\mu g/mL$ konsantrasyonun ise H_2O_2 ile baskılanan TAS üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. TOS seviyesindeki ölçümlerde, 150 $\mu g/mL$ 'nin H_2O_2 nedeniyle artan TOS'u baskılamış olması bu konsantrasyondaki ölümcül etkinin oksidatif hasar yolu ile olmadığını düşündürmüş olmak ile birlikte, TAS sonuçları bu etkinin antioksidan mekanizmanın baskılanması ile olabileceğinin bir göstergesi olabilir.

Diğer yandan literatürdeki bazı yapı-aktivite çalışmalarında, bitkisel sekonder metabolitlerin kimyasal yapısı ile antioksidan aktiviteleri arasında yakın ve son derece tutarlı bir ilişki olduğu ortaya konulmuştur. Bu kapsamda terpenlerin yapısındaki konjuge çift bağların ve flavonoidlerin yapısındaki serbest C–H bağlarının antioksidan aktiviteye aracılık edebileceğini belirtilmiştir (Vo ve diğerleri, 2019; Wojtunik-Kulesza ve diğerleri, 2018).

Diğer yandan Xiao ve arkadaşları tarafından allokriptopin gibi bir izokinolin grubu alkaloid olan protopinin antioksidan aktivitesi benzodioksol ve pirokatekol gruplarına atfedilmiştir (Xiao ve diğerleri, 2008). Bu nedenle allokriptopin antioksidan aktivitesinin de yapısındaki konjuge çift ve serbest C–H bağlarını ve benzodioksol ve pirokatekol halkalarına dayandığı düşünülmektedir. Sonuçlar H_2O_2 ile indüklenerek baskılanan TAS'ın allokriptopin tarafında artırılabilirliğini ve bu sayede antioksidan sisteme katkı sağlayabileceğini göstermektedir. Ayrıca TOS ve TAS sonuçlarını birlikte elen alan OSI, allokriptopin tüm konsantrasyonlarının fPC12 hücrelerini H_2O_2 'in neden olduğu oksidatif strese karşı neredeyse tamamen koruyabileceğini, tek başına allokriptopin uygulamalarının ise OSI artışına neden olmadığını göstermektedir.

SOD, KAT ve GPx enzimlerinin oksidatif strese karşı birincil savunma hattındaki temel antioksidan elemanlar olması nedeniyle TAS'a en çok katkıyı sağlayabilecekleri düşünülmektedir (Ighodaro ve Akinloye, 2018). Bu sebepten tez çalışmasında, allokriptopin H_2O_2 ile indüklenen fPC12 hücrelerindeki antioksidan özelliğinin bu enzimlerin aktivitesinin modülasyonu ile ilişki olup-olmadığı araştırılmıştır. Literatürdeki pek çok farklı çalışma ile H_2O_2 'nin PC12 hücrelerindeki SOD, KAT ve GPx enzimlerinin aktivitesinin azalmasına neden olduğu raporlanmıştır (Bao ve diğerleri, 2017; Xiao ve diğerleri, 2008). Bu çalışmalar ile uyumlu olarak, H_2O_2 uygulamasının fPC12 hücrelerindeki SOD, KAT ve GPx enzim aktivitesini sırasıyla, %55, %49 ve %62 oranlarında baskıladığı ve oksidatif stres modelinin bu açıdan da başarı bir şekilde oluşturulduğu gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Buna karşın, 25-150 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığındaki allokriptopin ön muamelesi ile birlikte H_2O_2 tarafından baskılanan SOD enzim aktivitesinin %11-40 oranlarında, KAT enzim aktivitesinin %10-31 oranlarında ve GPx enzim aktivitesinin ise %27-57 oranlarında korunduğu ortaya konulmuştur. Allokriptopin oksidatif strese karşı SOD, KAT ve GPx enzimlerin aktivitesinin korunmasında etkili olduğu, en yüksek etkiyi ise GPx aktivitesini korunmasında gösterdiği dikkat çekmiştir. GPx'in çok yüksek olmayan ROS seviyelerine karşı ana koruma kaynağı olduğu ve hidrojen peroksite karşı afinitesinin KAT'dan daha fazla olduğu bilinmektedir (Madhavan ve diğerleri, 2006). Bu nedenle allokriptopin ön muamelesi sonrası oksidatif strese indüklenen hücrelerdeki oluşan H_2O_2 'nin detoksifikasyonunda ağırlıklı olarak GPx'in rol alması şaşırtıcı bulunmamıştır. Ancak, GPx H_2O_2 'nin suya dönüştürüldüğü antioksidan aktivitesinin yanı sıra lipid peroksitlerin terminal oksijenine nükleofilik bir saldırı gerçekleştirerek, peroksitlerin alkole indirgenmesini de sağlamaktadır (Gaschler ve Stockwell, 2017; Ighodaro ve Akinloye, 2018;

Su ve diğerkleri, 2019). Allokriptopinin lipit peroksidasyonu üzerindeki koruyucu etkisi ile birlikte değerkendirildiğinde, diğerk antioksidanlara göre daha fazla olan GPx aktivitesindeki artışın 200 μM H_2O_2 nedeniyle oluşan lipit peroksitlerin indirgenmesi ile de ilişkili olabileceğı düşünölmektedir. Allokriptopin ön muamelesi sonrası artan GPx aktivitesi ile azalan MDA düzeyi arasında negatif yönlü güçlü bir korelasyon olduğı tespit edilmiş olup ($r=-0,92$, $p<0,01$), bu durum GPx aktivitesindeki artışın lipit peroksidasyonun baskılanması ile ilişkili olabileceğı düşünseni destekler niteliktedir.

Diğerk yandan allokriptopinin üç antioksidan enzimin aktivitesi üzerindeki etkisi TAS bulguları ile birlikte ele alındığında, 120 $\mu\text{g/mL}$ allokriptopinin antioksidan seviyenin ve enzimlerin aktivitesinin korunmasında en etkili konsantrasyon olduğı görölmektedir. ($p<0,05$). Palmatin, berberin, protopin gibi pek çok izokinolin grubu alkaloidin de antioksidan enzimlerin aktivitesini artırdığı bilinmektedir (Chen ve diğerkleri, 2020; Tang ve diğerkleri, 2021; Xiao ve diğerkleri, 2008). Xiao ve arkadaşları tarafından 24 saat boyunca 250 μM H_2O_2 'e maruz kalan PC12 hücreesindeki SOD, KAT ve GPx enzimlerinin aktivitesinin sırası ile %27, %36 ve %24'ye düştüğü, protopin ön muamele ile (0,5-50 μM) ise bu oranların sırasıyla en fazla %50, %60 ve %55'lere kadar arttırıldı bildirilmiştir (Xiao ve diğerkleri, 2008). Bir başka izokinolin alkaloidi olan jatrorrhizin (0,01 μM) ile yapılan çalışmada ise 24 saatlik uygulamanın ardında SOD aktivitesinin H_2O_2 'ye göre yaklaşık %42 oranında arttığı gösterilmiştir (Luo ve diğerkleri, 2011). Bu çalışmalardaki en düşük jatrorrhizin ve protopin konsantrasyonlarının çalışmamızdaki en yüksek allokriptopin konsantrasyonunun neredeyse 3,5 ve 16 katı olması buna karşın antioksidan aktivite bakımından yakın olmaları, allokriptopinin fPC12 hücrelerindeki antioksidan enzimlerin aktivitesinin artırılmasında daha etkin olabileceğini göstermektedir.

Ayrıca, pearson korelasyon analiz sonuçlarına göre allokriptopinin antioksidan enzimlerin aktivitesi üzerindeki etkisi ile TAS üzerindeki etkisi arasında 0,01 düzeyinde anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($r=0,60$, 0,66 ve 0,74, sırasıyla). TAS sonuçlarında 100 ve 120 $\mu\text{g/mL}$ allokriptopin uygulamasının kontrol grubunun da üzerinde olduğı gözlemlenmişti, enzim aktivite çalışmalarında ise oksidatif strese karşı konsantrasyona bağılı olarak koruma oluşturulduğunu ancak koruyuculuğun %100 olmadığını ortaya konulmuştur. Artan TAS'a SOD, KAT ve GPx dışında glutatyon S-transferazlar ve tioredoksin redüktazlar gibi diğerk enzimatik veya melatonin, karotenoidler, vitamin A, C ve E gibi enzimatik olmayan antioksidanların da katkı sağladığı bilinmektedir (Niedzielska ve diğerkleri, 2016). Bu

sebepten allokrriptopin ön muamelesinin bu üç enzim (SOD, KAT ve GPx) dışındaki antioksidanlar aracılığıyla da oksidatif stres ile inhibe edilen TAS'a katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Bunun yanı sıra, allokrriptopin oksidatif strese uğratılmamış normal nöronal hücreler üzerindeki etkisinin de belirlenebilmesi amacıyla uygulanan en yüksek iki allokrriptopin konsantrasyonu olan 120 ve 150 µg/mL'nin SOD, KAT ve GPx enzimlerinin aktivitesini üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Tek başına allokrriptopin uygulamalarında 120 µg/mL allokrriptopin fPC12 hücrelerindeki SOD, KAT ve GPx enzimlerinin aktivitesi üzerinde dikkate değer olumsuz bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. Ancak, 150 µg/mL allokrriptopin oksidatif strese indüklenen gruplardaki gibi enzimlerin aktivitesinin azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu azalışın SOD için %22 oranında, KAT için %17 oranında, GPx için ise %15 oranında olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Hem oksidatif strese indüklenen hem de indüklenmeyen fPC12 hücrelerindeki antioksidan enzimlerin aktivitesi incelendiğinde 150 µg/mL allokrriptopin H_2O_2 'ye göre enzimlerin aktivitesini koruyabileceği düşünülse de, bu etkinin 120 µg/mL ile karşılaştırıldığında her üç enzim içinde aktivite azalışa neden olduğu görülmektedir. Allokrriptopin antioksidan enzimler üzerinde de bifazik konsantrasyon yanıtına sahip olduğunu ve bifazik etkide 150 µg/mL'nin kritik konsantrasyon olduğunu destekleyen bu gözlem 150 µg/mL allokrriptopin ile saptanan etkinin oksidatif stres baskılayıcı/antioksidan aktivitesinden ziyade sitotoksositeye yol açan hormetik etkisi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Querobino ve diğerleri, 2018). Sonuç olarak, H_2O_2 nedeniyle azalan SOD, KAT ve GPx enzimlerinin aktivitesini koruyarak, TAS'ın artmasına katkı sağlayan allokrriptopin, konsantrasyona bağlı olarak oksidatif strese karşı güçlü bir antioksidan ajan olabileceği ortaya konulmuş olup, allokrriptopin nörokoruyucu etkisinin antioksidan aktivite düzeyi ile ilişkilendirilerek araştırıldığı bu çalışma literatürde bir ilk olma özelliğine de sahiptir.

AH'deki bilişsel bozukluklar ile ilişkili semptomların esas olarak kolinerjik sistemdeki işlev kayıplarından kaynaklandığına dair pek çok kanıt bulunmaktadır (Aykac ve diğerleri, 2019; Eldufani ve Blaise, 2019). Kolinerjik iletimin sürdürülmesi ve sonlandırılmasında önemli role sahip olan AChE enzim aktivitesinin oksidatif stres gibi etkenler tarafından artırılması, sistemdeki bu işlev kayıplarının başlıca nedenlerinden biridir (Stanciu ve diğerleri, 2020). Bu nedenle AChE aktivitesinin inhibisyonu terapötik bir hedef olarak görülmektedir ve

linik olarak kullanılmakta olan ajanların büyük bir kısmı AChE inhibitörleridir (Marasco, 2020). Bu inhibitörlerden biri olan ve güçlü AChE inhibisyon kapasitesinin yanı sıra, yüksek oral emilimi sayesinde diğer AChE inhibitörlerinden ayrılan galantamin bir izokinolin grubu bir alkaloididir (Korabecny ve diğerleri, 2015; Pinho ve diğerleri, 2013). Galantaminin yanı sıra pek çok izokinolin grubu alkaloidin kimyasal yapısı sayesinde AChE inhibe edici aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Konrath ve diğerleri, 2013). Allokriptopin de bu alkaloidlerden biridir. Literatürde allokriptopinin *in-vitro* AChE aktivitesi üzerindeki etkinliğinin araştırıldığı iki farklı çalışma bulunmaktadır. İki çalışmada da allokriptopinin AChE aktivitesini inhibe ettiği raporlanmış olup, bu çalışmalar Ellman yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalardan ilki, sağlıklı insan kan hücrelerindeki AChE aktivitesinin allokriptopin tarafından inhibe edildiğini bildiren Siatka ve arkadaşlarının çalışmasıdır. Çalışmada allokriptopinin AChE inhibisyonundaki IC₅₀ değeri 250 µM olarak belirlenmiştir (Siatka vd., 2017). Orhan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise allokriptopinin AChE enzim aktivitesini *in-vitro* olarak %89 oranında inhibe ettiği raporlanmıştır (Orhan ve Şener, 2006). Yalnızca Ellman yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışmalar ile allokriptopinin AChE inhibitörü olabilme potansiyeline ışık tutulmuş olunmasına rağmen çalışmalar allokriptopinin nöral kültür ve/veya hastalık modeli üzerindeki etkisini yansıtmamaktadır. Dolayısıyla, bulgular ön çalışma niteliğinde kalmış olup, bu çalışmalar ile AH metabolizmasındaki rolü tam olarak ortaya konulamamıştır. Bu sebepten allokriptopinin AChE enzimi üzerindeki koruyucu etkisinin H₂O₂ ile indüklenen fPC12 hücrelerinde araştırılması hedeflenmiştir. Literatürdeki bileşiklerin AChE üzerindeki etkisini tespit etmeyi amaçlayan çalışmaların çoğu enzimatik aktivite tayinine dayanmaktadır. Ancak, bazı yazarlar aktivite ve ifade düzeyinin her zaman aynı yönde değişim göstermeyebileceğini, bundan dolayı AChE üzerindeki etkinin ifade düzeyinde de belirlenmesi gerektiğini vurgulamaktadır (Garcimartín ve diğerleri, 2017; Molochkina ve diğerleri, 2005). Bu nedenle allokriptopin ön muamelesi sonrasında H₂O₂ ile indüklenen fPC12 hücrelerinin AChE aktivite düzeyindeki değişim Elman metodu ile, gen ve protein ifade düzeyindeki değişimler ise sırasıyla qRT-PZR ve Western blot hibridizasyon teknikleri ile belirlenmiştir.

Uzun yıllardır H₂O₂ ile oksidatif strese uğratan hücrelerde AChE aktivitesinin arttığı bilinmekte olup, buna lipid peroksidasyonu ile tetiklenen membran modifikasyonlarının neden olduğu düşünülmektedir (Garcimartín ve diğerleri, 2017; Jiang ve diğerleri, 2007; Koçancı, 2018; Molochkina ve diğerleri, 2005). Bununla uyumlu olarak 200 µM H₂O₂ ile

muamele edilen fPC12 hücrelerindeki AChE aktivitesinin kontrol ile karşılaştırıldığında yaklaşık %20 oranında, gen ifadesinin yaklaşık 2,1 kat, protein ifadesinin ise 1,7 kat arttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Yapılan korelasyon analizi de AChE aktivitesi, gen ve protein ifadesindeki artış ile MDA ($r=0,47$, $0,89$ ve $0,83$, sırasıyla), TOS ($r=0,93$, $0,84$ ve $0,68$, sırasıyla) ve OSI ($r=0,91$, $0,88$ ve $0,70$, sırasıyla) değerlerindeki artış arasında pozitif yönlü ve anlamlı bir ilişki olduğunu göstermekte olup ($p<0,05$ ve $p<0,01$), bu çalışma ile de H_2O_2 ile indüklenen oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu tarafından AChE aktivite ve ifade düzeylerinin arttığı ortaya konulmuştur. Bu durum ayrıca fPC12 hücrelerinde oksidatif stres ile indüklenen kolinerjik hasar modelinin başarılı bir şekilde oluşturulduğunu göstermektedir. Diğer yandan allokriptopin ön muamelesi ile H_2O_2 ile indüklenen AChE aktivasyonunun %19-48 oranları arasında inhibe edildiği tespit edilmiştir. Aktivite çalışmalarıyla paralel olarak, allokriptopin ön muamelesi ile konsantrasyona bağımlı bir şekilde AChE mRNA ifade düzeyinin 1,8-1'e kadar, protein ifade düzeyinin ise 1,4-1'e kadar baskılandığı saptanmıştır ($p<0,05$). $200 \mu M$ H_2O_2 ile indüklenen fPC12 hücrelerindeki AChE artışının allokriptopin tarafından hem aktivite hem de ifade düzeyinde inhibe edildiğini gösteren bu bulgular arasında da pozitif yönlü güçlü ve $0,01$ düzeyinde anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir.

G.corniculatum ekstratlarının H_2O_2 ile indüklenen fPC12 hücrelerindeki AChE aktivitesi, gen ve protein ifadesi üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, en yüksek allokriptopinin içeriğinin saptandığı metanol ekstraktının en yüksek AChE inhibisyonunu sağladığı ve bu etkinin allokriptopine atfedilebileceği raporlanmıştır (Koçancı, 2018). Sonuçlarımız allokriptopinin H_2O_2 ile oksidatif strese indüklenen fPC12 hücrelerindeki artan AChE aktivitesini iyi düzeyde inhibe edebileceğini destekler niteliktedir. Diğer yandan, Venkatesan ve arkadaşları tarafında nöral iletişim ve korunumdan sorunlu olan kolinerjik iletim ile antioksidan enzimleri arasında yakın bir ilişki olduğu ve bu ilişkinin hücrelölümde önemli bir role sahip olduğu belirtilmiştir (Venkatesan ve diğerleri, 2016). Bu tez çalışması kapsamındaki sonuçlar karşılaştırıldığında da, allokriptopin tarafından AChE inhibisyonu düzeyleri ile TAS ve antioksidan enzim aktivitelerinin korunması arasında negatif yönlü ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$ ve $p<0,01$).

Hem AChE aktivite hem de gen ve protein ifade sonuçlarında artan allokriptopin konsantrasyonuyla paralel olarak enzimin inhibisyon oranının da arttığı belirlenmiştir.

Ancak özellikle 150 µg/mL allokriptopin uygulamasının AChE'yi üç çalışmada da kontrol grubuna veya kontrol grubunun altına düşürdüğü gözlemlenmiştir. AChE enzimi kolinerjik iletimdeki kritik rolünün yanı sıra tümör baskılanması, hücre adezyonu ve göçü gibi diğer fizyolojik işlevlerde de rol almaktadır (Koçancı ve Aslim, 2016). Bu sebepten aktivitesindeki aşırı baskılanmasının normal hücresel süreçleri de olumsuz etkileyebileceği düşünülmektedir olup, AChE'nin aşırı artışının yanı sıra azalışı da toksisite ile ilişkilendirilmektedir (Abolaji ve diğerleri, 2020). Hücre canlılık ve antioksidan çalışmaları göz önüne alındığında, 150 µg/mL allokriptopin ön muamelesi sonrası H₂O₂ ile indüklenen fPC12 hücrelerindeki AChE inhibisyonunun bu konsantrasyondaki bifazik etkiden kaynaklanabileceği, bu sebepten 150 µg/mL'nin yüksek inhibisyon gösteren konsantrasyon olarak kabul edilmesinin yanıltıcı olabileceğine inanılmaktadır. Bu neden ile AChE inhibisyonu için 120 µg/mL'nin en uygun ve etkili konsantrasyon olduğu düşünülmektedir.

Öte yandan, yalnızca allokriptopin fPC12 hücrelerindeki AChE protein ifadesi üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi amacıyla tek başına allokriptopin uygulanan hücrelerde 120 µg/mL allokriptopin fPC12 hücrelerinde herhangi bir olumsuz etkiye neden olmadığı, ancak 150 µg/mL allokriptopin AChE ifadesinin 1,2'ye yükselttiği belirlenmiş olup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu artış anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). AChE'nin aktivitesinde oksidatif stresin düzenlenmesinin rol oynadığı bilinmektedir (Rodríguez-Fuentes ve diğerleri, 2015). Bu kapsamda 150 µg/mL allokriptopin neden olduğu AChE ifadesindeki artışın hücre canlılığı, TAS ve antioksidan enzimlerin aktivitesindeki düşüşe ve MDA ve TOS düzeylerindeki artışa neden olan hormetik etkisi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. *İn-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarda oksidatif stres ile indüklenen apoptotik hücrelerdeki AChE düzeylerinin arttığına dair, tahminlerimizi destekler nitelikte raporlar bulunmaktadır (Koçancı ve Aslim, 2016).

