



**ARAŞIDONİK ASİT TÜREVLERİNİN HÜCRE
KÜLTÜRÜ VE SIÇANLARDA OLUŞTURULAN
DENEYSEL ALZHEİMER MODELLERİNDE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE MOLEKÜLER
MODELLEME**

Fatma YEŞİLYURT
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU

Doktora Tezi-2023



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

**ARAŞIDONİK ASİT TÜREVLERİNİN HÜCRE KÜLTÜRÜ
VE SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL
ALZHEİMER MODELLERİNDE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI VE MOLEKÜLER MODELLEME**

Fatma YEŞİLYURT

**Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU**

**ERZURUM
2023**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ	XIV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Alzheimer Hastalığı	4
2.1.1. Klinik Özellikleri	5
2.1.2. Epidemiyolojisi	6
2.1.3. Nöropatolojisi	7
2.1.3.1. Amiloid-Beta Plaklar	7
2.1.3.2. Nörofibriler Yumaklar	8
2.1.3.3. Nöronal Kayıp ve Atrofi	9
2.1.3.4. Enflamasyon ve Oksidatif Stres	9
2.1.4. Deneysel Alzheimer Modelleri	9
2.1.4.1. <i>İn vitro</i> Alzheimer Modelleri	10
2.1.4.2. <i>İn vivo</i> Alzheimer Modelleri.....	11
2.2. Çoklu Doymamış Yağ Asitleri	12
2.2.1. Araşidonik Asit	13
2.2.2. Araşidonik Asit Metabolizması	16
2.2.3. Nöroinflamasyon ve Araşidonik asit	17

2.3. Moleküler Modelleme Çalışmaları	18
2.4. Amidasyon Reaksiyonları	20
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1. Moleküler Modelleme Çalışmaları	21
3.2. Sentez Çalışmaları	21
3.2.1. Sentez Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar	21
3.2.2. Amidlerin Genel Sentez Yöntemi	22
3.2.3. Araşidonik Asitten Türetilen Amidlerin Sentezi (A Serisi) ve Spektrumları	23
3.2.3.1. A-1: (5Z,8Z,11Z,14Z)-1-(pirolidin-1-il)ikosa-5,8,11,14-tetraen-1-on'un Sentezi	23
3.2.3.2. A-2: (5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(3,4-dihidroksifenetil)ikosa-5,8,11,14-tetraenamid'in Sentezi	25
3.2.3.3. A-3: (5Z,8Z,11Z,14Z)-1-morfolinoikosa-5,8,11,14-tetraen-1-on'un Sentezi ...	27
3.2.3.4. A-4: (5Z,8Z,11Z,14Z)-N- heksilikosa-5,8,11,14-tetraenamid'in Sentezi	29
3.2.3.5. A-5: (5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(2-hidroksietil)ikosa-5,8,11,14-tetraenamid'in Sentezi	31
3.2.3.6. A-6: (5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(2-merkaptotetil)ikosa-5,8,11,14-tetraenamid'in Sentezi	33
3.2.3.7. A-7: (5Z,5'Z,8Z,8'Z,11Z,11'Z,14Z,14'Z)-N,N'-(etan-1,2-diil) bis(ikosa-5,8,11,14-tetraenamid)'in Sentezi	35
3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	37
3.3.1. SH-SY5Y Nöroblastoma Kültürü	37
3.3.2. Nöroblastoma Hücre Kültüründe Alzheimer Modeli Oluşturma	37
3.3.3. Sitotoksosite Analizi	39
3.3.4. Elisa Testleri	39

3.3.4.1. Total Oksidan Seviyeleri Testi	39
3.3.4.2. Total Antioksidan Seviyeleri Testi	40
3.3.4.3. Superoxide Dismutase Testi	40
3.3.4.4. Tümör Nekroz Faktör α Testi	40
3.4. Hayvan Deneyleri	40
3.4.1. Deney Grupları	40
3.4.2. Deney Hayvanlarında Alzheimer Modeli Oluşturma	42
3.4.2. Davranış Testleri.....	43
3.4.2.1. Lokomotor Aktivite Testi	43
3.4.2.2. Pasif sakınma Testi	45
3.4.2.3. Morris Water Mase Testi	46
3.4.3. Elisa Testleri	48
3.4.3.1. IL-6 Testi	48
3.4.3.2. PGE2 Testi.....	48
3.4.3.3. LXA4 Testi	48
3.5. Patolojik Çalışmalar.....	48
3.5.1. Histopatolojik Yöntem.....	48
3.5.2. İmmunohistokimyasal Yöntem.....	49
3.5.3. İn Situ Hibridizasyon Yöntemi	50
3.6. İstatistiksel Analizler	51
3.6.1. Hücre Kültürü ve Hayvan Deneylerinde Kullanılacak Testler için İstatistiksel Analiz	51
3.6.2. Patolojik Çalışmalar için İstatistiksel Analiz.....	51
4. BULGULAR.....	52
4.1. Moleküler Modelleme Bulguları	52

4.2. Sentez Çalışmalarının Deneysel ve Spektral Bulguları	54
4.3. Hücre Kültürü Bulguları	56
4.3.1. MTT Analizi	56
4.3.2. Elisa Testleri	57
4.3.2.1. TOS Testi	57
4.3.2.2. TAS Testi	58
4.3.2.3. SOD Testi	58
4.3.2.4. TNF- α Testi	59
4.4. Hayvan Deneyleri Bulguları	60
4.4.1. Lokomotor Aktivite Testi Sonuçları	60
4.4.2. Pasif Sakınma Testi Sonuçları	66
4.4.3. Morris Water Mase Test Sonuçları	68
4.4.4. IL-6 Test Sonuçları	74
4.4.5. PGE2 Test Sonuçları	75
4.4.6. LXA4 Test Sonuçları	75
4.6. Patolojik Bulgular	76
4.6.1. Histopatolojik Bulgular	76
4.6.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	78
4.6.3. İn situ Hibridizasyon Bulgular	82
5. TARTIŞMA	87
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	96
KAYNAKLAR	97
EKLER	114
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	114
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU	115