Oksidatif stres moleküler ve biyokimyasal değişikliklerin yanı sıra nöronal morfolojik hasarın oluşumunda da rol almaktadır (Tusi ve diğerleri, 2012; Xiong ve diğerleri, 2016). Oksidatif strese maruz kalan nöronal hücrelerde, hücresel uyarılabilirliğin, sinaptik plastisitenin, dallanmanın, aksonal ve dendritik büyümenin bozulduğu bilinmektedir (Ashabi ve diğerleri, 2013; Tusi ve diğerleri, 2012). Normal nöronal gelişiminin olmaması ise, aynı zaman da normal nöronal iletişimin oluşturulması ve sürdürmek için önemli olan molekül veya proteinlerin daha da işlevsiz hale gelmesine neden olan kısır bir döngüyü beraberinde getirmektedir ve nihayetinde nöral hücresel ölüm ile sonuçlanmaktadır (Benussi

ve diğerleri, 2017; Cohen-Cory ve diğerleri, 2010). Öte yandan uygun şartlar sağlandığı takdirde nöronların morfolojik hasara karşı da korunabildiği bilinmektedir. Bu süreç hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, nöronal genlerin ve proteinlerin ekspresyonunu içeren karmaşık hücresel aktiviteler yoluyla gerçekleşmektedir (Higgins ve diğerleri, 2013). Nörotrofik maddeler, bu aktiviteleri ile nöronal hücrelerde nörit oluşumunu uyararak ve destekleyerek, nöronal hasarların tedavisinde terapötik etkinlik vadetmektedir (Ye ve diğerleri, 2012). Literatürde de pek çok bitkisel bileşiğin nörotrofik madde olma potansiyeli araştırılmıştır (Mitchell ve diğerleri, 2007). Ancak, allokrriptopinin oksidatif hasar üzerindeki etkisinin hücre morfolojisi ile ilişkilendirilerek ortaya konulduğu herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sebepten, allokrriptopinin oksidatif hasara bağlı nörodejeneratif bozukluklar için koruyucu veya yavaşlatıcı yeni bir ajan olabilme potansiyelinin morfolojik olarak da belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç ile uygulama yapılan fPC12 hücreleri hücre çapı, nörit uzunluğu ve dallanma miktarı açısından morfolojik olarak takip edilip, incelenmiştir. Ölçümler sonucunda 200 μM H_2O_2 'ye maruz kalan fPC12 hücrelerinde, hücre çapının %15 oranında arttığı, buna karşın nörit uzunluğu ve dallanma miktarının sırasıyla %40 ve %38 oranında azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Literatürdeki diğer çalışmalarda da H_2O_2 ile oksidatif strese indüklenmiş PC12 hücrelerinde, hücre genişliği ve polaritesindeki artış ile birlikte nörit uzunluğundaki azalışın nöral hasarın göstergelerinden biri olduğunu bildirilmiştir (Ashabi ve diğerleri, 2013; Tusi ve diğerleri, 2012; Xiong ve diğerleri, 2016). Bu tür morfolojik değişikliklere ROS nedeniyle oluşan mitokondriyal disfonksiyonun ve enerji sorunlarının aracılık ettiği düşünülmektedir. Aksona doğru olan mitokondriyal trafiğin engellenmesi ile faaliyetlerin hücre gövdesi ile sınırlandırıldığına ve bunun da hem sinaptik dejenerasyonu hem de hücre genişliğini artırabileceğine inanılmaktadır (Beckhauser ve diğerleri, 2016). Bunun yanı sıra, ROS düzeylerindeki artışın hücre ve organel membranlarında geçirgen gözeneklerin açılmasına neden olabildiği bilinmektedir. Bu gözenekler sitozole iyon vb. geçişi nedeniyle bozulan hücre homeostasisinin ile hücre gövdesinin genişliğinin artmasına neden olabilmektedir (Alvariño ve diğerleri, 2017; Lv ve diğerleri, 2017). Bu iki durum nedeniyle meydana gelen nöral morfolojideki değişimler hücresel iletim ve hücreler arası iletişimde bozukluklar neden olmaktadır. Bu tez çalışmasındaki H_2O_2 uygulaması ile fPC12 hücrelerinin gövde çapındaki artma ve nörit uzunluğundaki kısılmanın bu iki duruma bağlı olabileceği düşünülmektedir. Diğer yandan allokrriptopin ön muamelesi ile H_2O_2 nedeniyle artan hücre çapının %4-13 oranında baskılanarak neredeyse kontrol seviyelerine kadar düşürüldüğü tespit edilmiştir. Nörit uzunluğu ve dallanma miktarında ise sırasıyla %5-15 ve %12-30 oranında kayda değer bir

artış saptanmıştır ($p<0,05$). Bu durum allokriptopinin H_2O_2 ile indüklenen mitokondriyal hasarı ve iyon homeostazisindeki bozuklukları hafifletebileceğini veya engelleyerek nöral morfolojiyi koruyabileceğini düşündürmektedir. Öte yandan kolinerjik iletimin nöral korunum ile yakından ilişkili olan Akt sinyal yolağını aktive edebileceği ve bu sayede hem hücre poliferasyonu ve nörotrofik faktör NGF'nin ekspresyonu ile nörit gelişimine katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (Venkatesan ve diğerleri, 2016). Bu kapsamda allokriptopin ön muamelesi ile baskılanan AChE aktivitesi ve artan nörit gelişimi arasından korelasyon olduğu da tespit edilmiştir. Sonuçlar oksidatif stresin neden olduğu nöral morfolojik hasara karşı allokriptopinin nörokoruyucu etkiye sahip olduğunu ve en etkili konsantrasyonun 120 $\mu\text{g/mL}$ olduğunu göstermektedir. Yalnızca allokriptopin uygulamalarıyla ise 120 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ancak, 150 $\mu\text{g/mL}$ uygulanan hücrelerdeki nörit uzunluğunun kontrol grubundan %10 daha az olduğu tespit edilmiştir. 150 $\mu\text{g/mL}$ allokriptopinin neden olduğu nöral morfolojik değişimin AChE protein ifade düzeyindeki artışa, antioksidan enzimlerin aktivitesindeki ve hücre canlılığındaki azalışa neden olan hormetik etkisi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Diğer hücrelerde olduğu gibi fPC12 hücrelerinde de hücre büzülmenin apoptotik ölümün bir göstergesi olduğu raporlanmıştır. 150 $\mu\text{g/mL}$ allokriptopinin uygulaması ile gözlemlenen hücre çapının uzunluğundaki düşüş göz önüne alındığında, bunun hücre büzülmenin bir göstergesi olabileceği ve hücre canlılığı çalışmalarında saptanan hücre ölümüne apoptotik yolların aracılık edebileceği düşünülmektedir. Diğer yandan literatürde allokriptopinin nörotrofik etkisinin değerlendirildiği herhangi bir çalışma bulunmamakta olup, berberin, palmatin gibi izokinolin grubu alkaloidler ile gerçekleştirilen farklı çalışmalarda 0,25-25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki alkaloidlerin fPC12 hücrelerindeki nörit gelişimini %5-40 oranında arttırabileceği raporlanmıştır (Han ve diğerleri, 2012). Ancak, bu tez çalışması kapsamında nöral morfolojik değişimin üzerindeki etkisinin belirlenmesinden ziyade oksidatif strese karşı MDA, TOS, TAS, SOD, KAT, GPx ve AChE gibi çoklu hedefler üzerindeki nörokoruyucu etkisinin araştırılması amaçlandığından tek başına allokriptopin uygulamalarında allokriptopinin en yüksek konsantrasyonları ile çalışılmış olup, bu konsantrasyonlarının fPC12 hücrelerinin gelişimi destekleyecek nörotrofik etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında ayrıca, allokriptopinin AH için ilaç adayı olabilme potansiyelinin ve deneysel olarak çalışılan enzimlerin inhibitör bağlanma alanları ile etkileşiminin *in-siliko* olarak belirlenmesi de amaçlanmıştır. Bu amaç ile bilgisayar destekli moleküler modelleme yaklaşımlarından ve programlarından yararlanılmıştır.

İn-siliko çalışmalar kapsamındaki ligand hazırlama işlemi sonucunda allokriptopinin iki farklı izomerinin olabileceği tespit edilmiş olup (Şekil 4.9), bu iki izomerin de farmakokinetik ve EDMA-T özellikleri yapı bazlı karşılaştırma yöntemleri ile tahmin edilmiştir. Sonuçlar ile her iki izomerin de lipofilik bir yapıya sahip olduğu ortaya konulmuştur. Bu bulgu *in-vitro* çalışmalarda çözücü olarak lipofilik yapıdaki kloroformun kullanılmasını destekler niteliktedir. Ayrıca, Račková ve arkadaşları tarafından lipofilik sekonder metabolitlerin redoks reaksiyonlarına katılabildiği ve yüksek antioksidan aktivite sergilediği raporlanmıştır (Račková ve diğerleri, 2004). Bu tezdeki *in-vitro* çalışmalar ile ortaya konan allokriptopinin TOS'un baskılanması, TAS ve antioksidan enzim aktivitelerinin korunmasındaki etkisinin lipofilik yapısı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

İlaç keşif ve geliştirme çalışmalarındaki başarısızlığının önde gelen nedenlerinden biri toksisite sorunudur. Günümüzde ilaç adaylarının fizikokimyasal özelliklerinin toksikolojik sonuçlara neden olabileceği bilinmektedir. Öyle ki, literatürde toksik etkilere neden olan bazı özel reaktif fonksiyonel gruplar tanımlanmıştır ve ilaç etken madde adayı bileşiklerin yapısında bu fonksiyonel gruplardan en fazla iki tane bulunması önerilmektedir. (Hevener ve Avenue, 2019). Allokriptopinin yapısında ise bu reaktif fonksiyonel gruplardan yalnızca bir keton grubu bulunduğu ortaya konulmuş olup, literatürde bu keton grubunun alkole indirgenebileceğini göstermiştir (Vrba ve diğerleri, 2011). Diğer yandan bir potasyum kanalı olan hERG, kalp kasılmasının ve sinir sistemindeki bazı hücrelerinin fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol almaktadır. HERG K⁺ kanal bloklayıcıları potansiyel olarak toksiktir ve tahmin edilen IC₅₀ değerleri genellikle ilaç keşfinin erken aşamalarında ilaçların toksisite açısından uygun olup-olmadığını ortaya koymaktadır. Bu nedenle allokriptopinin iki izomerinin de QPlogHERG değeri hesaplanmıştır ve ikisinin de toksisite profiline sahip olmadığı gözlemlenmiştir.

Oral olarak kullanımı hedeflenen ilaç adaylarının gastrointestinal sistemden emilerek kan yoluyla, hedef doku ve hücreler mümkün olduğunca verimli bir şekilde ulaşması gerekmektedir (Alavijeh ve diğerleri, 2005; Tsantili-Kakoulidou, 2005). Bu sebepten allokriptopin izomerlerinin insandaki oral emilimi ve bağırsak-kan bariyerinin mimiği olan Caco-2 hücre geçirgenliği tahmin edilmiştir. İki izomerin de insanda sırasıyla %95 ve %96 oranında oral emiliminin gerçekleşebileceği ve saniyede 1203,961 nM (nanomolar) ve 1235,090 nM konsantrasyon ile bağırsak-kan bariyerinden geçebileceği hesaplanmıştır. Zaten protopin ve palmatin gibi diğer izokinolin grubu alkaloidlerin yapıları gereği emilim ve biyoyararlanıma elverişli olduğu bilinmektedir (Ma ve diğerleri, 2009; Zhou ve diğerleri, 2013). Diğer yandan, ratlar ile gerçekleştirilen bir çalışmada oral olarak verilen allokriptopinin kan plazmasında saptandığı raporlanmıştır (Y. J. Huang vd., 2018). Bu durum allokriptopinin oral kullanım ile bağırsaklardan emilerek ve kana taşınabildiğini göstermekte olup, sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

Nörodejeneratif hastalıklara yönelik ilaç geliştirme çalışmalarında bileşiğin kan-beyin bariyerini aşarak, nöral sisteme erişimi de bir diğer önemli husustur (Alavijeh ve diğerleri, 2005). Bu neden ile allokriptopinin beyin/kan partisyon kat sayısının göstergesi olan QPlogBB değeri ve kan beyin bariyerinin iyi bir mimiği olan MDCK değeri hesaplanmıştır. Sonuçlar emilen her iki allokriptopin izomerlerinin de kan-beyin bariyerini geçerek, merkezi sinir sisteminde etkili olabileceğini göstermiştir. Ratlar ile yürütülen farklı *in-vivo* çalışmalarda da oral olarak uygulanan izokinolin grubu alkaloidlerin ve allokriptopin metabolitlerinin uygulama sonrası beyin omurilik sıvısında tespit edildiği raporlanmıştır (Huang ve diğerleri, 2018b; Michaluk-Antkiewicz Lucyna ve Hans, 2013; Tao ve diğerleri, 2013). Bu durum allokriptopinin ratlarda kan-beyin bariyerini geçerek beyne ulaşabildiğini göstermektedir. Literatür verileri ve yapı bazlı karşılaştırma analizlerinin sonucu göz önüne alındığında her iki allokriptopin izomerinin de farmakokinetik ve ilaç-benzerliği açısından AH için ilaç adayı olmaya uygun olduğu görülmektedir.

İlaç keşif ve geliştirme çalışmalarında, etken madde ile hedeflenen biyolojik makromoleküllerin arasındaki bağlanma durumunun ve kararlılığının belirlenmesi, etkileşim mekanizmalarının anlaşılabilmesi ve terapötik stratejilerin şekillendirilebilmesi için çok önemlidir. Ancak, deneysel yöntemler zorlukları ve ekonomik maliyeti nedeniyle, varsayılan bağlanma modlarının ve kararlılığının tahmininde daha çok zaman ve bütçe gereksinimine neden olmaktadır. Bu nedenle, makromolekül yapılarına bağlı olarak, daha kısa sürede

binlerce olası birlikteliğin denendiği ve değerlendirildiği moleküler kenetlenme ve MD simülasyon gibi hesaplamalı etkileşim tahmin yöntemlerinin kullanımı giderek artmaktadır (Bisht ve Singh, 2018; Ou-Yang ve diğerleri, 2012). Bu tez çalışmasında da allokrriptopinin hem SOD, KAT, GPx ve AChE enzimleri üzerindeki inhibitör etkisine aracılık eden etkileşim türlerinin ve bu etkileşime bağlı olası pro-oksidan ve anti-AChE özellikleri bilgisayar destekli moleküler modelleme ve moleküler simülasyon teknikleri ile araştırılmıştır. Bu amaçla ligand hazırlama işlemi sonucu elde edilen allokrriptopine ait iki izomerin de dört enzimin için literatürde belirlenmiş olan inhibitör bağlanma bölgeleri ile öncelikle kenetlenme durumu ve afinite hesaplanmıştır. Daha sonrasında ise MD simülasyonları bu kenetlenme durumunun stabilitesi incelenmiştir.

SOD enzimi için gerçekleştirilen moleküler kenetlenme çalışmaları, inhibitör bağlanma alanı ile allokrriptopinin yalnızca S izomerinin -2,07 kcal/mol puanı ile kenetlendiğini göstermiştir. Allokrriptopinin iki izomer arasındaki tek fark 3B yapıya da yansıyan amin grubundaki izomerik oluşumlardır ve S izomerindeki kenetlenmenin bu pozitif yüklü tersiyer amin grubunun azot ve hidrojen atomu ile Glu77 arasında kurulan tuz köprüs ve hidrojen bağının aracılık ettiği saptanmıştır. Bu durumun izomerik farkların SOD enziminin inhibitör bağlanma alanına karşı kenetlenme eğilimini etkileyebileceğini gözlemlenmiştir.

MD simülasyon hesaplarında ise allokrriptopinin bağlanma alanındaki farklı rezidülar ile kısa etkileşimlerde bulunduğu ve 1,1. ns'de de proteinden koparak uzaklaştığı tespit edilmiştir. Kısa süreli bu etkileşim boyunca proteinin RMSD (root-mean-square fluctuation) değerinin ortalamasının 0,89 Å olduğu tespit edilmiştir. Protein yapı ve konformasyonunun bozulmaması ve işlevlerinin sağlıklı bir şekilde yerine getirilebilmesi için RMSD değerinin 3 Å'un altında olması önerilmektedir. Bu açıdan sonuçlar SOD enziminin yapısının ve konformasyonunun simülasyon boyunca korunduğunu göstermektedir. RMSD'ye katkıda bulunan rezidülar incelendiğinde, protein yapısındaki en yüksek dalgalanmaların N- ve C-terminal bölgelerinde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu bölgeler yapının uç kısımlarındaki ve serbest döngü bölgeleri olduğu için alfa sarmal ve beta zincir bölgeleri kadar rijit değildir. Bu nedenle proteinin diğer yapılarına göre daha fazla dalgalanma eğilimindedirler. Zaten SOD enziminin kristal yapısının yaklaşık %62'si bu döngü bölgelerinde meydana gelmektedir. Döngü bölgeleri aynı zamanda liganların bağlanması içinde afinitesi yüksek bölgelerdir. Leu67, Val103 ve His110 gibi döngü bölgesindeki rezidülar ile de yeni hidrofobik ve iyonik etkileşimleri kurulduğu ancak bunlarında Glu77 ile kurulan bağlar gibi

zayıf ve simülasyon süresinin yalnızca %1-3'ünde gerçekleştiği gözlemlenmiştir. İmidazol türevlerinin ve polibenzimidazol analoglarının SOD inhibitör analoğu olabilme potansiyellerinin karşılaştırılmalı olarak araştırıldığı bir kenetlenme çalışmada bileşiklerin Glu77'nin yanı sıra çevresindeki 21 rezidu ile de bağ yapabildiği raporlanmıştır (Veeraragavan ve diğerleri, 2017). Nar suyu içerisindeki bileşiklerin pro-oksidan aktivitesinin araştırıldığı bir başka kenetlenme çalışmasında da SOD inhibitörü olan izoproterenolün aynı bağlanma bölgesi ile kenetlendiği görülmektedir (Mazumder ve diğerleri, 2019). Çalışmalarda farklı puanlama logaritmasına sahip farklı kenetlenme sistemleri kullanılmış olduğu için allokriptopinin sonuçları kıyaslanamamıştır. Ancak, bu çalışmalar inhibitör bağlanma alanı olarak doğru bölgenin seçildiğini göstermektedir. Moleküler kenetlenme ve MD simülasyon sonuçları birlikte ele alındığında, allokriptopinin SOD inhibitör bağlanma alanı ile olası etkileşiminin allokriptopinin amin, siklik asetal ve fenol grubu aracılığıyla gerçekleşebileceği ancak bu etkileşimin stablitesinin çok zayıf olduğu ve yalnızca 1,1 ns. boyunca sürebildiği tespit edilmiştir. Bu durumun allokriptopinin SOD enzimini inhibitör bağlanma alanı aracılığıyla inhibe ederek pro-oksidan aktivite sergilemeyeceğini göstermektedir.

S izomerinin KAT enziminin inhibitör bağlanma alanı ile -2,83 kcal/mol kenetlenme puanı ile etkileşime girdiği ve bu etkileşime amin grubundaki azot atomu ile Asp360 arasında tuz köprüsünün aracı olduğu gözlemlenmiştir. R izomerinde de S izomerin gibi amin grubunun azot atomu ve ASP360 arasındaki tuz köprüsünün rol oynadığı tespit edilmiştir. Ancak bu etkileşimin kenetlenme puanı -0,43 kcal/mol olarak hesaplanmıştır ve S izomerinden daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durumun iki yapı arasındaki izomer farkından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. MD simülasyon hesapları sonucunda ise S izomerinin 100ns boyunca etkileşim afinitesini ve stablitesini koruyarak inhibitör bağlanma alanı ile etkileşimi sürdürdüğü ancak R izomerinin 45. ns'de kompleksten ayrıldığı tespit edilmiştir. S ve R izomerleri ile etkileşime giren enzimlerin RMSD değerinin sırasıyla $6,15 \pm 0,23$ Å ve $6,44 \pm 0,23$ Å olduğu tespit edilmiştir. İki izomerin RMSF değerleri incelendiğinde dalgalanmanın yüksek olduğu rezidülerin yapının %60'ını oluşturan döngü bölgelerine denk geldiği görülmektedir. Buna rağmen her iki izomere ait RMSD ve RMSF değerleri önerilenin üzerindedir. Normal koşullar altında bu durum enzim konformasyonun bozulma eğiliminde olduğuna işaret etmektedir. Ancak ortalama RMSD değeri 7,76 Å olan KAT enziminin apo formu (ligandsız) ile karşılaştırıldığında (RMSD grafiklerinde kırmızı ile gösterilmiştir), allokriptopinin enzim konformasyonunu bozmadığı, tersine iki izoformunun

da enzimin RMSD değerini düşürüp, biraz daha kararlı bir hale dönüştürdüğü tespit edilmiştir. Ayrıca, iki izomerin de KAT enziminin inhibitör bağlanma alanı ile yaptığı etkileşimler incelendiğinde S izomerinin 100 ns'lik simülasyon süresi boyunca etkileşimi sürdürdüğü tespit edilmiştir. S izomerinin aksine R izomerine ait etkileşimlerin de 45. ns'de sifıra düştüğü ve yapıdan koptuğu tespit edilmiştir. MD boyunca gerçekleşen etkileşimlerde izomerlerin tersiyer amin grubunun direk katkısı olmadığı gözlenmiştir. Ancak, Şekil 4.9'da görülebileceği üzere streokimyasal farklar alloktopinin geometrik yapısına yansımaktadır. Bu nedenle iki izomer arasındaki etkileşim süresindeki ve etkileşilen rezidülerdeki farkın izomerizasyon durumdan kaynaklı ortaya çıkan 3B yapılarına atfedilebileceği düşünülmektedir.

İzomerlerin KAT enziminin inhibitör bağlanma alanı ile etkileşimlerinde ağırlıklı olarak hidrofobik etkileşimlerin ve su köprülerinin rol aldığı belirlenmiştir. Kenetlenme hesaplamalarında gözlemlenen ASP360 ile izomerlerin amin grubu arasındaki bağın yalnızca S izomerinin MD simülasyonunda hidrofobik etkileşimler ile gerçekleştiği görülmüştür. S izomerli KAT enzimin simülasyonunda PHE198, HIS305 ve PHE446 rezidülerinin, R izomerli simülasyonda ise PHE198, ASN149, ve ASN213 önemli role sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu rezidülerden PHE198'ün simülasyon süresinin %43'ü boyunca S izomerinin fenol halkası ile hidrofobik pi-pi etkileşimini yaptığı, HIS305'in ise metoksi grubunun oksijen atomu ile simülasyon süresinin %25'i boyunca su köprüsü kurduğu tespit edilmiştir. PHE446'nin ise simülasyon süresinin yaklaşık %5'i boyunca hidrofobik etkileşim yaptığı tespit edilmiştir. R izomerinin PHE198 ile olan pi-pi etkileşimi ise sırasıyla %12 ve %16 oranlarında fenol ve orto-difenol halkaları ile gerçekleşmiştir. ASN149, ASN213'ün etkileşimlerinde de siklik asetal grubunun oksijen atomları ile kurulan su köprülerinin rol almaktadır ve bu etkileşimlerinde simülasyon süresinin %10-20'si arasında gerçekleştiği görülmektedir. Etken maddelerin KAT inhibitör etkinliğinin hem teorik hem de deneysel olarak araştırıldığı iki farklı çalışmada da inhibitör bağlanma alanı olarak PHE198, ARG203 PRO304, VAL450, ve PHE446 bağlanma cebi seçilmiştir (Li ve diğerleri, 2017). Başka bir çalışmada ise H_2O_2 ile benzer yollardan oksidatif strese neden olan bisfenol A'nın da bu rezidüler ile yüksek etkileşimli bağlar kurduğunu ve bu bölgenin oksidatif stres oluşumuna aracılık edebileceği raporlanmıştır (Suthar ve diğerleri, 2014). Ayrıca, Li ve arkadaşları bu bölgenin enzimin esnek bölgesi olduğunu ve etkileşimin proteinde konformasyonel değişiklikleri tetikleyerek, H_2O_2 veya O_2 taşınmasını engelleyebileceği bildirilmiştir. Böylece etken madde aracılı inhibisyonun allosterik bir etki yoluyla meydana gelebileceğini

gösterilmiştir (Li ve diğerleri, 2017). Bu durum alloktopin için seçilen inhibitör bağlanma alanının doğru olduğunu göstermektedir. Ayrıca, alloktopine ait S izomerinin 100 ns boyunca bu rezidüler ile etkileşiminin allosterik etki ile enziminin inhibisyonuna ve oksidan aktiviteye neden olabileceğini göstermektedir. Ancak Suthar ve arkadaşları tarafından bağlanma bölgesindeki bu temel itici gücün hidrojen bağ olduğunu vurgulamıştır (Suthar ve diğerleri, 2014). Bu açıdan 100 ns'lik MD simülasyon hesaplamalarının %1'inden de az bir zamanda kurulan hidrojen bağının KAT enziminin tamamen inhibe edilmesi için yeterli olmadığı düşünülmektedir. Ayrıca, S izomeri ile KAT enziminin etkileşim oran grafiği incelendiğinde, PHE198 dışındaki tüm rezidülerin etkileşim oranının düşük ve lipofilik olduğu görülmektedir. Lipofilik gruplar arasındaki çekim kuvvetinin zayıf ve süresiz olduğu bilinmektedir (Klebe, 2013). Bu durum alloktopinin R izomerinin yanı sıra, S izomerinin de KAT enzimini inhibitör bağlanma alanı aracılığıyla inhibe edemeyeceğini ve bununla ilişkili pro-oksidan aktiviteye sahip olamayacağını düşündürmektedir.

GPx enzim inhibitörünün bağlanma alanı ile etkileşiminde de S ve R izomerinin enzime sırasıyla -2,83 kcal/mol ve -0,43 kcal/mol kenetlenme puanları ile bağlanabildiği tespit edilmiştir. S izomeri ile GPx enzimi arasındaki zayıf etkileşime amin gruplarındaki azot atomunun ve metoksi grubunun oksijen atomunun GLU43 ve ARG39 rezidüleri ile sırasıyla kurdukları tuz köprüsü ve hidrojen bağları aracılık etmektedir. R izomeri ile GPx arasındaki etkileşimde ise siklik asetal grubunun oksijen atomu ile ARG39 rezidüsü arasında hidrojen bağları kurulduğu saptanmıştır. Bu etkileşimlerin stabilite ve sürekliliğinin incelendiği MD simülasyon çalışmalarında GPx enziminin inhibitör bağlanma alanı ile S izomeri arasındaki etkileşimin 10 ns boyunca, R izomeri ile arasındaki etkileşimin ise 5 ns boyunca sürdüğü ve enziminin RMSD değerinin sırasıyla $1,05 \pm 0,09$ Å ve $1,05 \pm 0,09$ Å olduğu belirlenmiştir. Yapının RMSF analizi incelendiğinde iki komplekste de enzimin N- terminalindeki ASP ve 125. ve 126. rezidü olan ILE ve LEU'de ortalamanın üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Terminal bölgeler uç kısımlar serbest alanlar olduğu için simülasyon sırasındaki en hareketli bölgelerdir. ILE ve LEU rezidülerinin ise döngü bölgesindeki kıvrıma denk geldiği ve proteinin dış yüzeyine dönük olduğu tespit edilmiştir. S izomerinin moleküler etkileşimi incelendiğinde ilk 5 ns'de iki kez ARG39, GLU43 ile ASP139'u arasında kalan inhibitör bağlanma alanı ile etkileştiği sonrasında ise yer değiştirerek, GLU114, GLI115, ASP18, ASP 139 ve GLY155, ILE156 rezidüleri ile kısa etkileşimler yaptığı gözlemlenmiştir. Diğer yandan R izomeri, inhibisyon ile ilişkili rezidülerin bulunduğu bağlanma cebi ile ilk 2ns içerisinde etkileşim kurduğu sonrasında ise sonrasında ise HIS52, MET53 ve LYS58 gibi

inhibisyon ile ilişkilendirilmeyen ancak inhibisyon alanının yakınındaki bölgelere daha yüksek afinite ile bağlandığı gözlemlenmiştir. GPx enziminin inhibisyonu iki rezidünün de simülasyon süresinin başlarında etkileşime girdiği bağlanma cebi ile ilişkilendiren ve bu bölgeyi inhibitör alanı olarak tanımlamış çalışmalar bulunmaktadır (Mazumder ve diğerleri, 2019; Schulz ve diğerleri, 2012). Bu durum bağlanma alan seçiminin doğru olduğunu göstermektedir. MD süresince S izomeri ile inhibitör bağlanma alanındaki rezidüler arasında en uzun süreli etkileşimin ARG39 ile yapıldığı saptanmıştır. Bu etkileşimin de amin grubunun azot atomu ile kurulan zayıf su köprülerine, siklik asetal gurubu ile yapılan ile hidrofobik etkileşimlere ve hidrojen bağlarına dayandığı ve simülasyon süresinin ancak %3, %1 ve %3'ü boyunca gerçekleştiği tespit edilmiştir. R izomerinin ise en yüksek etkileşimi GLY51 rezidüsü ile simülasyon süresinin neredeyse %35'inde gerçekleştirdiği hidrofobik etkileşimler ile kurduğu gözlemlenmiştir. Hidrofobik etkileşimler güçlü bağlanma modelleri değildir bu nedenle %1'den kuvvetli etkileşimlerin bağlanma durumuna yer verilen 2B etkileşim grafiğinden ziyade bu etkileşimler etkileşim oran grafiğinde verilmiştir. Sonuçlar allokriptopine ait S ve R izomerinin GPx enziminin inhibisyonundan sorumlu rezidüler ile uzun ve sürekli bir bağ kurmadığını bu nedenle enzimin inhibitör bağlanma alanı aracılığıyla inhibitör ve pro-oksidan aktiviteye sahip olamayacağını göstermektedir.

Diğer yandan *in-vitro* çalışmalar ile tespit edilen allokriptopinin AChE inhibitör aktivitesinin moleküller temellerinin ortaya konulması amacıyla enziminin inhibitör bağlanma alanı allokriptopin izomerlerinin etkileşimi de incelenmiştir. Kenetlenme çalışmalarında S ve R izomerlerinin sırasıyla -5,77 kcal/mol ve -5,47 kcal/mol kenetlenme puanı ile inhibitör bağlanma alanıyla etkileşim kurduğu tespit edilmiştir. S izomeri ile etkileşimde enzim üzerindeki HIS287 ve TYR341 rezidülerinin önemli bir yere sahip olduğu tespit edilmiştir. R izomerinin ise etkileşim haritası ile görüntülenememiş olup, etkileşimin LEU76, SER293, VAL294 ve TRP286 rezidüleri ile metil gruplarının ucundaki hidrojen atomları arasındaki zayıf bağlara dayandığı ortaya konulmuştur. Farklı çalışmalar ile galantaminin de bu bölgeye bağlandığı ortaya konulmuştur. Bu durum inhibitör bağlanma alanı olarak doğru bölgenin seçildiğini göstermektedir (Roca ve diğerleri, 2018). Diğer yandan, bazı koşullarda AChE'nin aktif bölgesindeki rezidülerin hareket etmesi ve yönünün değişmesi ile birlikte proteinin deaktivasyonuna aracılık ettiği bildirilmiştir (Liu ve diğerleri, 2017a). Bu kapsamda S ve R izomerlerli komplekslerin her ikisinin de ortalama RMSD değerlerinin kabul gören aralıkta ve sırasıyla $1,64 \pm 0,21$ Å ve $1,89 \pm 0,30$ Å olduğu tespit edilmiştir. Bu durum allokriptopinin AChE proteininde yapısal bir değişime neden olmasan enzimi inhibe

edebileceğini göstermektedir. RMSD sonuçları ile paralel olarak R izomerine ait RMSF grafiğinin S izomerinden daha hareketli olduğu gözlemlenmiştir. İki izomer için de RMSD'ye katkıda bulunan başlıca rezidüler ise 71–81, 165–170, 255–264, 385, 492–500 ve 534–536 olarak belirlenmiştir. Bu bölgelerdeki RMSF değerlerinde ortlamanın üzerinde yüksek bir dalgalanma tespit edilmiştir. Sahin ve arkadaşlarının çalışmasında da hem tedavi için kabul gören hem de kendi liganları ile oluşturulan AChE-ligand komplekslerindeki bu rezidülerin döngü bölgerinde olduğu ve RMSF değerlerinin dalgalanma eğilimde olduğu gösterilmiştir (Sahin ve diğerleri, 2020). Literatürler ile uyumlu olarak bu tez çalışmasında da dalgalanmanın saptadığı rezidülerin döngü bölgesinde olduğu ortaya konulmuştur. Diğer yandan, iki izomerin de enzimle olan etkileşiminin 100 ns boyunca sürdüğü ve bu nedenle allokrıptopinin kararlı bir AChE inhibitörü olabileceği gözlemlenmiştir. Bu durum *in-vitro* çalışmalarda aktivite, gen ve protein düzeylerinde ortaya konan allokrıptopinin AChE inhibitör aktivitesini destekler niteliktedir.

Diğer yandan S izomeri için kenetlenme çalışmalarında gözlemlenen HIS287 ve TYR341 rezidüleri ile olan etkileşimlerin MD simülasyonu boyunca da kuvvetli bir biçimde sürdüğü ve TYR72, TYR124 ve TRP286 rezidüleri ile S izomeri arasında yeni bağlar kurulduğu tespit edilmiştir. R izomeri için ise kenetlenme çalışmalarında SER293, VAL294 ve TRP286 rezidüleri ile olan etkileşimlerin sürdürüldüğü bunun yanı sıra başlıca TYR72, TYR124, GLU292, SER293 ve ARG296 olmak üzere farklı rezidüler ile yeni etkileşimlerin kurulduğu belirlenmiştir. Her iki izomerin rezidülere bağlanma durumuda ağırlıklı olarak hidrofobik etkileşimlerin rol aldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, iki izomerin de hidrofobik etkileşimler ve su köprüsü kurduğunu Tyr124 ve Phe338 enzimin aktif merkez geçitinde yer alan ve literatürde A β agregasyonu ile ilişkilendirilen rezidülerdir (Liu ve diğerleri, 2013c). Bu durum allokrıptopinin ayrıca A β agregasyonu modüle edebileceğini ve AChE- A β agregasyonu nedeniyle oluşan yüksek toksisiteye karşı nöronları koruyabileceği işaret etmektedir. Diğer yandan, iki izomere ait %10'dan kuvvetli etkileşimlerin haritası incelendiğinde izomerlerin 3B yapısındaki farklılık nedeniyle AChE inhibitör bağlanma alanının ile de farklı etkileşim durumlarına sahip olabileceği tespit edilmiştir.

Öte yandan, bezilizokinolin iskeletine sahip alkaloidlerde AChE inhibe edici aktivite alkaloidlerin tetrahidroizokinolin kısmındaki kuaterner nitrojen atomunun varlığına ve çoklu metoksi grubuna atfedilmektedir (Suganthi ve diğerleri, 2009; Zhu ve diğerleri, 2019). Bu durum bazı izokinolin grubu alkaloidleri için de geçerli olabileceği raporlanmış olup (Kong

ve diğerleri, 2021), bu tez çalışmasındaki *in-siliko* sonuçlar ile de allokriptopinin *in-vitro* AChE inhibitör etkinliğinin ağırlıklı olarak orto-difenol halkası, metoksi, amin ve keton gruplarının varlığı sayesinde gerçekleşmiş olabileceği ortaya konulmuştur.

Sonuç olarak *in-vitro* çalışmalar ile ilk kez allokriptopinin oksidatif stres ile indüklenen TOS'u ve MDA'yı baskılayabileceği, SOD, KAT ve GPx enzim aktiviteleri aracılığıyla TAS'ı arttırabileceği, AChE aktivitesini ve ifadelerini inhibe edebileceği ve nöral morfolojik korunuma sağlayabileceği ortaya konulmuştur. Çalışmalar neticesinde çoklu etki mekanizmalar ile AH üzerinde en etkili olabilecek allokriptopin konsantrasyonun 120 µg/mL olduğu da belirlenmiştir. Yapı bazlı *in-siliko* çalışmalar ile de AH'yi hedefleyen allokriptopinin oral kullanım yoluyla, bağırsak-kan ve kan-beyin bariyerini aşarak MSS'de etkili bir ilaç etken madde adayı olabileceği tespit edilmiştir. Moleküler kenetlenme ve MD simülasyon çalışmaları ile, allokriptopin izomerlerinin SOD, KAT ve GPx enzimlerinin inhibitör bağlanma alanları ile etkileşiminin zayıf ve kararsız olduğu bu nedenle bu enzimlerin inhibisyonu yoluyla pro-oksidan aktiviteye neden olamayacağını ortaya konmuştur. Bu sebepten allokriptopinin 150 µg/mL konsantrasyonunda gözlenen TAS ve antioksidan enzim aktivitelerindeki düşüşün allokriptopin tarafından enzimlerin inhibe edilmesi nedeniyle meydana gelemediği, daha ziyade bu konsantrasyonda saptanan ve sinyal yollarında ikincil yanıtı neden olarak hücre canlılığını etkilediği düşünülen hormetik etkisinin bir sonucu olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, moleküler kenetlenme ve MD simülasyon çalışmaları ile allokriptopinin AChE enzimi üzerindeki inhibitör aktivitesinin moleküler temeller aydınlatılarak, etkileşimlerdeki istikrarlılık ve kararlılık nedeniyle allokriptopinin iyi bir AChE inhibitörü olabileceği vurgulanmıştır. Bunu yanı sıra, *in-siliko* çalışmalarda allokriptopine ait iki olası streoizomerik yapının olabileceği ortaya konulmuş olup, moleküler kenetlenme ve simülasyon çalışmaları pro-oksidan aktivite göstermeyen güçlü bir AChE inhibitörü olma açısından bunlardan R izomerinin daha iyi bir ilaç etken madde adayı olabileceği göstermiştir. İki izomerdeki yapısal farklılıklar ve enzimler ile etkileşim durumları göz önüne alındığında streoizomerik durumların deneysel ilaç geliştirme süreçlerinde de önemszenmesi gerektiği tespit edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu yüksek lisans tez çalışmasından elde edilen sonuçlar birlikte ele alındığında şu çıkarım ve öneriler yapılmıştır.

- 1) Çalışmada izokinolin grubu bir alkaloid olan allokriptopinin artan konsantrasyonlarının (20-300 µg/mL) ve inkübasyon sürelerinin (12, 24 ve 48 saat) önce PC12 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi araştırılmış olup, koruyucu aktivite ve toksisite açısından en ideal konsantrasyon aralığının 25-150 µg/mL, inkübasyon süresinin ise 18 saat olduğu belirlenmiştir. Daha sonra, 18 saatlik 25-150 µg/mL allokriptopin uygulamalarının H₂O₂ ile oksidatif stres modeli oluşturulan PC12 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi belirlenmiş olup, 25-120 µg/mL allokriptopinin hücrel ölümüne karşı korucu aktivite gösterdiği, buna karşın 150 µg/mL'nin hücreler üzerinde kısmi de olsa toksisiteye neden olduğu tespit edilmiştir. Literatürde izokinolin grubu alkaloidlerin artan konsantrasyonlarının sinyal yollarındaki farklı hücrel yanıtlara neden olan hormetik etki gösterdiği raporlanmıştır. Bu tez çalışması ile allokriptopinin de hormetik aktiviteye sahip olduğu ve bifazik konsantrasyon yanıtı açısından toksisiteye neden olan 150 µg/mL'nin önemli olduğu ortaya konulmuştur.
- 2) Membranların yapısal hasarına ve peroksidasyon ürünlerinin üretimine neden olan lipid peroksidasyon oksidatif stres aracılı nörodejenerasyonun ana belirteçlerinden biridir ve allokriptopinin oksidatif stres ile indüklenen lipid peroksidasyonunu başarılı bir şekilde baskılandığı tespit edilmiştir. Allokriptopinin peroksit veya radikal ara ürün oluşumunu engelleyerek ya da bunları daha az sitotoksik bir bileşiğe indirgeyerek lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etki gösterdiği düşünülmektedir.
- 3) Aşırı oksidan üretimi ile antioksidan sistemin yetersizliği nedeniyle ortaya çıkan oksidatif stresin AH'de merkezi bir role sahip olabileceği bilinmektedir. Bu çalışmada da allokriptopinin hem hücre içi TOS azaltarak, hem de TAS ve bununla ilişkili enzimlerin aktivitesini artırarak, H₂O₂ ile indüklenen oksidatif strese karşı nörokoruyucu etki sağladığı ve hücre içi oksidatif stres miktarını önemli oranda baskıladığı gözlemlenmiştir. Literatürde farklı bitkisel grupların lipofilik ve polisiklik halkaları ile redoks reaksiyonlarını düzenleyebildiği, benzodioksol ve pirokatekol yapıları ve konjuge çift ve serbest C-H bağları aracılığıyla da antioksidan sistemin güçlenmesine katkıda bulunabileceği raporlanmış olup, allokriptopinin de bu fizikokimyasal özelliklere sahip

olması nedeniyle oksidatif stres üzerindeki baskılayıcı ve koruyucu etkinliğinin bu yapısal grup ve bağlarına atfedilebileceği düşünülmüştür.

- 4) Oksidatif stres tarafından baskılanan antioksidan sistemin birincil savunma hattındaki SOD, KAT ve GPx enzim aktivitelerinin allokriptopin tarafından doza bağımlı bir şekilde artırıldığı ve allokriptopinin diğer antioksidanlara göre GPx enzim aktivitesinin kaybını neredeyse tamamen engellediği saptanmıştır. GPx enziminin antioksidan işlevinin yanı sıra lipid peroksitlerini alkolle indirgeyici bir role sahip olması, allokriptopinin hem lipid peroksidasyonu hem de GPx aktivitesindeki yüksek koruyucu etkisinin birbiri ile ilişkili olabileceği düşündürmektedir. Ayrıca, H_2O_2 tarafından indüklenen lipid peroksitlerinin oluşumunu engelleyen GPx aktivitenin inhibisyonu ve artan lipid peroksidasyonunun nöronlarda da görülen bir başka hücresel ölüm yolağı olan ferroptozis ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu sebepten allokriptopinin lipid peroksidasyonun baskılanması ve GPx aktivitesinin yüksek oranda artırılması üzerindeki etkisinin ferroptozis karşı da korunum sağlayabileceğini düşündürmekte olup, hem allokriptopinin ferroptozis üzerindeki etkisinin hem de bu etkinin nörokoruyucu aktivite ile ilişki olup-olmadığının araştırılması tezde bulunana bu bulgular için daha destekleyici olacaktır.
- 5) Ayrıca, allokriptopinin SOD, KAT ve GPx enzimlerinin yanı sıra, diğer enzimatik ve/veya enzimatik olmayan antioksidanlar üzerinde de etkili olarak TAS'a katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.
- 6) Literatürde oksidatif hasar yaratıcı ajanların etkisinde kalan nöronlarda AChE aktivitesindeki artışa bağlı olarak tetiklenen nöral apoptozom kompleksinin oluşumu nedeniyle nöral apoptozun geliştiği bildirilmiştir. Bu kapsamda allokriptopinin antioksidan aktivitesinin yanında AChE inhibitör etkinliğinin de araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada allokriptopinin inhibitör etkisi H_2O_2 ile oksidatif hasara indüklenerek AChE aktivitesi artırılmış nöral hücre modelinde hem aktivite hem de gen ve protein ifade düzeyinde gösterilmiştir. Allokriptopinin tüm konsantrasyonlarının AChE'yi inhibe ettiği ortaya konulmuş olup, antioksidan etki sonuçlarındaki gibi en iyi ve güçlü inhibitör etkiyi 120 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu göstermiştir. Allokriptopinin antioksidan sonuçları ile AChE etkisi sonuçları doğrulanmıştır.
- 7) Oksidatif hasara bağlı nörodejenerasyonda antioksidan yetersizlik, lipid peroksidasyonu, AChE aktivasyonu gibi biyokimyasal ve moleküler hasarların yanı sıra, bu hasarlar aracılığıyla tetiklenen nöron morfolojisinde de hücre çapının artması, nörit uzunluğu ve dallanma miktarının azalması gibi değişimler meydana gelmektedir. Çalışmada allokriptopinin hücre çapındaki artışı baskılayarak, nörit uzunluğu ve dallanma miktarının

ise artırılarak, oksidatif stres nedeniyle oluşan morfolojik hasara karşı, nöral gelişimi ve sinaptogenezi korunduğu gösterilmiştir. Bulgulara ve literatür bilgilerine dayanarak, allokriptopinin nöral morfoloji üzerindeki koruyucu etkisinin lipit peroksidasyonunu baskılayıcı, antioksidan ve anti-AChE aktivitelerinden kaynaklandığı söylenebilir.