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca her alanda destekleyen, beni meslek yaşantıma eksiksiz olarak hazırlamak için büyük uğraş veren, bilgi, deneyim ve enerjisi ile her zaman yanımda olan, yalnızca akademik hayatta değil büyük sıkıntılar yaşadığım zorlu süreçte bile desteğini sürekli hissettiğim, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum ve her daim gurur duyacağım, danışmanım, hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet Hacımüftüoğlu'na tez çalışmam boyunca sağladığı sonsuz destek için teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora eğitimimin her aşamasında değerli fikirleriyle desteğini esirgemeyen, devamlı moral, destek ve enerji transferi yaparak sürekli çalışmamı sağlayan değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Ufuk Okkay ve Sayın Doç. Dr. Irmak Ferah Okkay'a içtenlikle şükranlarımı sunarım.

Moleküler docking çalışmaları için Sayın Doç. Dr. Abdulilal Ece'ye, Nature Lipid dergisi kurucu editörü ve yurtdışındaki danışmanım Sayın Undurti Narasimha Das'a, patoloji çalışmalarında ve her konuda değerli fikirleriyle daima destek veren hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa Özkaraca'ya, sentez çalışmalarında değerli bilgi ve birikiminden faydalandığım ve Organik Kimya alanında yıllardır örnek aldığım hocam Sayın Doç. Dr. Bilal Nişancı, asistan arkadaşım Ziya Dağalan'a, Fen Fakültesi Kimya Bölümü'ndeki hocalarım ve arkadaşlarıma, Farmakoloji anabilim dalının değerli öğretim üyelerine, ekip arkadaşlarım Dr. Ayşenur Budak Savaş, Öznur Altunlu ve Feyza Burul'a ve tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışmayı destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (proje numarası TDK-2021-9826) ve doktora eğitimimde maddi desteğinden dolayı YÖK 100/2000 Öncelikli Alan Programı'na kabulümü sağlayan Yükseköğretim Kurumu'na teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın tamamında yanımda olan bugünlere kadar getirip emek veren, fedakârlık yapan anneme ve babama, her daim destekçim ve yanımda olan canım kardeşlerime, yaşları çok küçük olmalarına rağmen sinirbilim ve hücre kültürü konusunda meraklı olarak yetişen yeğenlerime tüm içtenlikle teşekkür ediyorum ve hayatımda oldukları için şükrediyorum.

Doktora eğitimimin bittiğini göremeyen, kaybının çok ağır olduğu ve hala bir yerlerden bizi izlediğini düşündüğüm canım ablama ve bütün kadınlara doktora tezimi ithaf ediyorum.

Fatma YEŞİLYURT

ÖZET

Araşidonik Asit Türevlerinin Hücre Kültürü ve Sıçanlarda Oluşturulan Deneysel

Alzheimer Modellerinde Etkilerinin Araştırılması ve Moleküler Modelleme

Amaç: Alzheimer hastalığı (AH), nedeni kesin olarak bilinmeyen ve ilerleyen yaşla birlikte dünya nüfusunun önemli bir kısmında görüleceği tahmin edilmektedir. Ağrı süreci esas olarak amiloid plaklar, nörofibriller yumaklar ve beyindeki sinir bağlantılarının kaybı ile ilgilidir. Şu anda dünyada yaklaşık 50 milyon AH vakası olduğu tahmin edilmektedir. AA, siklooksijenaz ve lipoksijenaz, farklı yolların substratları olabilir ve inflamasyonu kontrol eden farklı araçlara yol açabilir. Bu pro-inflamatuar lipid araçlarının aksine, lipoksinler gibi diğer AA araçları iltihabı azaltabilir ve güçlü anti-inflamatuar etkilere sahip olabilir. Çalışmamız Alzheimer hastalığının *in vitro* ve *in vivo* modelleri üzerinde Araşidonik Asitten üretilen türevlerinin etkinliklerini değerlendirmeyi amaçlamaktadır.

Materyal ve Metot: İlk olarak tasarlanan araşidonik asitin amid türevlerinin moleküler modelleme ile Alzheimer hastalığında uyumlu olup olmadığı kontrol edilmiştir. Moleküler modellemeye olumlu sonuç alınan yeni amidler sentezlenmiştir. Daha sonra sentezlenen bu maddelere hücre kültüründe Alzheimer modeli yapılarak etkileri test edilmiştir. Hücre kültüründe etkili bulunan maddeler ise deney hayvanlarında Alzheimer modeli yapılarak denenmiştir.

Bulgular: Moleküler modellemeye göre yedi tane madde Alzheimerde hem COX-2 hemde 5-LOX'ta etkili bulundu. Bu maddeler sentezlenerek *invitro* Alzheimer modelinde test edildi ve iki tanesi çok etkili bulundu. Etkili bulunanlar *invivo* Alzheimer modelinde düşük ve yüksek doz olarak kullanıldı. Yapılan davranış testleri, biyokimyasal parametreler ve histopatolojik bulgular sonucunda maddelerden A-1 ve A-2 moleküllerinin yüksek dozlarında bütün testlerden olumlu sonuçlar alınmıştır.