- 8) Çalışmalarda tüm allokriptopinin konsantrasyonlarının oksidatif strese karşı hem oksidan-antioksidan mekanizma ile hem de AChE ve nöral morfolojik gelişim ile nörokoruyucu aktiviteye sahip olduğu ancak konsantrasyona göre koruyuculuğun farklılık gösterdiği ve tüm mekanizmalardaki en etkili konsantrasyonun 120 µg/mL olduğu gözlemlenmiştir. Buna karşın 150 µg/mL allokriptopin ile muamele edilen hücrelerdeki antioksidan ve nörit gelişim aktivitelerindeki düşüşün ve oksidan ve AChE aktivitesindeki artışın bu konsantrasyonun neden olduğu hücre ölümü ile ilişkili olduğu düşünülmekte olup, devam çalışmalarının allokriptopinin düşük konsantrasyonları gerçekleştirilmesi önerilmektedir.
- 9) *İn-siliko* çalışmalar kapsamında yapılan ve etken maddenin stereokimyasal, tautomerizasyon ve protonizasyon durumlarının belirlendiği ligand hazırlama işlemi sonucunda allokriptopine ait iki olası stereoizomerik yapının olduğu ve izomerlerin 3B yapılarının farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. İlaç adaylarının zayıf EDMA/biyoyararlanım profiline sahip olması, AH'ye yönelik ilaç geliştirme çalışmalarındaki yüksek başarısızlığın başlıca nedenlerden biridir. Bu sebepten bu iki izomerin farmakokinetik özellikleri ve ilaç olabilme potansiyelleri araştırılmış olup, izomerlerin oral kullanım ile, bağırsak-kan ve kan-beyin bariyerini geçerek sinir sistemde etkili iyi bir ilaç etken veya destek maddesi olabileceği ortaya konulmuştur.
- 10) Ayrıca, bu tez çalışmasında allokriptopinin antioksidan sistem enzimleri üzerindeki olası inhibitör aktivitesinin moleküler temelleri de araştırılmıştır. Sonuçlar allokriptopinin SOD, KAT ve GPx enzimlerini inhibitör bağlanma alanları aracılığıyla inhibe edemeyeceğini ve bu yolla pro-oksidan bir aktiviteye sergileyemeyeceğini göstermiş olup, allokriptopinin antioksidan sistem üzerinde güvenli kullanımının söz konusu olabileceği belirlenmiştir.
- 11) Bunun yanı sıra allokriptopinin *in-vitro* çalışmalarda tespit edilen AChE inhibitör aktivitesinin de moleküler temelleri araştırılmış olup, inhibitör aktivitesinin ağırlıklı olarak yapısındaki katekol ve benzodioksol gruplarının enzim üzerindeki CAS ve PAS alanları ile etkileşimi sayesinde gerçekleşebileceği tespit edilmiştir. Sonuçlar ile ayrıca allokriptopinin AChE proteini üzerindeki, literatürde Aβ bağlanma bölgesi olarak tanımlanan ve Aβ agregasyonunu ve toksisitesini şiddetlendirdiği ortaya konulan,

rezidüer ile etkileşimi girerek A β agregasyonunu ve buna bağılı gelişen toksisiteyi de modüle edebileceğini ortaya konulmuştur.

- 12) Ayrıca, *in-siliko* olarak gerçekleştirilen moleküler kenetlenme ve MD simülasyon çalışmaları ile allokriptopin izomerlerinin farklı bağlanma durum ve gücüne sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada pro-oksidan aktivite ile ilişkili bölgeler ile zayıf ve düzensiz buna karşın AChE inhibisyonu ile ilişkili bölgeler ile daha kararlı ve düzenli etkileşimler kurması nedeniyle, allokriptopine ait sentezlenecek R izomerinin AH'de etkili bu mekanizmalar için daha iyi bir ilaç etken madde adayı olabileceği ortaya konulmuştur. Bu durum ile ayrıca AH'ye yönelik deneysel ilaç keşif ve geliştirme çalışmalarında da izomerik farklılıkların göz önünde bulundurularak, araştırılması gerekli olduğu düşünülmüştür.
- 13) Deneysel çalışmalarda artan allokriptopin konsantrasyonu ile birlikte hücreölölümün de arttığı tespit edilmiş olup, *in-siliko* çalışmalarda allokriptopinin yapısındaki toksisite ile ilişkilendirilen tek reaktif fonksiyonel grubun keton yapısı olduğu tespit edilmiştir. Bu sebepten allokriptopinin katekol ve benzodioksol gibi antioksidan, anti-AChE ve anti-A β aktivitesi ile ilişki olduğu düşünülen yapısal özelliklerinin korunarak veya aktivitelerini daha da artıracak yapısal değişiklikler ile, keton grubunun yerine başka bir fonksiyonel grubun getirildiği yeni biyoizosterik türevlerinin tasarlanıp, sentezlenerek hafif toksisiteli daha etkin bir ilaç etken maddesinin oluşturulabileceği öngörülmektedir.
- 14) Bu tez çalışması ile allokriptopinin çoklu biyolojik aktivitesi sayesinde iyi bir nörokoruyucu ajan olabileceği düşünülmektedir. Literatürde allokriptopindeki toksisite ile ilişkili olduğu düşünülen bu grubun sistemlerdeki metabolizasyon yoluyla alkole indirgenebileceği yönünde bulgular mevcuttur. Bu sebepten biyoizosterik yaklaşımlara ek olarak, metabolizma sonucu oluşan allokriptopin metabolitleri ile de yüksek konsantrasyonlarda toksik olmayan daha iyi terapötik yanıtlar alınabileceği düşünülmekte olup, bu düşüncenin ileri düzey hayvan çalışmaları ile araştırılarak desteklenmesi gerekmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında allokriptopinin oksidan baskılayıcı, antioksidan mekanizmayı güçlendirici, AChE inhibe edici, nöral morfolojik değişimleri önleyici etkinliği sayesinde hücreölöl oksidatif strese karşı nörokoruyucu aktiviteye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Literatürde izokinolin grubu alkaloidlerin nörokoruyucu etkisi araştırılmış olmasına karşın, allokriptopinin ile ilgili çalışma bulunmaması nedeniyle bu bulgular alandaki açığı kapatacak özgün ve öncül olma potansiyeline sahiptir. Bu tez çalışması ile nörokoruyucu

etkinliğinin birden fazla mekanizma üzerinde gösterilmesi allokriptopinin nörokoruyucu aktivitesini güçlendirmiştir. Ayrıca, AH'ye yönelik yürütölen ilaç geliştirme çalışmalarına rağmen, etkin ilaçların bulunmasında istenilen sonuçların alınamadığı göz önünde bulundurulduğunda, allokriptopinin yapılacak ileri düzey ilaç geliştirme çalışmaları ile nörodejeneratif hastalılarda ilaç etken maddesi olma potansiyeline sahip olduğu görölmektedir.



KAYNAKLAR

- Abbasi, M. A., Hassan, M., Aziz-ur-Rehman, Siddiqui, S. Z., Ali Shah, S. A., Raza, H., and Seo, S. Y. (2018). Synthesis, enzyme inhibitory kinetics mechanism and computational study of N-(4-methoxyphenethyl)-N-(substituted)-4-methylbenzenesulfonamides as novel therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Journal of Life & Environmental Sciences*, 6, e4962.
- Abolaji, A. O., Fasae, K. D., Iwezor, C. E., Aschner, M., and Farombi, E. O. (2020). Curcumin attenuates copper-induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology Reports*, Amsterdam: Elsevier, 7, 261–268.
- Abu-Ghalyun, Y., Masalmeh, A., and Al-Khalil, S. (1997). Effects of allocryptopine, an alkaloid isolated from *glaucium arabicum* on rat isolated ileum and urinary bladder. *General Pharmacology*, 29(4), 621–623.
- Ahmed, F., Ghalib, R., Sasikala, P., and Mueen Ahmed, K. (2013). Cholinesterase inhibitors from botanicals. *Pharmacognosy Reviews*, 7(14), 121–130.
- Akkan, A. G. (2014, 28-31 Mayıs). *Farmakokinetik/Farmakodinamik Temel Tanımlar*. 29. Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresinde sunuldu, Muğla.
- Akyar, İ., ve Akdemir, N. (2009). Alzheimer Hastalarına Bakım Verenlerin Yaşadıkları Güçlükler. *Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Hemşirelik Dergisi*, 16(3), 32–49.
- Alavijeh, M. S., Chishty, M., Qaiser, M. Z., and Palmer, A. M. (2005). Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system drug discovery. *NeuroRx*, 2(4), 554–571.
- Ali, S. S., Ahsan, H., Zia, M. K., Siddiqui, T., and Khan, F. H. (2020). Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *Journal of Food Biochemistry*, 44(3), 1–13.
- Alonso, A. D., Cohen, L. S., Corbo, C., Morozova, V., ElIdrissi, A., Phillips, G., and Kleiman, F. E. (2018). Hyperphosphorylation of Tau Associates with changes in its function beyond microtubule stability. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 338.
- Altıncılıç, S. (2010). *PC12 Hücrelerinde Risperidon ve Balık Yağının Antioksidan Düzeyleri ve Sitozole Kalsiyum Akışı Üzerine Etkileri*, Tıpta Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta
- Alvariño, R., Alonso, E., Tribalat, M. A., Gegunde, S., Thomas, O. P., and Botana, L. M. (2017). Evaluation of the protective effects of sarains on H₂O₂-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurotoxicity Research*, 32(3), 368-380.
- Alzheimer, D. (2016). Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 12(4), 459-509.

- Amirkia, V., and Heinrich, M. (2014). Alkaloids as drug leads - A predictive structural and biodiversity-based analysis. *Phytochemistry Letters*, 10, xlviii–liiii.
- Andrade, S., Ramalho, M. J., Loureiro, J. A., and Do Carmo Pereira, M. (2019). Natural compounds for Alzheimer's disease therapy: A systematic review of preclinical and clinical studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2313.
- Andreone, B. J., Larhammar, M., and Lewcock, J. W. (2020). Cell death and neurodegeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 12(2), a036434.
- Asghar, A., Yousuf, M., Fareed, G., Nazir, R., Hassan, A., Maalik, A., Noor, T., Iqbal, N., and Rasheed, L. (2020). Synthesis, acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) activities, and molecular docking studies of a novel compound based on combination of flurbiprofen and isoniazide. *Royal Society of Chemistry*, 10(33), 19346-19352.
- Ashabi, G., Ahmadiani, A., Abdi, A., Abraki, S. B., and Khodagholi, F. (2013). Time course study of Ab formation and neurite outgrowth disruption in differentiated human neuroblastoma cells exposed to H₂O₂: Protective role of autophagy. *Toxicology in Vitro*, 27(6), 1780–1788.
- Aso, E., and Ferrer, I. (2012). Potential Therapeutic Strategies to Prevent the Progression of Alzheimer to Disease States. *Understanding Alzheimer 's Disease*, 251-303.
- Ataei, S. (2018). *Yeni Heterosiklik Bileşiklerin In Silico Tasarlanması, Sentezlenmesi, Yapılarının Aydınlatılması ve Mikrobiyolojik Etkilerinin İncelenmesi*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, 1-168.
- Awasthi, M., Singh, S., Pandey, V. P., and Dwivedi, U. N. (2016). Alzheimer's disease: An overview of amyloid beta dependent pathogenesis and its therapeutic implications along with *in silico* approaches emphasizing the role of natural products. *Journal of the Neurological Sciences*, 361, 256–271.
- Aykac, A., Ozbeyli, D., Uncu, M., Ertaş, B., Kılınc, O., Şen, A., Orun, O., and Sener, G. (2019). Evaluation of the protective effect of *Myrtus communis* in scopolamine-induced Alzheimer model through cholinergic receptors. *Gene*, 689, 194-201
- Bao, D., Wang, J., Pang, X., and Liu, H. (2017). Protective effect of quercetin against oxidative stress-induced cytotoxicity in rat pheochromocytoma (PC-12) cells. *Molecules*, 22(12), 1122.
- Bao, J., Huang, B., Zou, L., Chen, S., Zhang, C., Zhang, Y., Chen, M., Wan, J. B., Su, H., Wang, Y., and He, C. (2015). Hormetic effect of berberine attenuates the anticancer activity of chemotherapeutic agents. *Public Library of Science*, 10(9), e0139298.
- Baran, S. S., Niğdelioğlu Dolanba, S., ve Aslım, B. (2020, 19-20 Mart). *H₂O₂ ile oksidatif strese induklenmiş PC12 hücre modelinde allokriptopinin nöral apoptoz üzerindeki etkisinin araştırılması*. 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020)'da sunuldu, Ankara.
- Beauchamp, C., and Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276–287.

- Beckhauser, T. F., Francis-Oliveira, J., and De Pasquale, R. (2016). Reactive oxygen species: Physiological and physiopathological effects on synaptic plasticity: Supplementary issue: Brain plasticity and repair. *Journal of Experimental Neuroscience*, 10, JEN-S39887.
- Bekdash, R. A. (2021). The cholinergic system, the adrenergic system and the neuropathology of Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1273.
- Benhar, M. (2020). Oxidants, antioxidants and thiol Redox switches in the control of regulated cell death pathways. *Antioxidants*, 9(4), 309.
- Benussi, L., Binetti, G., and Ghidoni, R. (2017). Loss of neuroprotective factors in neurodegenerative dementias: The end or the starting point? *Frontiers in neuroscience*, 11, 672.
- Bezoari, Massimo D and Boothe, G. (2019). Determination of potential multi-target inhibitors of Alzheimer's disease *in silico*. *Journal of Undergraduate Chemistry Research*, 18(4), 21.
- Bhadbhade, A., and Cheng, D. W. (2012). amyloid precursor protein processing in Alzheimer's disease. *Iranian Journal of Child Neurology*, 6(1), 1–4.
- Bisht, N., and Singh, B. K. (2018). Role of computer aided drug design in drug development and drug discovery. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(4), 1405–1415.
- Calabrese, E. J. (2018). Hormesis: Path and progression to significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 2871.
- Calabrese, E. J., Dhawan, G., Kapoor, R., Iavicoli, I., and Calabrese, V. (2015). What is hormesis and its relevance to healthy aging and longevity? *Biogerontology*, 16(6), 693–707.
- Camandola, S., and Mattson, M. P. (2017). Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 36(11), 1474–1492.
- Campanari, M. L., García-Ayllón, M. S., Ciura, S., Sáez-Valero, J., and Kabashi, E. (2016). Neuromuscular junction impairment in amyotrophic lateral sclerosis: Reassessing the role of acetylcholinesterase. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9, 160.
- Cassidy, L., Fernandez, F., Johnson, J. B., Naiker, M., Owoola, A. G., and Broszczak, D. A. (2020). Oxidative stress in Alzheimer's disease: A review on emergent natural polyphenolic therapeutics. *Complementary Therapies in Medicine*, 49, 102294.
- Castelli, V., Benedetti, E., Antonosante, A., Catanesi, M., Pitari, G., Ippoliti, R., Cimini, A., and d'Angelo, M. (2019). Neuronal cells rearrangement during aging and neurodegenerative disease: Metabolism, oxidative stress and organelles dynamic. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 132.

- Cervellini, I., Annenkov, A., Brenton, T., Chernajovsky, Y., Ghezzi, P., and Mengozzi, M. (2013). Erythropoietin (EPO) increases myelin gene expression in CG4 oligodendrocyte cells through the classical EPO receptor. *Molecular medicine*, 19(1), 223-229.
- Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., and Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology*, 14, 450-464.
- Chen, B., Zhao, J., Zhang, R., Zhang, L., Zhang, Q., Yang, H., and An, J. (2020). Neuroprotective effects of natural compounds on neurotoxin-induced oxidative stress and cell apoptosis. *Nutritional Neuroscience*, 0(0), 1-22.
- Chen, X., Guo, C., and Kong, J. (2012). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural regeneration research*, 7(5), 376-85.
- Chen, X., Zhou, X., and Zhou, X. Y. Z. (2016). Propofol protects against H₂O₂-induced oxidative injury in differentiated PC12 cells via inhibition of Ca²⁺-dependent nadph oxidase. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(4), 541-551.
- Chew, H., Solomon, V. A., and Fonteh, A. N. (2020). Involvement of lipids in Alzheimer's disease pathology and potential therapies. *Frontiers in Physiology*, 11, 1-28.
- Chi, H., Chang, H., and Sang, T. (2018). Neuronal cell death mechanisms in major neurodegenerative diseases. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 3082.
- Chitra Jain; Shivani Khatana; Rekha Vijayvergia. (2019). Bioactivity of secondary metabolites of various plants: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(2), 494-504.
- Chlebek, J., Novák, Z., Kassemová, D., Šafratová, M., Kostelník, J., Malý, L., Ločárek, M., Opletal, L., Hošťálková, A., Hrabínová, M., Kuneš, J., Novotná, P., Urbanová, M., Nováková, L., Macáková, K., Hulcová, D., Solich, P., Pérez Martín, C., Jun, D., and Cahlíková, L. (2016). Isoquinoline alkaloids from *fumaria officinalis* L. and their biological activities related to Alzheimer's disease. *Chemistry and Biodiversity*, 13(1), 91-99.
- Cioffi, F., Adam, R. H. I., and Broersen, K. (2019). Molecular mechanisms and genetics of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 72(4), 981-1017.
- Cobley, J. N., Fiorello, M. L., and Bailey, D. M. (2018). 13 Reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biology*, 15, 490-503.
- Cohen-Cory, S., Kidane, A. H., Shirkey, N. J., and Marshak, S. (2010). Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. *Developmental Neurobiology*, 70(5), 271-288.
- Cohen, G., Kim, M., and Ogwu, V. (1996). A modified catalase assay suitable for a plate reader and for the analysis of brain cell cultures. *Journal of Neuroscience Methods*, 67(1), 53-56.

- Conrado, D. J., Duvvuri, S., Geerts, H., Burton, J., Biesdorf, C., Ahamadi, M., Macha, S., Hather, G., Francisco Morales, J., Podichetty, J., Nicholas, T., Stephenson, D., Trame, M., Romero, K., and Corrigan, B. (2020). Challenges in Alzheimer's disease drug discovery and development: the role of modeling, simulation, and open data. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 107(4), 796–805.
- Coronel, R., Palmer, C., Bernabeu-Zornoza, A., Monteagudo, M., Rosca, A., Zambrano, A., and Liste, I. (2019). Physiological effects of amyloid precursor protein and its derivatives on neural stem cell biology and signaling pathways involved. *Neural Regeneration Research*, 14(10), 1661.
- Cummings, J., Feldman, H. H., and Scheltens, P. (2019). The “rights” of precision drug development for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*, 11(1), 1–14.
- Cummings, J., Lee, G., Ritter, A., Sabbagh, M., and Zhong, K. (2020). Alzheimer's disease drug development pipeline: 2020. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 6(1), e12050.
- Cummings, J., Lee, G., Ritter, A., and Zhong, K. (2018). Alzheimer's disease drug development pipeline: 2018. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*, 4(1), 195–214.
- Cummings, J., Lee, G., Zhong, K., Fonseca, J., and Taghva, K. (2021). Alzheimer's disease drug development pipeline: 2021. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 7(1), e12179.
- Dai, M. H., Zheng, H., Zeng, L. D., and Zhang, Y. (2018). The genes associated with early-onset Alzheimer's disease. *Oncotarget*, 9(19), 15132–15143.
- Dey, A., and Mukherjee, A. (2017). *Plant-Derived alkaloids: a promising window for neuroprotective drug discovery*. Discovery and Development of Neuroprotective Agents from Natural Products: Natural Product Drug Discovery, Amsterdam: Elsevier, 237–320.
- Dey, P., Kundu, A., Kumar, A., Gupta, M., Lee, B. M., Bhakta, T., Dash, S., and Kim, H. S. (2020). *Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids)*. Recent advances in natural products analysis, Amsterdam: Elsevier, 505–567.
- Di, J., Cohen, L. S., Corbo, C. P., Phillips, G. R., El Idrissi, A., and Alonso, A. D. (2016). Abnormal tau induces cognitive impairment through two different mechanisms: Synaptic dysfunction and neuronal loss. *Scientific Reports*, 6, 1–12.
- Dichter, M., Tischler, A. and G. L. (1977). Nerve growth factor-induced increase in electrical excitability and acetylcholine sensitivity of a rat pheochromocytoma cell line. *Nature*, 268(5620), 501–504.
- Dos Santos, T. C. D., Gomes, T. M., Pinto, B. A. S., Camara, A. L., and Paes, A. M. D. A.. (2018). Naturally occurring acetylcholinesterase inhibitors and their potential use for Alzheimer's disease therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1192.

- Dos Santos Maia, M., Rodrigues, G. C. S., De Sousa, N. F., Scotti, M. T., Scotti, L., and Mendonça-Junior, F. J. B. (2020). Identification of new targets and the virtual screening of lignans against Alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.
- Duan, Y., Dong, S., Gu, F., Hu, Y., and Zhao, Z. (2012). Advances in the pathogenesis of Alzheimer ' s disease : Focusing on tau-mediated neurodegeneration. 1(1), 1–7.
- Dunnington, K., Benrimoh, N., Brandquist, C., Cardillo-Marricco, N., Di Spirito, M., and Grenier, J. (2018). *Application of pharmacokinetics in early drug development*. Pharmacokinetics and Adverse Effects of Drugs-Mechanisms and Risks Factors, IntechOpen, 57-75.
- Durães, F., Pinto, M., and Sousa, E. (2018). Old drugs as new treatments for neurodegenerative diseases. *Pharmaceuticals*, 11(2), 1–21.
- Ebrahimi, Z., Talaei, S., Aghamiri, S., Goradel, N. H., Jafarpour, A., and Negahdari, B. (2020). Overcoming the blood-brain barrier in neurodegenerative disorders and brain tumours. *IET Nanobiotechnology*, 14(6), 441–448.
- Eldufani, J., and Blaise, G. (2019). The role of acetylcholinesterase inhibitors such as neostigmine and rivastigmine on chronic pain and cognitive function in aging: A review of recent clinical applications. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*, Amsterdam: Elsevier., 5, 175–183.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., and Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95.
- Elufioye, T. O., Berida, T. I., and Habtemariam, S. (2017). Plants-Derived neuroprotective agents: cutting the cycle of cell death through multiple mechanisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1–27.
- Enayah, S. H., Vanle, B. C., Fuortes, L. J., Doorn, J. A., and Ludewig, G. (2018). PCB95 and PCB153 change dopamine levels and turn-over in PC12 cells. *Toxicology*, ,394, 93–101.
- Enciu, A. M., Nicolescu, M. I., Manole, C. G., Mureşanu, D. F., Popescu, L. M., and Popescu, B. O. (2011). Neuroregeneration in neurodegenerative disorders. *BioMed Central Neurology*, ,11(1), 75.
- Enciu S. K., Abraki, S. B., Amini, M., and Khodaghali, F. (2012). Modulation of H₂O₂-induced neurite outgrowth impairment and apoptosis in PC12 cells by a 1,2,4-triazine derivative. *Basic and Clinical Neuroscience*, 3(5), 49–60.
- 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.

- Eren, D., and Yalçın, I. (2020). Rasyonel ilaç tasarımı da moleküler mekanik ve moleküler dinamik yöntemlerin kullanılması amaçlı. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 44(2), 334–355.
- Ergin, V., Erdogan, M., and Menevse, A. (2016). Regulation of Shootin1 gene expression involves ngf-induced alternative splicing during neuronal differentiation of pc12 cells. *Scientific Reports*, Nature Publishing Group, 5(1), 17931.
- Ermak, G., and Davies, K. J. A. (2002). Calcium and oxidative stress: From cell signaling to cell death. *Molecular Immunology*, 38(10), 713–721.
- Eroymak, S., and Yiğit, V. (2017). Alzheimer hastalığının maliyet analizi. 29(4), 167–196.
- Félix, R., Valentão, P., Andrade, P. B., Félix, C., Novais, S. C., and Lemos, M. F. L. (2020). Evaluating the in vitro potential of natural extracts to protect lipids from oxidative damage. *Antioxidants*, 9(3), 1–29.
- Feng, B., Li, X., Xia, J., and Wu, S. (2017). Discovery of novel isoflavone derivatives as AChE/BuChE dual-targeted inhibitors: synthesis, biological evaluation and molecular modelling. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 968–977.
- Feng, Y., Wang, D., Wang, Q., Li, Z., Yang, S. L., Feng, Y. L., Luo, T., and Li, Y. (2021). Protective Effects and mechanism of hyperoside in PC12 cells against oxidative stress injury induced by hydrogen peroxide. *Natural Product Communications*, 16(5), 1934578X211015126.
- Feng, Y., and Wang, X. (2012). Antioxidant therapies for Alzheimer's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012, 472932.
- Fereshtehnejad, S. M., Vosoughi, K., Heydarpour, P., Sepanlou, S. G., Farzadfar, F., Tehrani-Banihashemi, A., Malekzadeh, R., Sahraian, M. A., Vollset, S. E., Naghavi, M., Vos, T., Feigin, V., Murray, C., Mokdad, A. H., and Moradi-Lakeh, M. (2019). Burden of neurodegenerative diseases in the Eastern Mediterranean Region, 1990–2016: findings from the Global Burden of Disease Study 2016. *European Journal of Neurology*, 26(10), 1252–1265.
- Fernandes, L. S., Dos Santos, N. A. G., Emerick, G. L., and Santos, A. C. Dos. (2017). L- and T-type calcium channel blockers protect against the inhibitory effects of mipafox on neurite outgrowth and plasticity-related proteins in SH-SY5Y cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 80(19–21), 1086–1097.
- Fleck, L. M. (2021). Alzheimer's and aducanumab: unjust profits and false hopes. *Hastings Center Report*, 51(4), 9–11.
- Frankel, S., Currie, D. A., Thompson, W. D., Giorgianni, S., Pietrowicz, E., Concannon, J., and Brusky, K. (2009). Arsenic exposure disrupts neurite growth and complexity in vitro. *NeuroToxicology*, 30(4), 529–537.
- Fricker, M., Tolkovsky, A. M., Borutaite, V., Coleman, M., and Brown, G. C. (2018). Neuronal cell death. *Physiological Reviews*, 98(2), 813–880.

- Fu, Y.-C., Zhang, Y., Tian, L.-Y., Li, N., Chen, X., Cai, Z.-Q., Zhu, C., and Li, Y. (2016). Effects of allocryptopine on outward potassium current and slow delayed rectifier potassium current in rabbit myocardium. *Journal of geriatric cardiology*, 13(4), 316–325.
- Galas, M. C., Dourlen, P., Bégard, S., Ando, K., Blum, D., Hamdane, M., and Buée, L. (2006). The peptidylprolyl cis/trans-isomerase Pin1 modulates stress-induced dephosphorylation of Tau in neurons: Implication in a pathological mechanism related to Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*, 281(28), 19296–19304.
- Gao, H.-M., and Hong, J.-S. (2008). Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends in immunology*, 29(8), 357.
- Gao, Y., Dong, C., Yin, J., Shen, J., Tian, J., and Li, C. (2012). Neuroprotective Effect of fucoidan on H_2O_2 -induced apoptosis in pc12 cells via activation of p13k/akt pathway. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 32(4), 523–529.
- García-Ayllón, M.-S., Small, D. H., Avila, J., and Sáez-Valero, J. (2011). Revisiting the role of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease: cross-talk with p-tau and β -amyloid. *Frontiers in molecular neuroscience*, 4, 22.
- Garcimartín, A., López-Oliva, M. E., González, M. P., Sánchez-Muniz, F. J., and Benedí, J. (2017). Hydrogen peroxide modifies both activity and isoforms of acetylcholinesterase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Redox Biology*, 12, 719–726.
- Gaschler, M. M., and Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 419–425.
- Gaschlara, M., and Stockwell, B. (2016). Lipid peroxidation in cell death. *Physiology & behavior*, 176(1), 139–148.
- Gassaway, M. M., Jacques, T. L., Kruegel, A. C., Karpowicz, R. J., Li, X., Li, S., Myer, Y., and Sames, D. (2016). Deconstructing the *Iboga* alkaloid skeleton: potentiation of fgf2-induced glial cell line-derived neurotrophic factor release by a novel compound. *ACS Chemical Biology*, 11(1), 77–87.
- Girdhar, S., Girdhar, A., Verma, S. K., Lather, V., Pandita, D., Ji, H. F., and Shen, L. (2015). Plant derived alkaloids in major neurodegenerative diseases : from animal models to clinical trials. *Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*, 1(3), 91–100.
- Gough, D. R., and Cotter, T. G. (2011). Hydrogen peroxide: A Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death and Disease*, 2(10), 1–8.
- Graham, W. V., Bonito-Oliva, A., and Sakmar, T. P. (2017). Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annual Review of Medicine*, 68(1), 413–430.
- Greco, I., Day, N., Riddoch-Contreras, J., Reed, J., Soininen, H., Kłoszewska, I., Tsolaki, M., Vellas, B., Spenger, C., Mecocci, P., Wahlund, L. O., Simmons, A., Barnes, J., and Lovestone, S. (2012). Alzheimer's disease biomarker discovery using *in silico* literature mining and clinical validation. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 1–10.

- Güven, G., Hanağası, H., Lohmann, E., Ünalıtuna, N. E., Gürvit, H., Aslan, R., Dönmez, Ç., and Bilgiç, B. (2021). Association between psen1 p.E318g variant and apoe polymorphism and Alzheimer disease in turkish patients. *Turk Noroloji Dergisi*, 27(2), 117–122.
- H. Ferreira-Vieira, T., M. Guimaraes, I., R. Silva, F., and M. Ribeiro, F. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the cholinergic system. *Current Neuropharmacology*, 14(1), 101–115.
- Haberlein, H., Tschiersch, K.-P., Boonen, G., and Hiller, K.-O. (1996). Chelidonium majus L.: Components with *in vitro* affinity for the GABAA Receptor. Positive cooperation of alkaloids. *Planta medica*, 62(03), 227–231.
- Habermehl, D., Kammerer, B., Handrick, R., Eldh, T., Gruber, C., Cordes, N., Daniel, P. T., Plasswilm, L., Bamberg, M., Belka, C., and Jendrossek, V. (2006). Proapoptotic activity of Ukrain is based on *Chelidonium majus* L. alkaloids and mediated via a mitochondrial death pathway. *BioMed Central Cancer*, 6, 1–22.
- Habtemariam, S. (2019). Natural products in Alzheimer's disease therapy: Would old therapeutic approaches fix the broken promise of modern medicines? *Molecules*, 24(8), 1–17.
- Hadipour, E., Tayarani-Najaran, Z., and Fereidoni, M. (2018). Vitamin K2 protects PC12 cells against A β (1-42) and H₂O₂-induced apoptosis via p38 MAP kinase pathway. *Nutritional Neuroscience*, 0(0), 1–10.
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *Journal of Neurochemistry*, 97(6), 1634–1658.
- Hampel, H. (2012). Current insights into the pathophysiology of Alzheimer's disease: Selecting targets for early therapeutic intervention. *International Psychogeriatrics*, 24(1), 10–17.
- Hampel, H., Mesulam, M. M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Cavado, E., Snyder, P. J., and Khachaturian, Z. S. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*, 141(7), 1917–1933.
- Han, A. M., Heo, H., and Kwon, Y. K. (2012). Berberine promotes axonal regeneration in injured nerves of the peripheral nervous system. *Journal of Medicinal Food*, 15(4), 413–417.
- Harder, E., Damm, W., Maple, J., Wu, C., Reboul, M., Xiang, J. Y., Wang, L., Lupyan, D., Dahlgren, M. K., Knight, J. L., Kaus, J. W., Cerutti, D. S., Krilov, G., Jorgensen, W. L., Abel, R., and Friesner, R. A. (2016). OPLS3: A force field providing broad coverage of drug-like small molecules and proteins. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(1), 281–296.
- Harrill, J. A., and Mundy, W. R. (2011). Quantitative assessment of neurite outgrowth in PC12 Cells. Humana Press, Totowa, NJ, 331–348.

- Hazekamp, A., Fishedick, J. T., Díez, M. L., Lubbe, A., and Ruhaak, R. L. (2010). Chemistry of cannabis. In H. Liu and L. Mander. *Comprehensive Natural Products I*. Amsterdam: Elsevier, 1033–1084.
- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., and Ma, X. (2017). Antioxidants Maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(2), 532–553.
- Hegazy, A. M., Azeem, A. A., Shahy, E. M., and El-Sayed, E. M. (2016). Comparative study of cholinergic and oxidative stress biomarkers in brains of diabetic and hypercholesterolemic rats. *Human and Experimental Toxicology*, 35(3), 251–258.
- Herrmann, R., Skaf, J., Roller, J., Polednik, C., Holzgrabe, U., and Schmidt, M. (2020). Anticancer effects of NSC-631570 (Ukraine) in head and neck cancer cells: In vitro analysis of growth, invasion, angiogenesis and gene expression. *Oncology Reports*, 43(1), 282–295.
- Hevener, K. E., and Avenue, M. (2019). Computational toxicology methods in chemical library design and high-throughput screening hit validation. *Computational Toxicology*, 275–285.
- Higgins, S., Lee, J. S., Ha, L., and Lim, J. Y. (2013). Inducing Neurite outgrowth by mechanical cell stretch. *BioResearch Open Access*, 2(3), 212–216.
- Holzgrabe, U., Kapková, P., Alptüzün, V., Scheiber, J., and Kugelmann, E. (2007). Targeting acetylcholinesterase to treat neurodegeneration. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 11(2), 161–179.
- Hong, H., and Liu, G. Q. (2007). Scutellarin protects PC12 cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Journal of Asian Natural Products Research*, 8(6), 471–479.
- Hoy, A. R., Ly, M., Carlsson, C. M., Okonkwo, O. C., Zetterberg, H., Blennow, K., Sager, M. A., Asthana, S., Johnson, S. C., Alexander, A. L., and Bendlin, B. B. (2017). Microstructural white matter alterations in preclinical Alzheimer's disease detected using free water elimination diffusion tensor imaging. *Public Library of Science*, 12(3), e0173982.
- Huang, J., Sun, C., Yao, D., Wang, C. Z., Zhang, L., Zhang, Y., Chen, L., and Yuan, C. S. (2018a). Novel surface imprinted magnetic mesoporous silica as artificial antibodies for efficient discovery and capture of candidate nNOS-PSD-95 uncouplers for stroke treatment. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(10), 1531–1542.
- Huang, Y. J., Cheng, P., Zhang, Z. Y., Tian, S. J., Sun, Z. L., Zeng, J. G., and Liu, Z. Y. (2018b). Biotransformation and tissue distribution of protopine and allocryptopine and effects of Plume Poppy Total Alkaloid on liver drug-metabolizing enzymes. In *Scientific Reports*, 8(1), 1–13.
- Huang, W. J., Zhang, X., and Chen, W. W. (2016a). Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomedical Reports*, 4(5), 519–522.
- Huang, Y., Xiao, D., Burton-freeman, B. M., and Edirisinghe, I. (2016b). *Chemical changes of bioactive phytochemicals during thermal processing*.

- Huang, S., Zhang, J. F., Chen, L., Gao, F., and Zhou, X. L. (2020). Diterpenoid alkaloids from *Aconitum anthoroideum* that offer protection against MPP⁺-Induced apoptosis of SH-SY5Y cells and acetylcholinesterase inhibitory activity. *Phytochemistry*, 178, 112459.
- Hur, J. Y., Lee, P., Kim, H., Kang, I., Lee, K. R., and Kim, S. Y. (2004). (-)-3,5-Dicaffeoyl-muco-quinic acid isolated from *Aster scaber* contributes to the differentiation of PC12 cells: through tyrosine kinase cascade signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(4), 948–953.
- Hussain, G., Huang, J., Rasul, A., Anwar, H., Imran, A., Maqbool, J., Razzaq, A., Aziz, N., Makhdoom, E. ul H., Konuk, M., and Sun, T. (2019). Putative Roles of plant-derived tannins in neurodegenerative and neuropsychiatry disorders: An updated review. *Molecules*, 24(12), 2213.
- Hussain, G., Rasul, A., Anwar, H., Aziz, N., Razzaq, A., Wei, W., Ali, M., Li, J., and Li, X. (2018a). Role of plant derived alkaloids and their mechanism in neurodegenerative disorders. *International Journal of Biological Sciences*, 14(3), 341–357.
- Hussain, R., Zubair, H., Pursell, S., and Shahab, M. (2018b). Neurodegenerative Diseases: Regenerative Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches. *Brain Sciences*, 8(9), 177–214.
- Hussein, R. A., and El-Anssary, A. A. (2019). Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. *Herbal medicine*, 1, 13, 11-31.
- Ighodaro, O. M., and Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293.
- Inoue, K. (2015). Genetic Risk Factors for Neurodegenerative Diseases. In K. Wada (Eds.) *Neurodegenerative disorders as systemic diseases*. Berlin: Springer, pp. 117-134.
- Iranshahy, M., Quinn, R. J., and Iranshahi, M. (2014). Biologically active isoquinoline alkaloids with drug-like properties from the genus *Corydalis*. *Royal Society of Chemistry Advances*, 4(31), 15900–15913.
- Isah, T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research*, 52(1), 1–25.
- Işık, M., and Beydemir, Ş. (2019). AChE mRNA expression as a possible novel biomarker for the diagnosis of coronary artery disease and Alzheimer's disease, and its association with oxidative stress. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 0(0), 1–8.
- İnternet 1: Cavazzoni, P. FDA's Decision to Approve New Treatment for Alzheimer's Disease. URL: <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fdas-decision-approve-new-treatment-Alzheimer-s-disease>, Son Erişim Tarihi: 01.10.2021.
- İnternet 2: Johns Hopkins Medicine. Early-Onset Alzheimer 's Disease. URL : <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/Alzheimer-s-disease/earlyonset-Alzheimer-disease>, Son Erişim Tarihi: 22.10.2021.

İnternet 3: Alzforum. APP. URL: <https://www.alzforum.org/mutations/app>, Son Erişim Tarihi 5.11. 2021.

İnternet 4: Alzheimer's Research UK. Answering your questions about aducanumab. URL:https://www.Alzheimer_sresearchuk.org/blog/answering-your-questions-about-aducanumab/, Son Erişim Tarihi 8.11. 2021.

İnternet 5: PubChem. Compound summary | Allocryptopine. URL:<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Allocryptopine>, Son Erişim Tarihi: 24.11.2021

Jantas, D., and Lasoń, W. (2021). Preclinical evidence for the interplay between oxidative stress and rip1-dependent cell death in neurodegeneration: State of the art and possible therapeutic implications. *Antioxidants*, 10(10), 1–24.

Jiang, F., Gao, R., Liu, H., Zhao, D., Xu, P., Zhang, L., and Qian, X. (2016). Neuroprotective effect of hyperoside on human PC12 cells against the oxidative damage. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 9(5), 5176–5183.

Jiang, H., Zhang, J., Zhu, H., Li, H., and Zhang, X. (2007). Nerve growth factor prevents the apoptosis-associated increase in acetylcholinesterase activity after hydrogen peroxide treatment by activating Akt. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(1), 46–56.

Jiang, Y., and Gao, H. (2019). Pharmacophore-based drug design for the identification of novel butyrylcholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. *Phytomedicine*, 54, 278–290.

Jiang, Y., Gao, H., and Turdu, G. (2017). Traditional Chinese medicinal herbs as potential AChE inhibitors for anti-Alzheimer's disease: A review. *Bioorganic Chemistry*, 75, 50–61.

Johnson, J. W., Glasgow, N. G., and Povysheva, N. V. (2015). Recent insights into the mode of action of memantine and ketamine. *Current Opinion in Pharmacology*, 20, 54–63.

Kabir, M. T., Sufian, M. A., Uddin, M. S., Begum, M. M., Akhter, S., Islam, A., Mathew, B., Islam, M. S., Amran, M. S., and Md. Ashraf, G. (2019a). NMDA Receptor antagonists: repositioning of memantine as a multitargeting agent for Alzheimer's therapy. *Current Pharmaceutical Design*, 25(33), 3506–3518.

Kabir, M. T., Uddin, M. S., Begum, M. M., Thangapandian, S., Rahman, M. S., Aleya, L., Mathew, B., Ahmed, M., Barreto, G. E., and Ashraf, G. M. (2019b). Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: multitargeting strategy based on anti-Alzheimer's drugs repositioning. *Current Pharmaceutical Design*, 25(33), 3519–3535.

Kametani, F., and Hasegawa, M. (2018). Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 25.

Karisetty, B. C., Bhatnagar, A., Armour, E. M., Beaver, M., Zhang, H., and Elefant, F. (2020). Amyloid- β peptide impact on synaptic function and neuroepigenetic gene control reveal new therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 1–8.

- Kawashiri, T., Shimizu, S., Shigematsu, N., Kobayashi, D., and Shimazoe, T. (2019). Donepezil ameliorates oxaliplatin-induced peripheral neuropathy via a neuroprotective effect. *Journal of Pharmacological Sciences*, 140(3), 291–294.
- Kerns, E. H., and Di, L. (2008). Rules for rapid property profiling from structure. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*, 1, 37–42.
- Khan, A. Y., and Suresh Kumar, G. (2015). Natural isoquinoline alkaloids: binding aspects to functional proteins, serum albumins, hemoglobin, and lysozyme. *Biophysical Reviews*, 7(4), 407–420.
- Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J., and Yoon, S. (2015). The Role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Experimental neurobiology*, 24(4), 325–40.
- Kim, S. H., and Kim, H. (2018). Inhibitory effect of astaxanthin on oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction-a mini-review. *Nutrients*, 10(9), 1137.
- Klebe, G. (2013). *Drug Design: Methodology, concepts, and mode-of-action*. Berlin: Springer, 1–901.
- Knorr, D. Y., Georges, N. S., Pauls, S., and Heinrich, R. (2020). Acetylcholinesterase promotes apoptosis in insect neurons. *Apoptosis*, 25(9–10), 730–746.
- Koçancı, F. G. (2018). Nöral Hastalıklarda Alternatif Bir İlaç Adayı Olabilecek *Glaucium corniculatum* Ekstraktlarının Apoptoz, İnflamasyon ve Asetilkolinesteraz (AChE)’i Baskılama Potansiyellerine Göre Etkilerinin Araştırılması. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 1-216.
- Koçancı, F. G., and Aslim, B. (2016). Structure and functions of acetylcholinesterase and acetylcholinesterase inhibitory activity of plants. *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*, 6(1), 19–35.
- Kocaturk, N., and Gozuacik, D. (2017). Otofaji ve Nörodejeneratif Hastalıklar. *Türkiye Klinikleri Farmakoloji Özel Dergisi (Nörodejeneratif Hastalıklarda Yeni Yaklaşımlar Özel Sayısı)*, 2017, 5(1), 11-20.
- Kolev, M., Ruseva, M., Harris, C., Morgan, B., and Donev, R. (2009). Implication of Complement system and its regulators in Alzheimer s disease. *Current Neuropharmacology*, 7(1), 1–8.
- Kong, Y. R., Tay, K. C., Su, Y. X., Wong, C. K., and Tan, W. N. (2021). Potential of naturally derived alkaloids as multi-targeted therapeutic agents for neurodegenerative diseases. *Molecules*, 26(3), 728
- Konrath, E. L., Passos, C. D. S., Klein-Júnior, L. C., and Henriques, A. T. (2013). Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer’s disease. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(12), 1701–1725.
- Korabecny, J., Zemek, F., Soukup, O., Spilovska, K., Musilek, K., Jun, D., Nepovimova, E., and Kuca, K. (2015). Pharmacotherapy of Alzheimer’s disease: Current state and future perspectives. In Atta-ur-Rahman and M. Choudhary (Eds.), *Drug Design and Discovery in Alzheimer’s Disease*. Amsterdam: Elsevier, pp. 3–39.