Sonuç: Bu tez çalışmasında tasarımı, moleküler modellemesi, sentezi, *iv vitro* ve *in vivo* çalışmaları ile bir ilacın faz çalışmalarına girmeden önceki bütün aşamaları yapılmıştır. Araşidonik asitten sentezlenen bu yeni türevlerin Alzheimer hastalığına bir umut kaynağı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, amidasyon, araşidonik asit, moleküler modelleme

ABSTRACT

Molecular Modeling and Investigation of the Effects of Arachidonic Acid Derivatives in Cell Culture and Experimental Alzheimer's Disease Models in Rats

Aim: Alzheimer's disease (AD) is a disease of unknown cause and is estimated to affect a significant proportion of the world's population with advancing age. The pain process is mainly related to amyloid plaques, neurofibrillary tangles and loss of nerve connections in the brain. It is estimated that there are currently around 50 million cases of AD worldwide. AA, cyclooxygenase and lipoxygenase can be substrates of different pathways and lead to different mediators controlling inflammation. In contrast to these pro-inflammatory lipid mediators, other AA mediators such as lipoxins can reduce inflammation and have potent anti-inflammatory effects. Our study aims to evaluate the efficacy of Arachidonic Acid derivatives on *in vitro* and *in vivo* models of Alzheimer's disease.

Material and method: Firstly, we checked whether the designed amide derivatives of arachidonic acid are compatible with Alzheimer's disease by molecular modeling. New amides with positive results from molecular modeling were synthesized. Then, the effects of these synthesized substances were tested in Alzheimer's model in cell culture. The substances found to be effective in cell culture were tested in experimental animals using Alzheimer's model.

Results: According to molecular modeling, seven substances were found to be effective in both COX-2 and 5-LOX in Alzheimer's. These substances were synthesized and tested in an *in vitro* Alzheimer's model and two were found to be very effective. Those found effective were used in low and high doses in the *in vivo* Alzheimer's model. As a result of behavioral tests, biochemical parameters and histopathological findings, positive results were obtained from all tests at high doses of A-1 and A-2 molecules.

Conclusion: In this thesis, all stages of design, molecular modeling, synthesis, *in vitro* and *in vivo* studies of a drug before entering phase studies were carried out. It is thought that new derivatives synthesized from arachidonic acid may be a source of hope for Alzheimer's disease.

Key Words: Alzheimer's disease, amidation, arachidonic acid, molecular modeling

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

5-HPETE	:	5-Hidroksiyeikosatetraenoik asit
AA	:	Araşidonik Asit
AH	:	Alzheimer Hastalığı
APP	:	Amiloid Öncü Protein
ACh	:	Asetil kolin
Aβ	:	Amiloid β
cAMP	:	Siklik Adenozin Mono Fosfat
CDI	:	1,1'-karbonildiimidazol
ChAT	:	kolin asetiltransferaz
COX	:	Siklooksijenaz
CYP P450	:	Sitokrom P450
DHA	:	Dokosaheksaenoik asit
DMEM F-12	:	Dulbecco ile modifiye edilmiş kartal ortamı
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	:	Etilendiamin tetraasetik asit
eq	:	ekivalent
EPA	:	Eikosapentaenoik asit
FBS	:	Fetal Bovin Serum
iPSC	:	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
LA	:	Linoleik asit
LOX	:	Lipooksijenaz
LXA4	:	Lipoksin A4
MEM	:	Memantin

MSS	:	Merkezi Sinir Sistemi
MTT	:	3-(4,5-dimetiltiazol 2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NFY	:	Nörofibriler Yumak
NH2	:	Amino
OH	:	Hidroksil
PGE2	:	Prostaglandin E2
PGH2	:	Prostaglandin H2
PGI2	:	Prostasiklinler
PGT	:	Prostaglandin taşıyıcı
PLA2	:	Fosfolipaz A2
PSEN1	:	Presenilin 1
PSEN2	:	Presenilin 2
RA	:	Retinoik Asit
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	:	Süperoksit Dismutaz
STZ	:	Streptozosin
TAS	:	Total Antioksidan Seviyeleri
TNF-α	:	Tümör Nekroz Faktör- α
TOS	:	Total Oksidan Seviyeleri
TXA2	:	Tromboksan A2

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1. Amidasyon reaksiyon mekanizması.....	22
Şekil 3.2. A1'in ^1H -NMR spektrumu	24
Şekil 3.3. A1'in ^{13}C -NMR spektrumu	24
Şekil 3.4. A1'in QTOF-MS Spektrumu.....	25
Şekil 3.5. A2'nin ^1H -NMR spektrumu	26
Şekil 3.6. A2'nin ^{13}C -NMR spektrumu	26
Şekil 3.7. A2'nin QTOF-MS spektrumu	27
Şekil 3.8. A3'ün ^1H -NMR spektrumu.....	28
Şekil 3.9. A3'ün ^{13}C -NMR spektrumu	28
Şekil 3.10. A3'ün QTOF-MS spektrumu	29
Şekil 3.11. A4'ün ^1H -NMR spektrumu.....	30
Şekil 3.12. A4'ün ^{13}C -NMR spektrumu	30
Şekil 3.13. A4'ün QTOF-MS Spektrumu.....	31
Şekil 3.14. A5'in ^1H -NMR spektrumu	32
Şekil 3.15. A5'in ^{13}C -NMR spektrumu	32
Şekil 3.16. A5'in QTOF-MS spektrumu	33
Şekil 3.17. A6'nın ^1H -NMR spektrumu	34
Şekil 3.18. A6'nın ^{13}C -NMR spektrumu	34
Şekil 3.19. A6'nın QTOF-MS spektrumu	35
Şekil 3.20. A7'nin ^1H -NMR spektrumu	36
Şekil 3.21. A7'nin ^{13}C -NMR spektrumu	36
Şekil 3.22. A7'nin QTOF-MS spektrumu	37