- Kosina, P., Gregorova, J., Gruz, J., Vacek, J., Kolar, M., Vogel, M., Roos, W., Naumann, K., Simanek, V., and Ulrichova, J. (2010). Phytochemical and antimicrobial characterization of *Macleaya cordata* herb. *Fitoterapia*, 81(8), 1006–1012.
- Kotradyová, K. (2018). Determinants characterizing the life of a caregiver treating an individual with Alzheimer's disease. *Kontakt*, 20(1), e72–e80.
- Küçükgül, A. (2016). The Antioxidant effects of *Ziziphus jujuba* on neurodegeneration. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 27(2), 108–112.
- Kulp, M., and Bragina, O. (2013). Capillary electrophoretic study of the synergistic biological effects of alkaloids from *Chelidonium majus* L. in normal and cancer cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(10), 3391–3397.
- Kurek, J. (2019). Introductory Chapter: Alkaloids - Their Importance in nature and for human life. *Alkaloids - Their Importance in Nature and Human Life*, 1–7.
- Kushwaha, M., Verma, S., and Chatterjee, S. (2016). Profenofos, an Acetylcholinesterase-inhibiting organophosphorus pesticide: a short review of its usage, toxicity, and biodegradation. *Journal of Environmental Quality*, 45(5), 1478–1489.
- Labrou Editor, N. E. (2020). *Targeting Enzymes for Pharmaceutical Development*. Berlin: Springer, 1–297.
- Lalli, G., Schott, J. M., Hardy, J., and De Strooper, B. (2021). Aducanumab: a new phase in therapeutic development for Alzheimer's disease? *EMBO Molecular Medicine*, 13(8), e14781.
- Lazarevic-Pasti, T., Leskovic, A., Momic, T., Petrovic, S., and Vasic, V. (2017). Modulators of acetylcholinesterase activity: From Alzheimer's disease to anti-cancer drugs. *Current Medicinal Chemistry*, 24(30), 3283–3309.
- Lee, J., Song, K., Huh, E., Oh, M. S., and Kim, Y. S. (2018). Neuroprotection against 6-OHDA toxicity in PC12 cells and mice through the Nrf2 pathway by a sesquiterpenoid from *Tussilago farfara*. *Redox Biology*, 18, 6–15.
- Lee, K. H., Cha, M., and Lee, B. H. (2020). Neuroprotective effect of antioxidants in the brain. *International Journal of Molecular Science*, 21(19), 7152.
- Lee, M. K. K., Lu, Yin and Di, L., and Xu, H. (2014). Protection of Tong-Sai-Mai decoction against apoptosis induced by H_2O_2 in PC12 cells: Mechanisms via Bcl-2-mitochondria-ROS-INOS pathway. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 371419.
- Li, C., Liu, Y., Fu, Y., Huang, T., Kang, L., and Li, C. (2017). The antiproliferative activity of di-2-pyridylketone dithiocarbamate is partly attributed to catalase inhibition: Detailing the interaction by spectroscopic methods. *Molecular BioSystems*, 13(9), 1817–1826.
- Li, J., Cao, F., Yin, H. liang, Huang, Z. jian, Lin, Z. tao, Mao, N., Sun, B., and Wang, G. (2020a). Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death and Disease*, 11(2), 1–13.

- Li, J., Li, B., Huang, H., Han, T., and Li, Y. (2019). Allocryptopine: A Review of Its Properties and Mechanism of Antiarrhythmic Effect. *Current Protein & Peptide Science*, 20(10), 996–1003.
- Li, R. L., Zhang, Q., Liu, J., Sun, J. Y., He, L. Y., Duan, H. X., Peng, W., and Wu, C. J. (2020b). Hydroxy- α -sanshool Possesses protective potentials on H₂O₂-stimulated pc12 cells by suppression of oxidative stress-induced apoptosis through regulation of PI3K/Akt Signal pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.
- Liang, C., Lejin, Sun, Liu, Z., Wang, H., and Xu, C. (2016). Protection afforded by quercetin against H₂O₂-induced apoptosis on PC12 cells via activating PI3K/Akt signal pathway. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 36(1), 98–102.
- Liao, K.-K., Wu, M.-J., Chen, P.-Y., Huang, S.-W., Chiu, S.-J., Ho, C.-T., and Yen, J.-H. (2012). Curcuminoids promote neurite outgrowth in pc12 cells through MAPK/ERK- and PKC-Dependent pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(1), 433–443.
- Lin, K., Liu, Y. Q., Xu, B., Gao, J. L., Fu, Y. C., Chen, Y., Xue, Q., and Li, Y. (2013). Allocryptopine and benzyltetrahydropalmatine block hERG potassium channels expressed in HEK293 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(6), 847–858.
- Lin, X., Wu, S., Wang, Q., Shi, Y., and Liu, G. (2016). Saikosaponin-D reduces H₂O₂ - induced PC12 cell apoptosis by removing ros and blocking MAPK-dependent Oxidative damage. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(8), 1365-1375.
- Linse, S., Scheidt, T., Bernfur, K., Vendruscolo, M., Dobson, C. M., Cohen, S. I. A., Sileikis, E., Lundqvist, M., Qian, F., O'Malley, T., Bussiere, T., Weinreb, P. H., Xu, C. K., Meisl, G., Devenish, S. R. A., Knowles, T. P. J., and Hansson, O. (2020). Kinetic fingerprints differentiate the mechanisms of action of anti-A β antibodies. *Nature Structural and Molecular Biology*, 27(12), 1125–1133.
- Liu, C.-C., Kanekiyo, T., Xu, H., and Bu, G. (2013a). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(2), 106–118.
- Liu, C. (2020). Targeting the cholinergic system in Parkinson's disease. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(4), 453–463.
- Liu, E. Y. L., Xu, M. L., Jin, Y., Wu, Q., Dong, T. T. X., and Tsim, K. W. K. (2018). Genistein, a phytoestrogen in soybean, induces the expression of acetylcholinesterase via g protein-coupled receptor 30 in PC12 Cells. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11(59), 1–11.
- Liu, H., Wu, J., Yao, J. Y., Wang, H., and Li, S. T. (2017a). The role of oxidative stress in decreased acetylcholinesterase activity at the neuromuscular junction of the diaphragm during sepsis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–6.
- Liu, L., Zeng, Z., Gaur, U., Fang, J., Little, P., and Zheng, P. (2017b). Berberine Protects against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in PC12 cells through activation of ERK1/2 pathway. *Clinical and Experimental Pharmacology*, 7(3), 1–6.

- Liu, M., Lin, Y. ling, Chen, X. R., Liao, C. C., and Poo, W. K. (2013b). In vitro assessment of *Macleaya cordata* crude extract bioactivity and anticancer properties in normal and cancerous human lung cells. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65(6), 775–787.
- Liu, T., Xia, Z., Zhang, W. W., Xu, J. R., Ge, X. X., Li, J., Cui, Y., Qiu, Z. B., Xu, J., Xie, Q., Wang, H., and Chen, H. Z. (2013c). Bis(9)-(-)-nor-meptazinol as a novel dual-binding AChEI potentially ameliorates scopolamine-induced cognitive deficits in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 104(1), 138–143.
- Liu, Z., Zhou, T. and, Ziegler, A. C., Dimitrion, P., and Zuo, L. (2017c). Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–11.
- Ludwiczuk, A., Skalicka-Wo'zniak, K., and Georgiev, M. I. (2017). Terpenoids. In S. Badal and R. Delgoda (Eds.), *Pharmacognosy Fundamentals, Applications and Strategies*. Amsterdam: Elsevier, pp. 233-266.
- Luo, T., Zhang, H., Zhang, W. W., Huang, J. T., Song, E. L., Chen, S. G., He, F., Xu, J., and Wang, H. Q. (2011). Neuroprotective effect of Jatrorrhizine on hydrogen peroxide-induced cell injury and its potential mechanisms in PC12 cells. *Neuroscience Letters*, 498(3), 227–231.
- Lv, R., Du, L., Lu, C., Wu, J., Ding, M., Wang, C., Mao, N., and Shi, Z. (2017). Allicin protects against H₂O₂-induced apoptosis of PC12 cells via the mitochondrial pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(3), 2053–2059.
- Ma, H., Wang, Y., Guo, T., He, Z., Chang, X., and Pu, X. (2009). Simultaneous determination of tetrahydropalmatine, protopine, and palmatine in rat plasma by LC-ESI-MS and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49(2), 440–446.
- Madhavan, L., Ourednik, V., and Ourednik, J. (2006). Increased “vigilance” of antioxidant mechanisms in neural stem cells potentiates their capability to resist oxidative stress. *Stem Cells*, 24(9), 2110–2119.
- Mandal, P., Sahoo, D., Saha, S., and Chowdhury, J. (2018). Sensing of Different human telomeric G-quadruplex dna topologies by natural alkaloid allocryptopine using spectroscopic techniques. *Journal of Physical Chemistry B*, 122(45), 10279–10290.
- Marasco, R. A. (2020). Current and evolving treatment strategies for the Alzheimer disease continuum. *American Journal of Managed Care*, 26(8), 171–183.
- Mazumder, M. K., Choudhury, S., and Borah, A. (2019). An *in silico* investigation on the inhibitory potential of the constituents of Pomegranate juice on antioxidant defense mechanism: Relevance to neurodegenerative diseases. *International Brain Research Organization Neuroscience Reports*, 6, 153–159.
- Melo, A., Monteiro, L., Lima, R. M. F., De Oliveira, D. M., De Cerqueira, M. D., and El-Bachá, R. S. (2011). Oxidative stress in neurodegenerative diseases: Mechanisms and therapeutic perspectives. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011, 1–14.

- Michaluk-Antkiewicz Lucyna, and Hans, R. (2013). *Isoquinolines and Beta-Carbolines as Neurotoxins and Neuroprotectants*, Berlin: Springer, 1-181.
- Mishra, P., Kumar, A., and Panda, G. (2019). Anti-cholinesterase hybrids as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease (1998–2018). *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 27(6), 895–930.
- Mitchell, P. J., Hanson, J. C., Quets-Nguyen, A. T., Bergeron, M., and Smith, R. C. (2007). A quantitative method for analysis of in vitro neurite outgrowth. *Journal of Neuroscience Methods*, 164(2), 350–362.
- Mojarad, T. B., and Roghani, M. (2014). The anticonvulsant and antioxidant effects of berberine in kainate-induced temporal lobe epilepsy in rats. *Basic and Clinical Neuroscience*, 5(2), 124–130.
- Molochkina, E. M., Zorina, O. M., Fatkullina, L. D., Goloschapov, A. N., and Burlakova, E. B. (2005). H₂O₂ modifies membrane structure and activity of acetylcholinesterase. *Chemico-Biological Interactions*, 157–158, 401–404.
- Moreira, R., Pereira, D. M., Valentão, P., and Andrade, P. B. (2018). Pyrrolizidine alkaloids: Chemistry, pharmacology, toxicology and food safety. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1668.
- Morteza-Semnani, K., Amin, G., Shidfar, M. R., Hadizadeh, H., and Shafiee, A. (2003). Antifungal activity of the methanolic extract and alkaloids of *Glaucium oxylobum*. *Fitoterapia*, 74(5), 493–496.
- Moslemnezhad, A., Mahjoub, S., and Moghadasi, M. (2016). Altered plasma marker of oxidative DNA damage and total antioxidant capacity in patients with Alzheimer's disease. *Caspian journal of internal medicine*, 7(2), 88.
- Niedzielska, E., Smaga, I., Gawlik, M., Moniczewski, A., Stankowicz, P., Pera, J., and Filip, M. (2016). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Molecular neurobiology*, Berlin: Springer, 53(6), 4094–4125.
- Nunomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E. K., Jones, P. K., Ghanbari, H., Wataya, T., Shimohama, S., Chiba, S., Atwood, C. S., Petersen, R. B., and Smith, M. A. (2001). Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60(8), 759–767.
- Obulesu, M., and Rao, D. M. (2019). Effect of plant extracts on Alzheimer's disease: An insight into therapeutic avenues. *Journal of Neurosciences in Rural Practice*, 2(1), 56–61.
- Oda, Y., Nakashima, S., Nakamura, S., Yano, M., Akiyama, M., Imai, K., Kimura, T., Nakata, A., Tani, M., and Matsuda, H. (2016). New potent accelerator of neurite outgrowth from *Lawsonia inermis* flower under non-fasting condition. *Journal of Natural Medicines*, 70(3), 384–390.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351–358.

- Omar, S. H. (2017). Biophenols: Impacts and prospects in anti-Alzheimer drug discovery. In G. Brahmachari (Eds.), *Discovery and Development of Neuroprotective Agents from Natural Products: Natural Product Drug Discovery*, Amsterdam: Elsevier, pp. 103–148.
- Orhan, I., Özçelik, B., Karaoğlu, T., and Şener, B. (2007a). Antiviral and antimicrobial profiles of selected isoquinoline alkaloids from *Fumaria* and *Corydalis* species. *Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 62(1–2), 19–26.
- Orhan, I., Özcelik, B., and Şener, B. (2007b). Antiviral and Antimicrobial Evaluation of Some Heterocyclic Compounds from Turkish Plants. In: Khan M.T.H. (Eds.), *Bioactive Heterocycles V*. Amsterdam: Elsevier, pp. 303–323.
- Orhan, I., and Şener, B. (2006). Lead compounds and drug candidates from some Turkish plants for human health. *Advances in Phytomedicine*, 2, 331–352.
- Orlowska, A., Perera, P. T., Al Kobaisi, M. A., Dias, A., Nguyen, H. K. D., Ghanaati, S., Baulin, V., Crawford, R. J., and Ivanova, E. P. (2017). The effect of coatings and nerve growth factor on attachment and differentiation of Pheochromocytoma Cells. *Materials*, 11(1), 1–10.
- Othman, S. Ben, and Yabe, T. (2015). Use of hydrogen peroxide and peroxy radicals to induce oxidative stress in neuronal cells. *Reviews in Agricultural Science*, 3, 40–45.
- Ou-Yang, S. S., Lu, J. Y., Kong, X. Q., Liang, Z. J., Luo, C., and Jiang, H. (2012). Computational drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(9), 1131–1140.
- Ozcan, T., Akpınar-Bayazit, A., Yilmaz-Ersan, L., and Delikanli, B. (2014). Phenolics in Human Health. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 5(5), 393–396.
- Padda, I. S., & Parmar, M. (2021). Aducanumab.
- Pan, C., Giraldo, G. S., Prentice, H., and Wu, J.-Y. (2010). Taurine protection of PC12 cells against endoplasmic reticulum stress induced by oxidative stress. *Journal of Biomedical Science*, 17(1), 1–7.
- Pandeya, K. B., Ganeshpurkar, A., and Mishra, M. K. (2020). Natural RNA dependent RNA polymerase inhibitors: Molecular docking studies of some biologically active alkaloids of *Argemone mexicana*. *Medical Hypotheses*, 144, 109905.
- Paolo, M., Papi, L., Gori, F., and Turillazzi, E. (2019). Natural products in neurodegenerative diseases: A great promise but an ethical challenge. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 5170.
- Paraoanu, L. E., and Layer, P. G. (2008). Acetylcholinesterase in cell adhesion, neurite growth and network formation. *FEBS Journal*, 275(4), 618–624.
- Peña-Bautista, C., Baquero, M., Vento, M., and Cháfer-Pericás, C. (2019). Free radicals in Alzheimer's disease: Lipid peroxidation biomarkers. *Clinica Chimica Acta*, 491(November 2018), 85–90.

- Petch, J., and Bressington, D. (2021). Aducanumab for Alzheimer's disease: The never-ending story that nurses should know. *Nursing Open*, 8(4), 1524–1526.
- Pihlstrøm, L., Wiethoff, S., and Houlden, H. (2018). Genetics of neurodegenerative diseases: an overview. *Handbook of Clinical Neurology*, 145, 309–323.
- Pinho, B. R., Ferreres, F., Valentão, P., and Andrade, P. B. (2013). Nature as a source of metabolites with cholinesterase-inhibitory activity: An approach to Alzheimer's disease treatment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(12), 1681–1700.
- Poovaiah, N., Davoudi, Z., Peng, H., Schlichtmann, B., Mallapragada, S., Narasimhan, B., and Wang, Q. (2018). Treatment of neurodegenerative disorders through the blood-brain barrier using nanocarriers. *Nanoscale*, 10(36), 16962–16983.
- Posner, J., Peterson, B. S., and Russell, J. A. (2008). Axon degeneration is key component of neuronal death in amyloid - β toxicity. *Bone*, 23(1), 1–7.
- Querobino, S. M., Ribeiro, C. A. J., and Alberto-Silva, C. (2018). Bradykinin-potentiating PEPTIDE-10C, an argininosuccinate synthetase activator, protects against H_2O_2 -induced oxidative stress in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Peptides*, 103, 90–97.
- Quinn, J. F., Raman, R., Thomas, R. G., Yurko-mauro, K., Nelson, E. B., Dyck, C. Van, Galvin, J. E., Jr, C. R. J., Weiner, M., Shinto, L., and Paul, S. (2012). Docosahexaenoic acid supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: A randomized trial. 304(2009), 1903–1911.
- Račková, L., Májeková, M., Košťálová, D., and Štefek, M. (2004). Antiradical and antioxidant activities of alkaloids isolated from Mahonia aquifolium. Structural aspects. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12(17), 4709–4715.
- Rafieipour, F., Hadipour, E., Emami, S. A., Asili, J., and Tayarani-Najaran, Z. (2019). Safranal protects against beta-amyloid peptide-induced cell toxicity in PC12 cells via MAPK and PI3 K pathways. *Metabolic Brain Disease*, 34(1), 165–172.
- Rajput, A., Sharma, R., and Bharti, R. (2021). Pharmacological activities and toxicities of alkaloids on human health. *Materials Today: Proceedings*.
- Rehbach, K., Kesavan, J., Hauser, S., Ritzenhofen, S., Jungverdorben, J., Schüle, R., Schöls, L., Peitz, M., and Brüstle, O. (2019). Multiparametric rapid screening of neuronal process pathology for drug target identification in HSP patient-specific neurons. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13.
- Reichel, A., and Lienau, P. (2015). Pharmacokinetics in drug discovery: An Exposure-centred approach to optimising and predicting drug efficacy and safety. *New approaches to drug discovery*, 235–260.
- Roca, C., Requena, C., Sebastián-Pérez, V., Malhotra, S., Radoux, C., Pérez, C., Martinez, A., Antonio Páez, J., Blundell, T. L., and Campillo, N. E. (2018). Identification of new allosteric sites and modulators of AChE through computational and experimental tools. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33(1), 1034–1047.

- Rocha-Roa, C., Molina, D., and Cardona, N. (2018). A perspective on thiazolidinone scaffold development as a new therapeutic strategy for toxoplasmosis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 360.
- Rodríguez-Fuentes, G., Rubio-Escalante, F. J., Noreña-Barroso, E., Escalante-Herrera, K. S., and Schlenk, D. (2015). Impacts of oxidative stress on acetylcholinesterase transcription, and activity in embryos of zebrafish (*Danio rerio*) following Chlorpyrifos exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part-C: Toxicology and Pharmacology*, 172, 19–25.
- Ross, C. A., and Poirier, M. A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature medicine*, 10(7), 10-7.
- Sahin, K., Zengin Kurt, B., Sonmez, F., and Durdagi, S. (2020). Novel AChE and BChE inhibitors using combined virtual screening, text mining and in vitro binding assays. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38(11), 3342–3358.
- Salman, M. M., Al-Obaidi, Z., Kitchen, P., Loreto, A., Bill, R. M., and Wade-Martins, R. (2021). Advances in Applying computer-aided drug design for neurodegenerative diseases mootaz. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4688.
- Salvadores, N., Gerónimo-Olvera, C., and Court, F. A. (2020). Axonal degeneration in AD: The contribution of A β and tau. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12, 1–16.
- Satou, T., Akao, N., Matsushashi, R., Koike, K., Fujita, K., and Nikaido, T. (2002a). Inhibitory effect of isoquinoline alkaloids on movement of second-stage larvae of *Toxocara canis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(12), 1651–1654.
- Satou, T., Koga, M., Matsushashi, R., Koike, K., Tada, I., and Nikaido, T. (2002b). Assay of nematocidal activity of isoquinoline alkaloids using third-stage larvae of *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*. *Veterinary Parasitology*, 104(2), 131–138.
- Scheltens, P., and Vijverberg, E. G. B. (2021). Aducanumab: Appropriate use recommendations. *The journal of prevention of Alzheimer 's disease*, 8(4), 412-413.
- Schrodinger. (2021a). Schrödinger Release 2021-4: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
- Schrodinger. (2021b). Schrödinger Release 2021-4: Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
- Schrodinger. (2021c). Schrödinger Release 2021-4: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
- Schulz, R., Emmrich, T., Lemmerhirt, H., Leffler, U., Sydow, K., Hirt, C., Kiefer, T., Link, A., and Bednarski, P. J. (2012). Identification of a glutathione peroxidase inhibitor that reverses resistance to anticancer drugs in human B-cell lymphoma cell lines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22(21), 6712–6715.
- Selkoe, D. J. (2004). Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nature Cell Biology*, 6(11), 1054–1061.