Şekil 3.23. SH-SY5Y Nöroblastoma hücre hattı A) Model oluşturulmamış SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri B) RA ile muamele edilmiş Nöroblastoma hücreleri	39
Şekil 3.24. Deney Planı	41
Şekil 3.25. Stereotaksi cihazı.....	42
Şekil 3.26. Sıçanda STZ enjeksiyonu aşamaları.....	43
Şekil 3.27. Lokomotor aktivite ölçüm cihazı	44
Şekil 3.28. Pasif sakınma testi ölçüm cihazı	46
Şekil 3.29. Morris su labirenti tankı	47
Şekil 4.1. Schrödinger yazılımı kullanarak üretilmiş araşidonik asid'in 5-LOX ile yaptığı X-ışını iki boyutlu bağlanma etkileşimi.....	52
Şekil 4.2. Moleküler kenetleme sonucu hesaplanmış A1 (üst sol), AA19 (üst sağ) ve A2 (alt) bileşiklerinin 5-LOX ile yaptığı iki boyutlu ligand etkileşim diyagramı.	53
Şekil 4.3. Moleküler kenetleme sonucu hesaplanmış doğal ligand ve COX-2 etkileşimi.	53
Şekil 4.4. Moleküler kenetleme sonucu hesaplanmış A-6 (üst sol), A-2 (üst sağ) ve AA19 (alt) bileşiklerinin COX-2 ile yaptığı iki boyutlu ligand etkileşim diyagramı.	54
Şekil 4.6. TOS testi sonuçları	57
Şekil 4.7. TAS testi sonuçları.	58
Şekil 4.8. SOD testi sonuçları.....	59
Şekil 4.9. TNF- α testi sonuçları.....	60
Şekil 4.10. Tedavi Sonrası Locomotor Aktivite Testi Sonuçları.	62
Şekil 4.11. Kontrol grubuna ait örnek lokomotor aktivite haritası.....	63

Şekil 4.12. Alzheimer kontrol grubuna ait örnek lokomotor aktivite haritası.....	63
Şekil 4.13. Memantin grubuna ait örnek lokomotor aktivite haritası.....	64
Şekil 4.14. A-1D grubuna ait örnek lokomotor aktivite haritası	64
Şekil 4.15. A-1Y grubuna ait örnek lokomotor aktivite haritası	65
Şekil 4.16. A-2D grubuna ait örnek lokomotor aktivite haritası	65
Şekil 4.17. A-2Y grubuna ait örnek lokomotor aktivite haritası	66
Şekil 4.18. Tedavi Sonrası Pasif Sakınma 1. gün Test sonuçları.	67
Şekil 4.19. Tedavi Sonrası Pasif Sakınma 2. gün Test sonuçları.	68
Şekil 4.20. Tedavi sonrası ilk dört gün Water Mase test sonuçları.	70
Şekil 4.21. Platformun bulunduğu kadranda geçirilen süre grafiği.....	71
Şekil 4.22. Water Mase Testi Kontrol grubu örnek sıcaklık haritası	72
Şekil 4.23. Water Mase Testi ALZ Kontrol grubu örnek sıcaklık haritası.....	72
Şekil 4.24. Water Mase Testi MEM grubu örnek sıcaklık haritası	72
Şekil 4.25. Water Mase Testi A-1D grubu örnek sıcaklık haritası.....	73
Şekil 4.26. Water Mase Testi A-1Y grubu örnek sıcaklık haritası.....	73
Şekil 4.27. Water Mase Testi A-2D grubu örnek sıcaklık haritası.....	73
Şekil 4.28. Water Mase Testi A-2Y grubu örnek sıcaklık haritası.....	74
Şekil 4.29. IL-6 test sonuçları.....	74
Şekil 4.30. PGE2 test sonuçları.	75
Şekil 4.31. LXA4 test sonuçları.....	76
Şekil 4.32. Deney Gruplarının Histopatolojik değerlendirilmesi	78
Şekil 4.33. β -Amyloid immunpozitiflikler.	79
Şekil 4.34. Tau immunpozitiflikler.....	80
Şekil 4.35. AChE immupozitiflikler.....	82
Şekil 4.36. β -Amyloid mRNA ekspresyon düzeyleri.	83

Şekil 4.37. Tau mRNA ekspresyon düzeyleri.	84
Şekil 4.38. AChE mRNA ekspresyon düzeyleri.....	86



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Bileşiklerin sentezinde, saflaştırılmasında ve kimyasal analizlerinde kullanılan kimyasallar ve çözücüler.....	21
Tablo 3.2. β -amiloid, Tau ve Asetil kolin esteraz oligonükleotidleri	50
Tablo 4.1. 5-LOX ve COX-2'ye karşı doğal ligand and Araşidonik Asid türevleri için hesaplanan moleküler kenetleme skorları.	52
Tablo 4.2. Araşidonik asit türevlerinin sentezine ilişkin deneysel veriler	54
Tablo 4.3. Sentezlenen bileşiklerin ^1H -NMR verileri.....	55
Tablo 4.4. Sentezlenen bileşiklerin ^{13}C -NMR verileri.....	55
Tablo 4.5. Sentezlenen Bileşiklerin QTOF-MS verileri	56
Tablo 4.6. Nöronlarda görülen dejeneratif değişimlerin istatistiksel analizi.	77
Tablo 4.7. β -Amyloid ile yapılan immunohistokimyasal boyamaları.....	79
Tablo 4.8. Tau ile yapılan immunohistokimyasal boyamaları.	80
Tablo 4.9. AChE ile yapılan immunohistokimyasal boyamaları.	81
Tablo 4.10. β -Amyloid ile yapılan in situ hibridizasyon boyamaları.	83
Tablo 4.11. Tau ile yapılan in situ hibridizasyon boyamaları.....	84
Tablo 4.12. AChE ile yapılan in situ hibridizasyon boyamaları.	85

1. GİRİŞ

Merkezi sinir sisteminde (MSS) makrofaj olarak görev yapan ve moleküler sensörler olarak bilenen mikroglialar, doğumdan itibaren beyin bağışıklık sisteminde önemli bir yere sahiptir ve herhangi bir hasar oluştuğunda hızlıca aktive edilir (Quan ve ark., 2013). Bu gibi hayati durumlarda aktive edilen mikroglialar Alzheimer gibi birçok nörodejeneratif hastalıkların ortak patolojik özelliklerini temsil eder (Sarlus & Heneka, 2017).

Alzheimer hastalığı (AH), nedeni kesin olarak bilinmeyen ve ilerleyen yaşla birlikte dünya nüfusunun önemli bir kısmında görüleceği tahmin edilen bir hastalıktır (Esquerda-Canals ve ark., 2017). Alzheimer hastalığında beyin glutamat taşıyıcı fonksiyonlarında azalma görülür. Glutamat taşıyıcıların yetersiz işleyişi, sinaptik aralıkta aşırı glutamat birikimi ve eksitotoksik nöronal hasar ile sonuçlanabilir. Bu da Alzheimer hastalığında nöropatolojik belirti ve bilişsel düşüşe katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır.

Bunlara ek olarak beyinde Amiloid- β (A β) plakalarının hücre dışında birikimide çeşitli yollarda metabolik düzensizliklere sebep olmaktadır ve AH'nın başlamasına yol açan nörodejenerasyonun oluşması mümkündür (de la Monte & Tong, 2014). Bu sırada hücre içinde de Tau proteini toplanır ve AH'li bireylerin nöronlarında nörofibril yumaklar oluşur. Sonuçta hücre metabolit taşıma sistemi bozularak nöronlarda enerji açığı olur ve yeni sinapslar üretilmez (Patrick, 2019).

Bazı çoklu doymamış yağ asitleri beta amiloidleri temizler ve dolayısıyla AH'yi önler. Yaşlılıkla birlikte ortaya çıkan birçok hastalıkta beyindeki çoklu doymamış yağ asitleri metabolizmasındaki düzensizlikler ortaya çıkmıştır. Çoklu doymamış yağ asitleri ve metabolitleri, hücre zarının yapısında ve beyinde bulunmaları sebebiyle

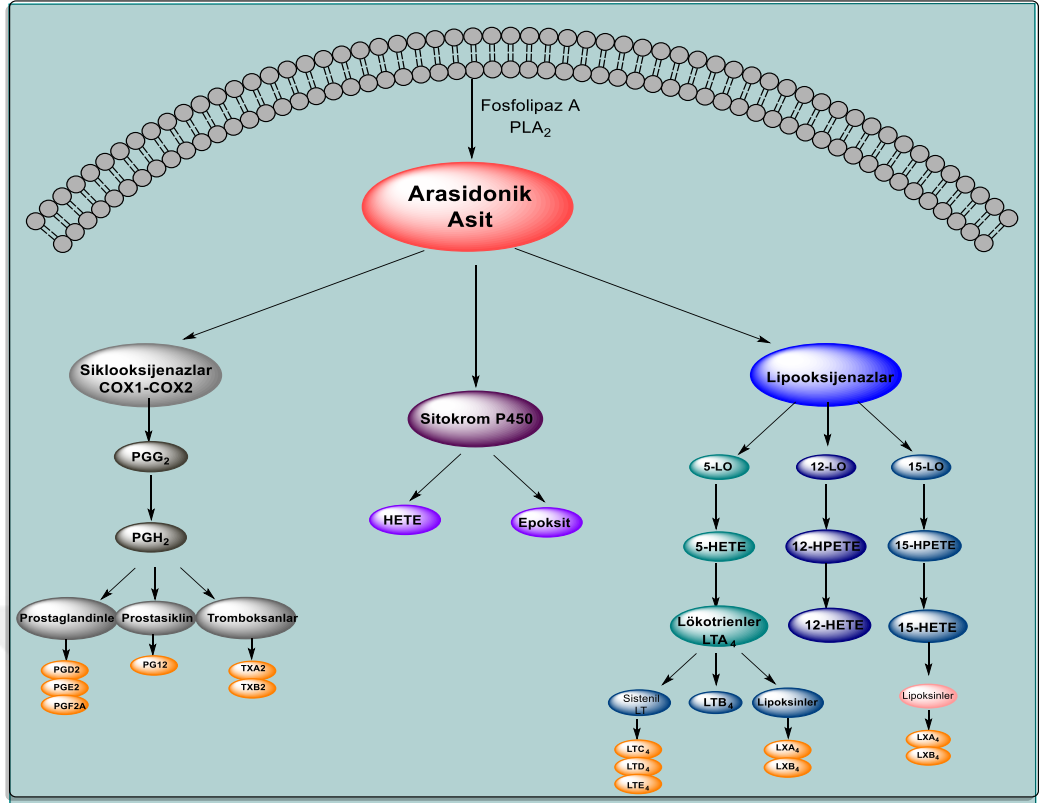
nöroinflamasyonu, nörotoksisiteyi ve oksidatif stresi düzenleyen önemli bileşenlerdir (Sanchez-Mejia & Mucke, 2010).