- Selkoe, D. J. (2019). Alzheimer disease and aducanumab: adjusting our approach. *Nature Reviews Neurology*, 15(7), 365–366.
- Şener, B., and Orhan, İ. (2005). Discovery of drug candidates from some Turkish plants and conservation of biodiversity. *Pure and Applied Chemistry*, 77(1), 53–64.
- Shang, X. F., Yang, C. J., Morris-Natschke, S. L., Li, J. C., Yin, X. D., Liu, Y. Q., Guo, X., Peng, J. W., Goto, M., Zhang, J. Y., and Lee, K. H. (2020). Biologically active isoquinoline alkaloids covering 2014–2018. *Medicinal Research Reviews*, 40(6), 2212–2289.
- Shi, D. H., Wu, J. H., Ge, H. M., and Tan, R. X. (2009). Protective effect of hopeahainol A, a novel acetylcholinesterase inhibitor, on hydrogen peroxide-induced injury in PC12 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(1), 30–36.
- Siatka, T., Adamcová, M., Opletal, L., Cahlíková, L., Jun, D., Hrabínová, M., Kuneš, J., and Chlebek, J. (2017). Cholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibitory activities of alkaloids from argemone platyceras (Papaveraceae). *Molecules*, 22(7), 1–14.
- Siddappaji, K. K., and Gopal, S. (2021). Molecular mechanisms in Alzheimer's disease and the impact of physical exercise with advancements in therapeutic approaches. *Acharya Institute of Management and Sciences Neuroscience*, 8(3), 357–389.
- Sims, N. R., Bowen, D. M., Allen, S. J., Smith, C. C. T., Neary, D., Thomas, D. J., and Davison, A. N. (2003). The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. *Perspectives in Pharmacology*, 306(3), 821–827.
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., and Kukreti, S. (2019). Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*, 24(8), 1–20.
- Singh, S., Pathak, N., Fatima, E., and Negi, A. S. (2021). Plant isoquinoline alkaloids: Advances in the chemistry and biology of berberine. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 226, 113839.
- Sliwoski, G. R., Meiler, J., and Lowe, E. W. (2014). Computational methods in drug discovery prediction of protein structure and ensembles from limited experimental data view project antibody modeling, antibody design and antigen-antibody interactions view project. *Computational Methods in Drug Discovery*, 66(1), 334–95.
- Song, X. Y., Hu, J. F., Wu, D. H., Ji, H. J., and Chen, N. H. (2018). IMM-H004, a Novel coumarin derivative compound, inhibits H₂O₂-induced neurotoxicity via antioxidant and antiapoptosis in PC12 Cells. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 27(12), 3396–3403.
- Sözeri Varma, G., Kalkan Oğuzhanoğlu, N., Çulha Ateşci, F., Karagöz, N., ve Apa, F. (2018). Alzheimer hastasına bakım veren yakınlarında psikodramatik grup terapisi. *Anadolu Psikiyatri Dergisi*, 19(6), 567–576.
- Stanciu, G. D., Luca, A., Rusu, R. N., Bild, V., Chiriac, S. I. B., Solcan, C., Bild, W., and Ababei, D. C. (2020). Alzheimer's disease pharmacotherapy in relation to cholinergic system involvement. *Biomolecules*, 10(1), 1–21.

- Strooper, B. (2007). Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *European Molecular Biology Organization Reports*, 8(2), 141–146.
- Su, L., Zhang, J., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., and Peng, Z. (2019). Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.
- Su, Y., Li, S., Li, N., Chen, L., Zhang, J., and Wang, J. (2011). Seven alkaloids and their antibacterial activity from *Hypocoum erectum* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(22), 5428–5432.
- Suganthi, N., Pandian, S. K., and Devi, K. P. (2009). Cholinesterase Inhibitors from Plants: Possible Treatment Strategy for Neurological Disorders. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 3, 87–103.
- Sun, K., Bai, Y., Zhao, R., Guo, Z., Su, X., Li, P., and Yang, P. (2019). Neuroprotective effects of matrine on scopolamine-induced amnesia via inhibition of AChE/BuChE and oxidative stress. *Metabolic Brain Disease*, 34(1), 173–181.
- Suthar, H., Verma, R. J., Patel, S., and Jasrai, Y. T. (2014). Green tea potentially ameliorates bisphenol A-induced oxidative stress: An in vitro and in silico study. *Biochemistry Research International*, 2014.
- Swamy, M. K. (2020). *Plant-derived bioactives: Chemistry and mode of action*. *Plant-derived Bioactives: Chemistry and Mode of Action*, Berlin:Springer, 85–117
- Şimşek, Y., Baran, S. S., and Aslım, B. (2021). In silico identification of SARS-CoV-2 cell entry inhibitors from selected natural antivirals. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 109, 108038.
- Tan, J., Li, Q.-X., and Evin, G. (2015). Effects of Mild and Severe Oxidative Stress on BACE1 Expression and APP Amyloidogenic Processing. In J. Castrillo and S. Oliver (Eds.), *Systems Biology of Alzheimer's Disease*, New York: Humana Press, pp. 101–116.
- Tan, Y., Deng, Y., and Qing, H. (2012). Calcium channel blockers and Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, 7(2), 137–140.
- Tang, C., Hong, J., Hu, C., Huang, C., Gao, J., Huang, J., Wang, D., Geng, Q., and Dong, Y. (2021). Palmatine Protects against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury by Activation of the AMPK/Nrf2 Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021.
- Tao, Y., Xu, H., Wang, S., Wang, B., Zhang, Y., Wang, W., Huang, B., Wu, H., Li, D., Zhang, Y., Xiao, X., Li, Y., Yang, H., and Huang, L. (2013). Identification of the absorbed constituents after oral administration of Yuanhu Zhitong prescription extract and its pharmacokinetic study by rapid resolution liquid chromatography/quadrupole time-of-flight. *Journal of Chromatography B*, 935, 1–9.

- Taso, O. V., Philippou, A., Moustogiannis, A., Zevolis, E., and Koutsilieris, M. (2019). Lipid peroxidation products and their role in neurodegenerative diseases. *Annals of Research Hospitals*, 3(4), 2–2.
- Teixeira, J. P., de Castro, A. A., Soares, F. V., da Cunha, E. F. F., and Ramalho, T. C. (2019). Future therapeutic perspectives into the Alzheimer's disease targeting the oxidative stress hypothesis. *Molecules*, 24(23), 1–17.
- Telegina, D. V., Suvorov, G. K., Kozhevnikova, O. S., and Kolosova, N. G. (2019). Mechanisms of neuronal death in the cerebral cortex during aging and development of Alzheimer's disease-like pathology in rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5632.
- Terada, K., Migita, K., Matsushima, Y., Sugimoto, Y., Kamei, C., Matsumoto, T., Mori, M., Matsunaga, K., Takata, J., and Karube, Y. (2018). Cholinesterase inhibitor rivastigmine enhances nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells via sigma-1 and sigma-2 receptors. *Public Library of Science ONE*, 13(12), 1–16.
- Tönnies, E., and Trushina, E. (2017). Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(4), 1105–1121.
- Toomula, N., Sathish Kumar, D., Kumar, A., and Phaneendra, M. (2011). Role of pharmacokinetic studies in drug discovery. *Journal of Bioequivalence and Bioavailability*, 3(11), 263–267.
- Tsantili-Kakoulidou, A. (2005). Lipophilicity. *Encyclopedia of Chromatography, Second Edition*, 993–998.
- Vacek, J., Walterová, D., Vrublová, E., and Šimánek, V. (2010). The chemical and biological properties of protopine and allocryptopine. *Heterocycles*, 81(8), 1773–1789.
- Valis, M., Herman, D., Vanova, N., Masopust, J., Vysata, O., Hort, J., Pavelek, Z., Klimova, B., Kuca, K., Misik, J., and Karasova, J. Z. (2019). The concentration of memantine in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients and its consequence to oxidative stress biomarkers. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1–8.
- Vallés, A. S., Borroni, M. V., and Barrantes, F. J. (2014). Targeting brain $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease: Rationale and current status. *Central Neural System Drugs*, 28(11), 975–987.
- Veeraragavan, V., Radhakrishnan, N., and Chidambaram, R. (2017). Molecular docking analysis of imidazole derivatives and polybenzimidazole analogs as inhibitors of superoxide dismutase (SOD) and xanthine oxidase (XO). Paper presented at the 2017 IEEE International Conference on Smart Technologies and Management for Computing, Communication, Controls, Energy and Materials, 513–516.
- Venkatesan, R., Subedi, L., Yeo, E. J., and Kim, S. Y. (2016, 2-4 August). Lactucopicrin ameliorates oxidative stress mediated by scopolamine-induced neurotoxicity through activation of the NRF2 pathway. *Neurochemistry International*, 99, 133–146.

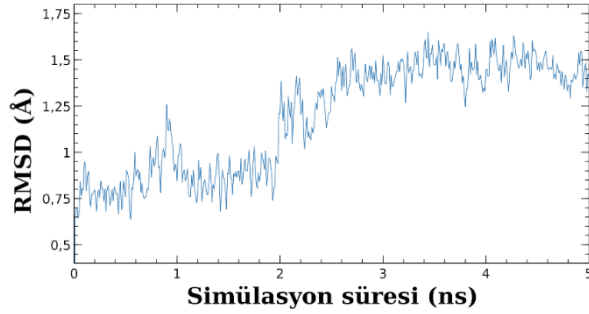
- Verulava, T., Grdzlishvili, A., Magaldadze, M., Makharashvili, A., Chibukhaia, G., Jorbenadze, R., and Dangadze, B. (2018). Social problems of Alzheimer patients and their family members. *Home Health Care Management and Practice*, 30(4), 175–178.
- Vijayakumar, S., Manogar, P., Prabhu, S., and Sanjeevkumar Singh, R. A. (2018). Novel ligand-based docking; molecular dynamic simulations; and absorption, distribution, metabolism, and excretion approach to analyzing potential acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 8(6), 413–420.
- Vo, Q. V., Nam, P. C., Thong, N. M., Trung, N. T., Phan, C. T. D., and Mechler, A. (2019). Antioxidant motifs in flavonoids: O–H versus C–H bond dissociation. *American Chemical Society Omega*, 4(5), 8935–8942.
- Vrba, J., Vrublova, E., Modriansky, M., and Ulrichova, J. (2011). Protopine and allocryptopine increase mRNA levels of cytochromes P450 1A in human hepatocytes and HepG2 cells independently of AhR. *Toxicology Letters*, 203(2), 135–141.
- Wang, M., Zhang, Z., Cheang, L. C.-V., Lin, Z., and Lee, S. M.-Y. (2011). Eriocaulon buergerianum extract protects PC12 cells and neurons in zebrafish against 6-hydroxydopamine-induced damage. *Chinese medicine*, 6(1), 1–10.
- Wang, Y., Liu, Q., Xu, Y., Zhang, Y., Lv, Y., Tan, Y., Jiang, N., Cao, G., Ma, X., Wang, J., Cao, Z., Yu, B. Y., and Kou, J. P. (2016). Ginsenoside Rg1 protects against oxidative stress-induced neuronal apoptosis through myosin IIA-actin related cytoskeletal reorganization. *International Journal of Biological Sciences*, 12(11), 1341–1356.
- Wiart, C. (2014). Alkaloids. In C. Wiart (Eds.), *Lead Compounds from Medicinal Plants for the Treatment of Neurodegenerative Diseases*. Amsterdam: Elsevier, pp. 1-188.
- Wink, M. (2015). Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines*, 2(3), 251–286.
- Wojtunik-Kulesza, K. A., Cieřła, L. M., and Waksmundzka-Hajnos, M. (2018). Approach to determination a structure – antioxidant activity relationship of selected common terpenoids evaluated by abts•+ radical cation assay. *Natural Product Communications*, 13(3), 295–298.
- Wong, K. Y., Roy, J., Fung, M. L., Heng, B. C., Zhang, C., and Lim, L. W. (2020). Relationships between mitochondrial dysfunction and neurotransmission failure in Alzheimer's disease. *Aging and Disease*, 11(5), 1291–1316.
- Wu, Y., Shang, Y., Sun, S., Liang, H., and Liu, R. (2007). Erythropoietin prevents PC12 cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis via the Akt/GSK-3 β /caspase-3 mediated signaling pathway. *Apoptosis*, 12(8), 1365–1375.
- Xiao, X., Liu, J., Hu, J., Zhu, X., Yang, H., Wang, C., and Zhang, Y. (2008). Protective effects of protopine on hydrogen peroxide-induced oxidative injury of PC12 cells via Ca²⁺ antagonism and antioxidant mechanisms. *European Journal of Pharmacology*, 591(1–3), 21–27.

- Xie, Y., Li, J., Kang, R., and Tang, D. (2020). Interplay Between Lipid Metabolism and Autophagy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 431.
- Xiong, A., Yan, A. L., Bi, C. W. C., Lam, K. Y. C., Chan, G. K. L., Lau, K. K. M., Dong, T. T. X., Lin, H., Yang, L., Wang, Z., and Tsim, K. W. K. (2016). Clivorine, an otonecine pyrrolizidine alkaloid from *Ligularia* species, impairs neuronal differentiation via NGF-induced signaling pathway in cultured PC12 cells. *Phytomedicine*, 23(9), 931-938.
- Xu, B., Fu, Y., Liu, L., Lin, K., Zhao, X., Zhang, Y., Chen, X., Cai, Z., Huang, Y., and Li, Y. (2015). Effect of α -Allocryptopine on delayed afterdepolarizations and triggered activities in mice cardiomyocytes treated with isoproterenol. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- Xu, L., Chen, Y., Xie, H. Q. H., Xu, T., Fu, H., Zhang, S., Tsim, K. W. K., Bi, C. W. C., and Zhao, B. (2016a). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin suppress AChE activity in NGF treated PC12 cells. *Chemico-Biological Interactions*, 259, 282–285.
- Xu, Q. Q., Xu, Y. J., Yang, C., Tang, Y., Li, L., Cai, H. Bin, Hou, B. N., Chen, H. F., Wang, Q., Shi, X. G., and Zhang, S. J. (2016b). Sodium tanshinone 11a sulfonate attenuates scopolamine-induced cognitive dysfunctions via improving cholinergic system. *Biological Medicine Research International*, 2016.
- Yacoubian, T. A. (2016). Neurodegenerative Disorders: Why do we need new therapies?. In A. Adejare (Eds.), *Drug discovery approaches for the treatment of neurodegenerative disorders: Alzheimer's disease*, Amsterdam: Elsevier, pp. 1–16.
- Yamazaki, Y., Painter, M. M., Bu, G., and Kanekiyo, T. (2016). Apolipoprotein E as a Therapeutic Target in Alzheimer's Disease: A Review of Basic Research and Clinical Evidence. *Central Nervous System Drugs*, 30(9), 773–789.
- Yang, H., Mu, W., Wei, D., Zhang, Y., Duan, Y., Gao, J. xiao, Gong, X. qun, Wang, H. jie, Wu, X. li, Tao, H., and Chang, J. (2020). A novel targeted and high-efficiency nanosystem for combinational therapy for Alzheimer's disease. *Advanced Science*, 7(19), 1–13.
- Yang, Y., and Wang, J. Z. (2018). Nature of tau-associated neurodegeneration and the molecular mechanisms. *Journal of Alzheimer's Disease*, 62(3), 1305–1317.
- Ye, T., Fu, A. K., and Ip, N. Y. (2012). Cyclin-dependent kinase 5 in axon growth and regeneration. *International review of neurobiology*, 105, 91-115.
- Yumru, M., Savas, H. A., Kalenderoglu, A., Bulut, M., Celik, H., and Erel, O. (2009). Oxidative imbalance in bipolar disorder subtypes: A comparative study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(6), 1070–1074.
- Yurtkap, O., and Arslan, B. (2018). Axonal transport in neurodegenerative diseases. *The Journal of Neurobehavioral Sciences*, 5(2), 115–123.

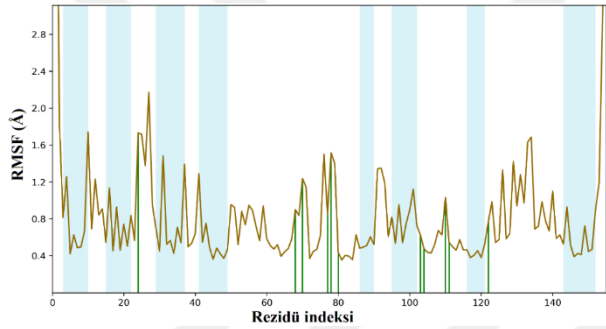
- Zambrano, P., Suwalsky, M., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K., Sepúlveda, B., and Gallardo, M. J. (2019). The acetylcholinesterase (AChE) inhibitor and anti-Alzheimer drug donepezil interacts with human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1861(6), 1078–1085.
- Zare-Shahabadi, A., Masliah, E., Johnson, G. V., and Rezaei, N. (2015). Autophagy in Alzheimer's Disease. *Reviews in the Neurosciences*, 26(4), 385-395
- Zeng, W., Rong, M., Hu, X., Xiao, W., Qi, F., Huang, J., and Luo, Z. (2014). Incorporation of chitosan microspheres into collagen-chitosan scaffolds for the controlled release of nerve growth factor. *Public Library of Science ONE*, 9(7).
- Zhang, C., Li, C., Chen, S., Li, Z., Jia, X., Wang, K., Bao, J., Liang, Y., Wang, X., Chen, M., Li, P., Su, H., Wan, J. B., Lee, S. M. Y., Liu, K., and He, C. (2017). Berberine protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in PC12 cells and zebrafish through hormetic mechanisms involving PI3K/AKT/Bcl-2 and Nrf2/HO-1 pathways. *Redox Biology*, 11, 1–11.
- Zhang, J., Chen, Y., Yang, J., Xu, B., Wen, Y., Xiang, G., Wei, G., Zhu, C., Xing, Y., and Li, Y. (2015). Electrophysiological and trafficking defects of the SCN5A T353I mutation in Brugada syndrome are rescued by alpha-allocryptopine. *European Journal of Pharmacology*, 746, 333-343.
- Zhao, T., Ding, K. M., Zhang, L., Cheng, X. M., Wang, C. H., and Wang, Z. T. (2013). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activities of β -carboline and quinoline alkaloids derivatives from the plants of genus *peganum*. *Journal of Chemistry*, 2013.
- Zhao, Y., and Zhao, B. (2013). Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013.
- Zhao, Z. (2019). Iron and oxidizing species in oxidative stress and Alzheimer's disease. *Aging Medicine*, 2(2), 82–87.
- Zheng, W. X., Wang, F., Cao, X. L., Pan, H. Y., Liu, X. Y., Hu, X. M., and Sun, Y. Y. (2014). Baicalin protects PC-12 cells from oxidative stress induced by hydrogen peroxide via anti-apoptotic effects. *Brain Injury*, 28(2), 227–234.
- Zhou, Q., Liu, Y., Wang, X., and Di, X. (2013). A sensitive and selective liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of five isoquinoline alkaloids from *Chelidonium majus* L. in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Mass Spectrometry*, 48(1), 111–118.
- Zhu, Y., Peng, L., Hu, J., Chen, Y., and Chen, F. (2019). Current anti-Alzheimer's disease effect of natural products and their principal targets. *Journal of integrative neuroscience*, 18(3), 327–339.
- Ziganshin, A. U., Khairullin, A. E., Hoyle, C. H. V., and Grishin, S. N. (2020). Modulatory roles of ATP and adenosine in cholinergic neuromuscular transmission. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 1–15.