Yapısında bulunan çift bağın konumuna göre isimlendirilirken omega (ω) ucundan başlanmasıyla bu çoklu doymamış yağ asitlerine omega yağ asitleri denilmiştir. Bu omega yağ asitlerinde çift bağların olduğu kısımlarda hidrojen atomları *cis*- biçimde yönlendirilmiştir. Omega yağ asitlerinde (ω) 3-6 ve 9 pozisyonlarında çift bağlar bulunmaktadır (Ajith, 2018).

Araşidonik asit (AA), hücre zarının yapısında lipit formda bulunan bir ω -6 çoklu doymamış yağ asididir. Hücre stres altındayken hücre zarındaki fosfolipitlerden fosfolipaz A₂ (PLA₂) enzimi yardımıyla serbest AA salıverilir (Wang ve ark., 2019).

Serbest AA, inhibisyonun yanı sıra aktivasyon yoluyla iyon kanallarının, çeşitli reseptörlerin ve enzimlerin işlevini modüle eder. AA üç yolla vücutta metabolize edilir. Bunlar;

- Siklooksijenaz (COX) ile prostaglandin, prostasiklin ve tromboksanlara,
- Lipooksijenaz (LOX) ile lökotrienler ve lipoksinler,
- Sitokrom P450 (CYP-450) enzimi ile hidroksieikosatetraenoik asitler (HETE'ler) vücutta üretilir.



Şekil 1.1. Araşidonik asit metabolizması

AA'dan LOX enzimleri tarafından üretilen lipoksin A₄ (LXA₄) antiinflamatuvar etkiye sahiptir. Bu, anti-enflamatuar lipoksin A₄, çözücüler, koruyucular ve maresinlere yol açan AA vererek prostaglandin E₂ (PGE₂)'yi inhibe ederek başarılabilir. ω -6 yağ asitleri ve metabolitleri arasındaki dengesizliğin nörodejeneratif hastalıkları etkileyebileceğine inanılmaktadır (Poorani ve ark., 2016).

AH, proinflamatuvar PGE₂ içeren düşük dereceli sistemik inflamatuvar bir hastalıktır (Combrinck ve ark., 2006). Yaşlanan beyin, yaşa bağlı bilişsel gerilemede ve AH'nın yüksek prevalansında görülebilen iltihaplanmaya eğilimlidir. Böylelikle çoklu doymamış yağ asitleriyle demansın önemli nedenlerinden biri olan AH, durdurabilir hatta tersine çevrilebilir. AA ayrıca toksik madde değildir ve FDA tarafından onayı bulunmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı, ilerleyici bilişsel gerileme ve hafıza bozukluğu ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. Tüm vakaların yaklaşık %60-80'ini oluşturan en yaygın demans türüdür (Lopez & Kuller, 2019; Tahami Monfared ve ark., 2022). Alzheimer hastalığının kesin nedenleri hala tam olarak anlaşılamamıştır. Bununla birlikte, hastalığın gelişme olasılığını artırabilecek bilinen birkaç risk faktörü vardır. Bunlar arasında ileri yaş, ailede hastalık öyküsü, belirli genetik mutasyonlar, kardiyovasküler risk faktörleri (hipertansiyon ve diyabet gibi) ve sigara içmek ve fiziksel aktivite eksikliği gibi yaşam tarzı faktörleri yer almaktadır (Armstrong, 2019; Guerreiro & Bras, 2015; Podcasy & Epperson, 2022).

Alzheimer hastalığı tipik olarak aşamalar halinde ilerler ve erken belirtiler genellikle normal yaşlanma belirtileri ile karıştırılır. Hastalık ilerledikçe, bireyler hafıza kaybı, kafa karışıklığı, alışılmış görevleri yerine getirmede zorluk, dil sorunları, kişilik değişiklikleri ve davranış bozuklukları yaşayabilir. Semptomların ilerlemesi günlük işleyişi ve yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyebilir (Tahami Monfared ve ark., 2022).

Alzheimer hastalığının doğru teşhisi, zamanında müdahale ve yönetim için çok önemlidir. Şu anda, bir hastanın yaşamı boyunca Alzheimer hastalığını kesin olarak teşhis edecek kesin bir test yoktur. Teşhis öncelikle klinik değerlendirme, tıbbi geçmiş değerlendirilmesi, bilişsel testler, nörolojik muayeneler ve demansın diğer olası nedenlerinin ekarte edilmesine dayanır.

Alzheimer hastalığının tedavisi olmamakla birlikte, çeşitli tedavi seçenekleri semptomları yönetmeyi ve ilerlemesini yavaşlatmayı amaçlamaktadır. Kolinesteraz inhibitörleri ve memantin gibi ilaçlar bilişsel semptomları hafifletmek için yaygın olarak reçete edilir. Ayrıca, bilişsel uyarım terapisi, fiziksel egzersiz programları ve bakıcı

desteği gibi farmakolojik olmayan yaklaşımlar da genel iyilik halinin artırılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Winslow ve ark., 2011).

Alzheimer hastalığının bireyler ve bir bütün olarak toplum üzerindeki önemli etkisi göz önüne alındığında, devam eden araştırma çabaları hastalığın altında yatan mekanizmaları anlamaya ve yeni tedavi stratejileri geliştirmeye odaklanmaktadır. İlgi alanları arasında Amiloid- β plakların ve tau protein yumaklarının hastalığın ilerlemesindeki rolü, potansiyel genetik ve çevresel faktörler ile immünoterapi ve gen terapisi gibi yeni tedavi yaklaşımları yer almaktadır.

2.1.1. Klinik Özellikleri

AH'nin klinik görünümü bireyler arasında farklılık gösterir ve zaman içinde ilerler. Başlangıçta, hafif bilişsel bozukluk, hafif hafıza kaybı, kelime bulmada zorluklar veya bozulmuş yürütme işlevleri olarak kendini gösteren hastalık ilerledikçe bilişsel eksiklikler daha belirgin hale gelir ve dikkat, dili anlama ve görsel-uzamsal yetenekler gibi diğer alanlara da yayılır (Tahami Monfared ve ark., 2022).

Bellek bozukluğu, AH'nin ayırt edici özelliklerinden biridir. Hastalar tipik olarak yeni bilgileri, özellikle de kişisel deneyimleri veya olayları içeren epizodik hafızayı tutmakta zorluk yaşarlar. Yakın zamanda öğrenilen bilgilerin hatırlanması hastalık ilerledikçe giderek zorlaşır. Uzun süreli bellek de AH'nin ilerleyen aşamalarında etkilenebilir (Fleischman & Gabrieli, 1999; Gallagher & Koh, 2011; Tahami Monfared ve ark., 2022).

Dil bozukluğu, AH'de sık görülen bir diğer özelliktir. Hastalar kelime bulma güçlükleri, anlama eksiklikleri ve artikülasyon sorunları ile mücadele edebilirler. Hastalık ilerledikçe, bireyler konuşmaları takip etmekte veya kendi düşüncelerini tutarlı bir şekilde ifade etmekte zorluk çekebilirler. Yavaş yavaş, iletişim daha parçalı ve kopuk hale gelir (Ferris & Farlow, 2013; Taler & Phillips, 2008).

Yürütücü işlevler planlama; problem çözme, karar verme ve kendini izlemeyi sağlayan üst düzey bilişsel süreçleri ifade eder. AH'de yürütücü işlevlerdeki eksiklikler genellikle muhakeme yeteneğinde bozulma, konsantre olma veya çoklu görevleri etkili bir şekilde yerine getirme becerisinde azalma, inisiyatif almada azalma ve organizasyon ve planlamada zorluklar şeklinde kendini gösterir (Allain ve ark., 2013; McGuinness ve ark., 2010).

Görsel-Uzamsal Bozukluğa bağlı olarak hastalar harita okuma, nesneleri tanıma veya mesafeleri değerlendirme gibi görevlerde zorluklar yaşayabilir. Görsel-uzamsal yeteneklerin bozulması oryantasyon bozukluğuna, tanıdık yerlerde kaybolmaya veya araba kullanma veya giyinme gibi günlük aktivitelerde zorluklara yol açabilir (McGuinness ve ark., 2010; Plaza-Rosales ve ark., 2023; Possin, 2010; Price, 1986).

Bunların yanı sıra AH hastalarında davranışsal ve psikolojik belirtiler de sıklıkla görülür. Bu belirtiler depresyon, anksiyete, sinirlilik, ajitasyon, ilgisizlik ve uyku bozukluklarını içerir. Halüsinasyonlar ve sanrılar gibi psikotik semptomlar da hastalığın ileri aşamalarında ortaya çıkabilir (Li ve ark., 2014; Piccininni ve ark., 2005).

2.1.2. Epidemiyolojisi

Alzheimer hastalığı dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunu teşkil etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre, şu anda yaklaşık 50 milyon kişinin demansla yaşadığı ve vakaların yaklaşık %60-70'inin AH'ye atfedildiği tahmin edilmektedir. AH'nin artan prevalansı, dünya çapında sağlık sistemleri üzerinde önemli bir yük oluşturmaktadır (Lopez & Kuller, 2019; Tahami Monfared ve ark., 2022).

Alzheimer hastalığı ağırlıklı olarak yaşla ilişkili bir durumdur ve risk ilerleyen yaşla birlikte katlanarak artmaktadır. Çalışmalar, 65 yaşından sonra AH görülme oranlarının yaklaşık her beş yılda bir ikiye katlandığını göstermiştir. 65-74 yaş arası bireylerin yaklaşık %5'inde AH olduğu tahmin edilirken, bu oran 85 yaş ve üzeri

bireylerde yaklaşık %30'a yükselmektedir (Barnes ve ark., 2015; Guerreiro & Bras, 2015; Raji ve ark., 2009).

Araştırmalar, hastalığın epidemiyolojisinde cinsiyet farklılıklarını da vurgulamıştır. Kadınlar erkeklere kıyasla AH'den daha fazla etkilenme eğilimindedir. Bu durum kısmen kadınların erkeklere kıyasla genellikle daha uzun bir yaşam beklentisine sahip olmalarına bağlanabilir. Bununla birlikte, hormonal faktörler ve genetik yatkınlık da bu cinsiyet eşitsizliğine katkıda bulunabilir (Mielke ve ark., 2014; Podcasy & Epperson, 2022).

Alzheimer hastalığı için çeşitli risk faktörleri tanımlanmıştır. En belirgin risk faktörü daha önce de belirtildiği gibi ilerleyen yaştır. Diğer değiştirilebilir risk faktörleri arasında hipertansiyon, diabetes mellitus, hiperlipidemi, obezite ve sigara gibi kardiyovasküler hastalıklar yer almaktadır. Ayrıca, hareketsiz bir yaşam tarzı, düşük eğitim düzeyi ve sosyal izolasyon da AH gelişme riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Armstrong, 2019; Silva ve ark., 2019).