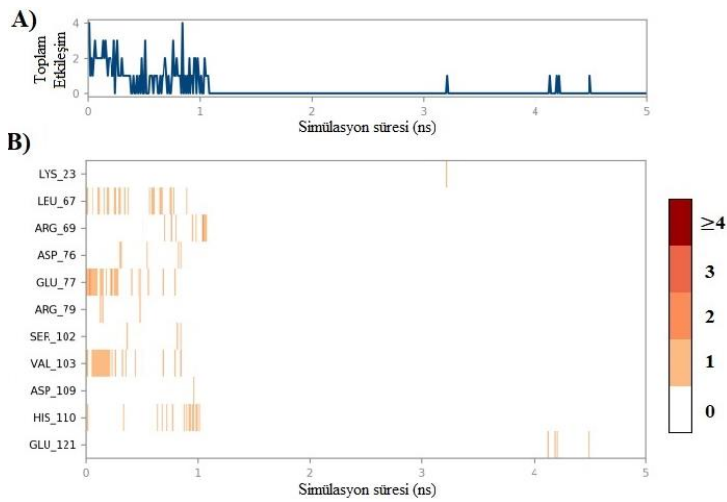
EK-1. Allokriptopin-SOD kompleksinin RMSD, RMSF değerleri ve toplam etkileşim haritası



Şekil 1.1. S izomerli SOD enziminin Cα atomlarına göre hesaplanan RMSD değerleri

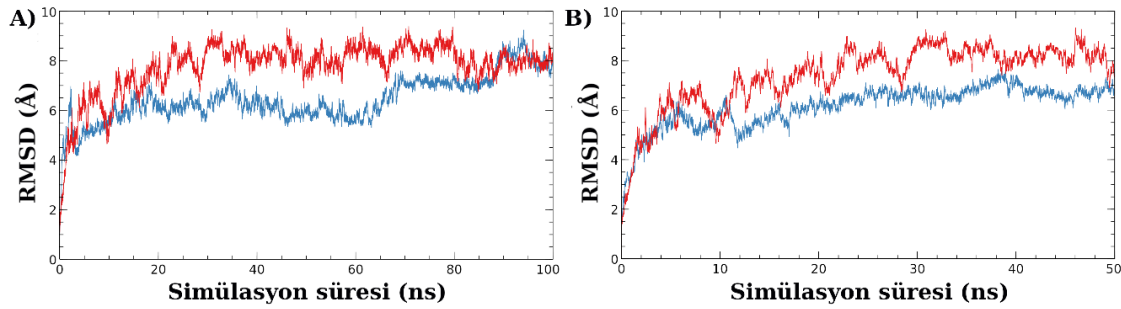


Şekil 1.2. S izomerli SOD enziminin ağır atomlarına göre hesaplanan RMSF değerleri. Mavi kalın çubuklar kristal yapısındaki beta şeritleri, beyaz zeminler döngü bölgelerini temsil etmektedir. Yeşil çizgiler ise allokriptopin ile etkileşime giren rezidüleri ifade etmektedir

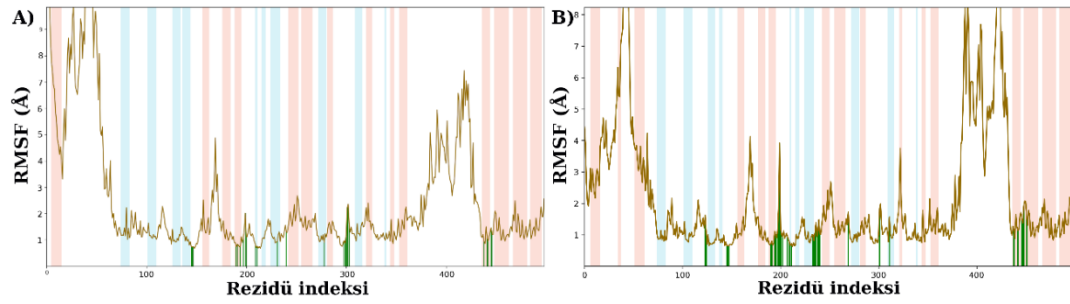


Şekil 1.3. Allokriptopinin S izomeri ile SOD enzimi arasındaki etkileşimin zamansal değişimi, A) Simülasyon adımıdaki toplam etkileşim yoğunluğu, B) Etkileşime dâhil olan rezidülerin zamana göre değişimi. Etkileşimdeki bağ sayısı sağ taraftaki renk skalası ile belirtilmiştir

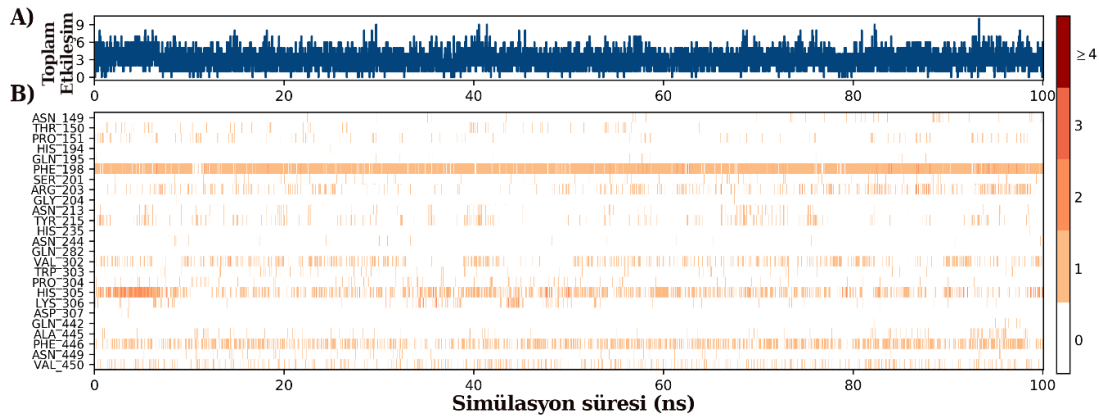
EK-2. Allokriptopin-KAT kompleksinin RMSD, RMSF değerleri ve toplam etkileşim haritası



Şekil 2.1. KAT enziminin Ca atomlarına göre hesaplanan RMSD değerleri, A) S izomeri ile birlikte 100 ns boyunca simüle edilen KAT enziminin RMSD değerleri, B) R izomeri ile birlikte 50 ns boyunca simüle edilen KAT enziminin RMSD değerleri. Mavi çizgiler allokriptopin-KAT kompleksinin RMSD değerini, kırmızılar ise KAT enziminin apo formuna ait RMSD değerini temsil etmektedir

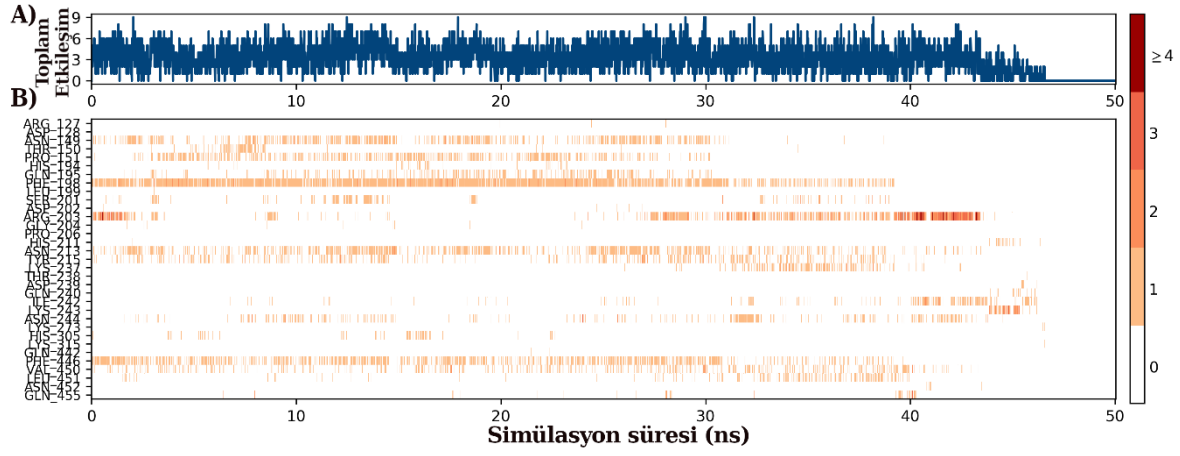


Şekil 2.2. KAT enziminin ağır atomlarına göre hesaplanan RMSF değerleri, Mavi kalın dik çubuklar kristal yapısındaki beta şeritleri, pembeler alfa sarmallarını, beyazlar ise döngü bölgelerini temsil etmektedir. Yeşil çizgiler ise allokriptopin ile etkileşime giren rezidüleri ifade etmektedir



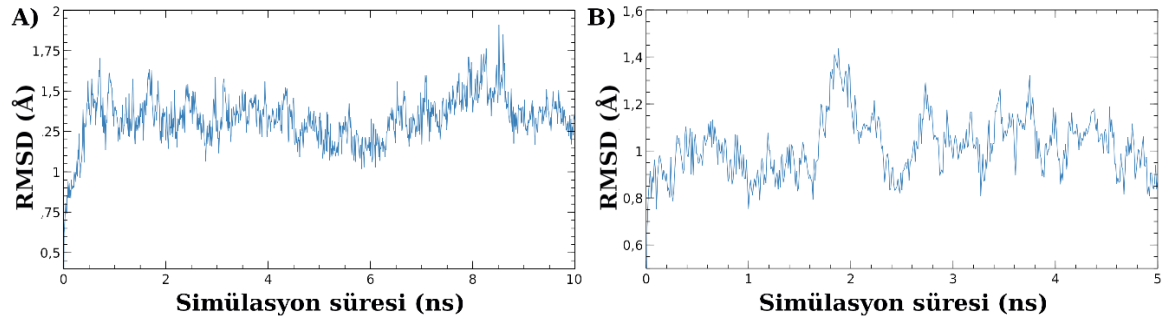
Şekil 2.3. Allokriptopinin S izomeri ile KAT enzimi arasındaki etkileşimin zamansal değişimi, A) 50 ns boyunca allokriptopin ile enzimin yaptığı toplam etkileşim sayısı, B) Etkileşime dâhil olan reziduların zamana göre değişimi. Etkileşimdeki bağ sayısı sağ taraftaki renk skalası ile belirtilmiştir

EK-2. (devam) Allokriptopin-KAT kompleksinin RMSD, RMSF değerleri ve toplam etkileşim haritası

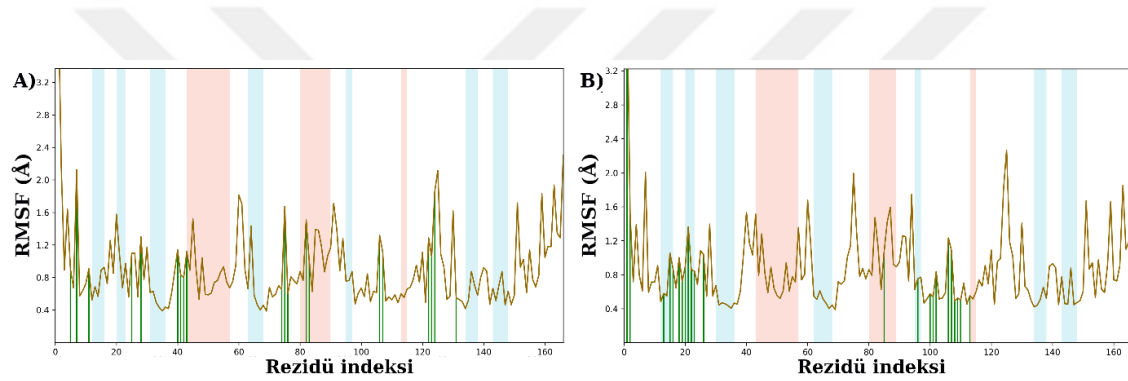


Şekil 2.4. Allokriptopinin R izomeri ile KAT enzimi arasındaki etkileşimin zamansal değişimi, A) 100 ns boyunca allokriptopin ile enzimin yaptığı toplam etkileşim sayısı, B) Etkileşime dâhil olan reziduların zamana göre değişimi. Etkileşimdeki bağ sayısı sağ taraftaki renk skalası ile belirtilmiştir

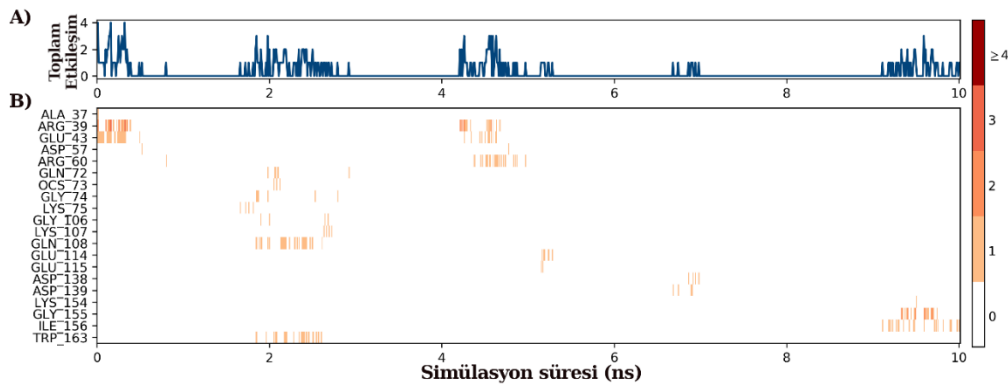
EK-3 Allokriptopin-GPx kompleksinin RMSD, RMSF değerleri ve toplam etkileşim haritası



Şekil 3.1. GPx enziminin Ca atomlarına göre hesaplanan RMSD değerler, A) S izomeri ile birlikte 5 ns. boyunca simüle edilen GPx enziminin RMSD değerleri, B) R izomeri ile birlikte 5 ns. boyunca simüle edilen GPx enziminin RMSD değerleri

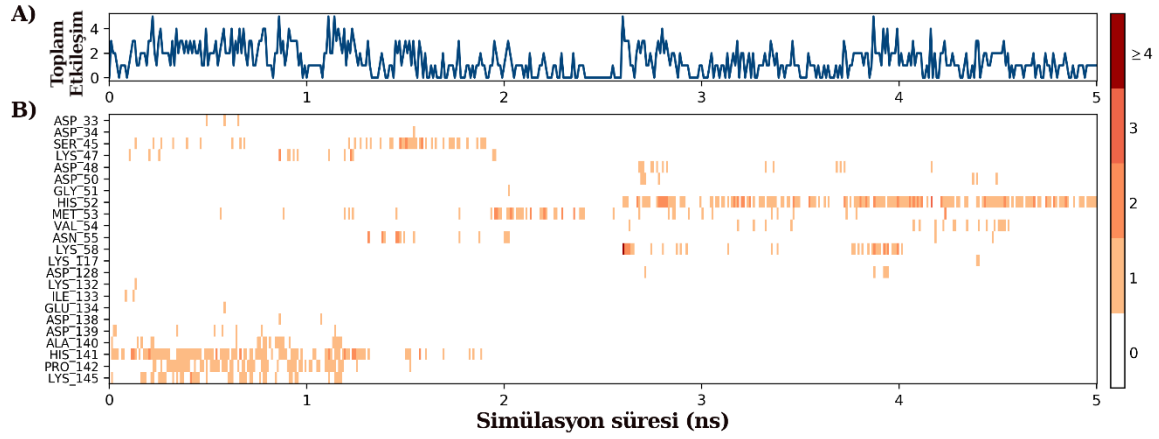


Şekil 3.2. GPx enziminin enzimin ağır atomlarına göre hesaplanan RMSF değerleri, A) S izomeri ile birlikte 5 ns. boyunca simüle edilen GPx enziminin RMSF değerleri, B) R izomeri ile birlikte 5 ns. boyunca simüle edilen GPx enziminin RMSF değerleri. Mavi kalın dik çubuklar kristal yapısındaki beta şeritleri, pembeler alfa sarmallarını, beyazlar ise döngü bölgelerini temsil etmektedir. Yeşil çubuklar ise allokriptopin ile etkileşime giren rezidüleri ifade etmektedir



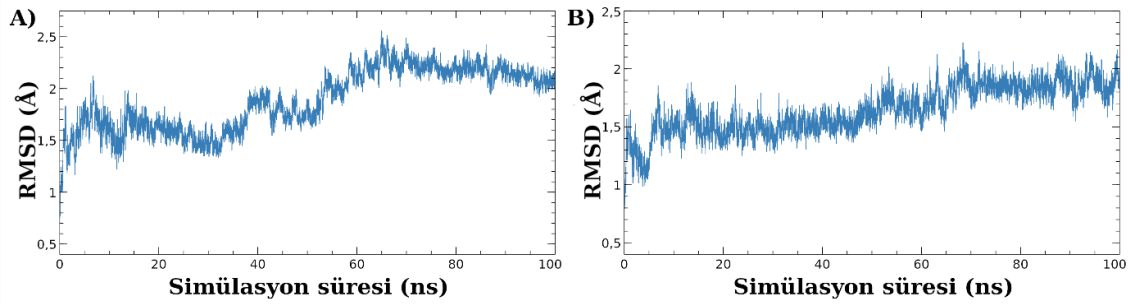
Şekil 3.3. Allokriptopinin S izomeri ile GPx enzimi arasındaki etkileşimin zamansal değişimi, A) 5 ns boyunca allokriptopin ile enzimin yaptığı toplam etkileşim sayısı, B) Etkileşime dâhil olan rezidüların zamana göre değişimi. Etkileşimdeki bağ sayısı sağ taraftaki renk skalası ile belirtilmiştir

EK-3. (devam) Allokriptopin-GPx kompleksinin RMSD, RMSF değerleri ve toplam etkileşim haritası

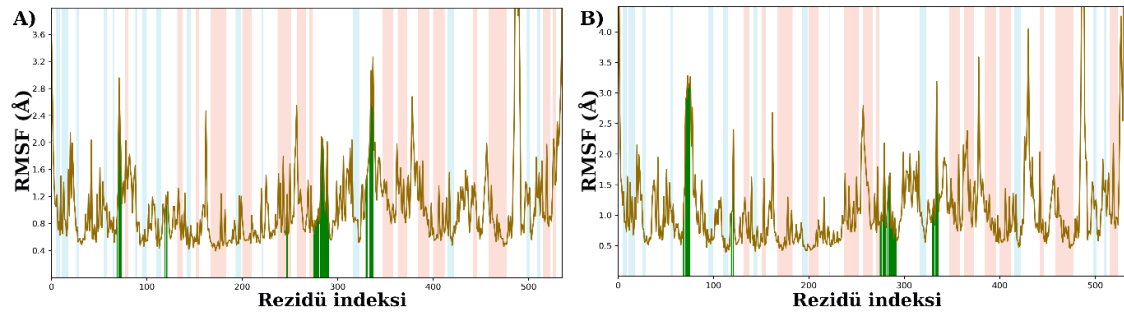


Şekil 3.4. Allokriptopinin R izomeri ile GPx enzimi arasındaki etkileşimin zamansal değişimi, A) 5 ns boyunca allokriptopin ile enzimin yaptığı toplam etkileşim sayısı, B) Etkileşime dâhil olan reziduların zamana göre değişimi. Etkileşimdeki bağ sayısı sağ taraftaki renk skalası ile belirtilmiştir

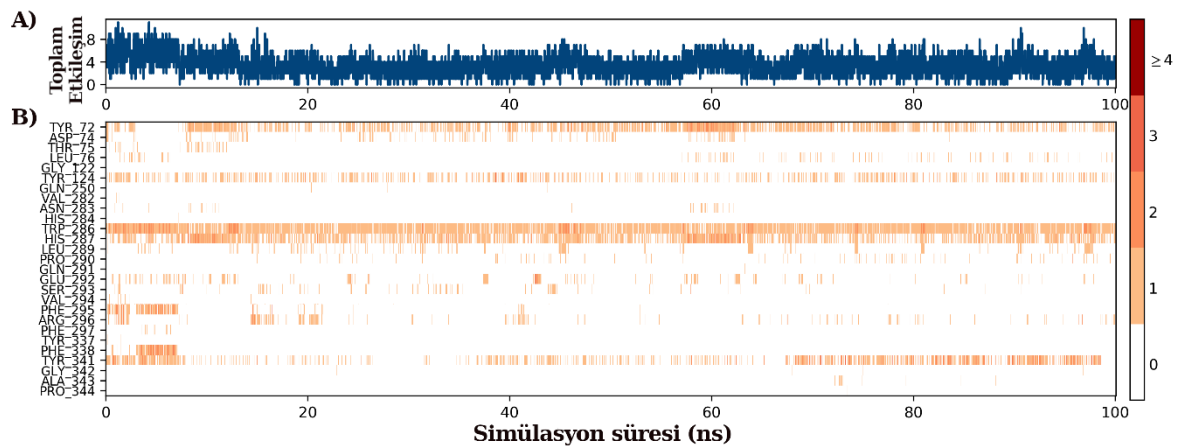
EK-4. Allokriptopin-AChE kompleksinin RMSD, RMSF değerleri ve toplam etkileşim haritası



Şekil 4.1. AChE enziminin C α atomlarına göre hesaplanan RMSD değerleri, A) S izomer ile birlikte MD simülasyonu gerçekleştirilen AChE'ye ait RMSD değerleri, B) R izomer ile birlikte MD simülasyonu gerçekleştirilen AChE'ye ait RMSD değerleri

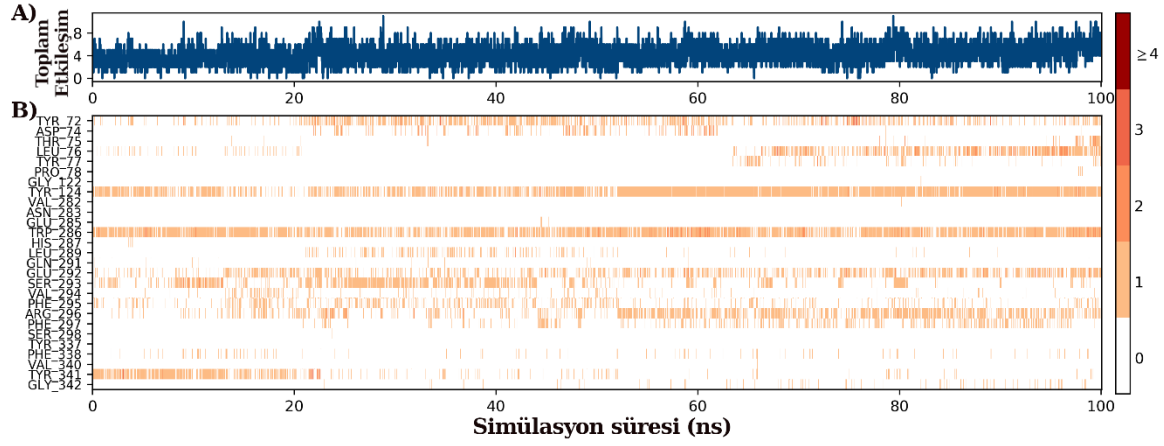


Şekil 4.2. AChE enzimin ağır atomlarına göre hesaplanan RMSF değerleri, A) S izomer ile birlikte MD simülasyonu gerçekleştirilen AChE'nin RMSF değerleri, B) R izomer ile birlikte MD simülasyonu gerçekleştirilen AChE'nin RMSF değerleri



Şekil 4.3. Allokriptopinin S izomeri ile AChE enzimi arasındaki etkileşimin zamansal değişimi, A) 100 ns boyunca S izomeri ile enzimin yaptığı toplam etkileşim sayısı göstermektedir, B) Etkileşime dâhil olan reziduların zamana göre değişimini ifade etmektedir. Etkileşimdeki bağ sayısının miktarı sağ taraftaki renk skalası ile belirtilmiştir

EK-4. (devam) Allokriptopin-AChE kompleksinin RMSD, RMSF değerleri ve toplam etkileşim haritası



Şekil 4.4. Allokriptopinin R izomeri ile AChE enziminin inhibitör bağlanma alanı arasındaki etkileşiminin zaman çizelgesi, A) 100 ns boyunca R izomeri ile enzimin yaptığı toplam etkileşim sayısı göstermektedir, B) Etkileşime dâhil olan reziduların zamana göre değişimini ifade etmektedir. Etkileşimdeki bağ sayısının miktarı sağ taraftaki renk skalası ile belirtilmiştir



GAZİ GELECEKTİR..