Vakaların çoğunluğu sporadik olarak ortaya çıkarken, genetik faktörler vakaların bir alt kümesinde rol oynamaktadır. Amiloid öncü proteini (APP), presenilin 1 (PSEN1) ve presenilin 2 (PSEN2) gibi genlerdeki mutasyonlar erken başlangıçlı ailesel AH ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, bu ailesel vakalar genel AH vakalarının yalnızca küçük bir yüzdesini oluşturmaktadır (Kelleher III & Shen, 2017; Nilsberth ve ark., 2001; Thomas & Fenech, 2007).

2.1.3. Nöropatolojisi

2.1.3.1. Amiloid-Beta Plaklar

A β plaklarının Alzheimer hastalığındaki rolü, bilim camiasında önemli bir araştırma ve tartışma konusudur. A β plakları, Alzheimer hastalığı olan bireylerin beyinlerinde gözlemlenen ayırt edici patolojik özelliklerden biridir (Glenner & Wong,

1984). Bu plaklar, APP proteolitik bölünmesinden türetilen toplanmış A β peptitlerinden oluşur (Hardy & Selkoe, 2002). A β plaklarının beyinde birikmesinin normal nöronal işlevi bozarak Alzheimer hastalığıyla ilişkili bilişsel gerileme ve hafıza bozukluğuna yol açtığı düşünülmektedir (Hyman ve ark., 2012; Thal ve ark., 2002). Ek olarak, A β plaklarının nörodejenerasyona daha fazla katkıda bulunan nöroinflamasyon ve oksidatif stresi teşvik ettiği düşünülmektedir (Dá Mesquita ve ark., 2016; Hyman ve ark., 2012). A β plakları üzerine yapılan kapsamlı çalışmalara rağmen, Alzheimer hastalığının patogeneziindeki kesin rolleri hala anlaşılamamıştır. Bununla birlikte, terapötik müdahaleler yoluyla A β plaklarının hedeflenmesi, bu yıkıcı nörodejeneratif bozukluk için potansiyel tedavilerin geliştirilmesinde umut verici bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır.

2.1.3.2. Nörofibriler Yumaklar

Nörofibriler yumaklar (NFY'ler) AH'nin gelişiminde ve ilerlemesinde kritik bir rol oynamaktadır. (Wood ve ark., 1986) AH, tau da dahil olmak üzere anormal proteinlerin beyinde birikmesi ile karakterizedir. (Iqbal ve ark., 2005) Tau, nöronlar içindeki mikrotübülleri stabilize etmekten sorumlu mikrotübülle ilişkili bir proteindir (KoSIK ve ark., 1986; NUKINA & IHARA, 1986) AH'de tau'nun anormal hiperfosforilasyonu mikrotübüllerden ayrılmasına yol açarak mikrotübüllerin parçalanmasına ve ardından NFY'lerin oluşmasına neden olur (Delacourte & Defossez, 1986). NFY'lerin oluşumunun genetik ve çevresel faktörlerin karmaşık bir etkileşiminden kaynaklandığına inanılmaktadır. Sonuç olarak, bozulmuş aksonal taşıma ve nöron ölümü meydana gelir ve AH hastalarında gözlenen bilişsel bozukluklara katkıda bulunur (Kolarova ve ark., 2012). NFY'lerin varlığı ve şiddeti hastalığın ilerlemesiyle yakından ilişkilidir, bu da onları AH'nin altında yatan mekanizmaların anlaşılmasında önemli bir patolojik ayırt edici özellik haline getirmektedir (Gómez-Isla ve ark., 1997).

2.1.3.3. Nöronal Kayıp ve Atrofi

Hipokampus ve serebral korteks gibi belirli beyin bölgelerinde A β plaklarının ve NFY'lerin birikmesi nöron kaybına ve atrofiye yol açar. Nöron ölümü öncelikle hafıza ve bilişte çok önemli bir rol oynayan kolinerjik nöronları etkiler. Hastalık ilerledikçe, beyin atrofisi daha belirgin ve yaygın hale gelir ve bilişsel gerilemeyi daha da şiddetlendirir (Bondareff ve ark., 1989; West ve ark., 1994).

2.1.3.4. Enflamasyon ve Oksidatif Stres

Enflamasyon ve oksidatif stres, Alzheimer hastalığının patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Mikroglia ve astrositlerin aktivasyonu ile karakterize edilen kronik enflamasyon, pro-enflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin salınmasına yol açar. Bu enflamatuar araçlar, beyindeki bağışıklık hücrelerinin toplanmasına ve aktivasyonuna katkıda bulunarak enflamatuar yanıtı şiddetlendirir (Hemonnot ve ark., 2019; Katsumoto ve ark., 2018; Preman ve ark., 2021). Ayrıca, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile antioksidan savunma mekanizmaları arasında bir dengesizlik durumu olan oksidatif stres, Alzheimer hastalığında yaygın olarak görülmektedir. ROS lipidlere, proteinlere ve nükleik asitlere zarar vererek hücrel işlev bozukluğuna ve nöron ölümüne yol açabilir. Ek olarak, oksidatif stres, redoksa duyarlı sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla inflamasyonu daha da uyarabilir (Bhatt ve ark., 2021; Monterey ve ark., 2021; Multhaup ve ark., 1997; Taupin, 2010). Alzheimer hastalığında inflamasyon ve oksidatif stres arasındaki etkileşim, hastalığın ilerlemesini yavaşlatmayı veya önlemeyi amaçlayan müdahale stratejileri için terapötik hedefler olarak potansiyellerini vurgulamaktadır.

2.1.4. Deneysel Alzheimer Modelleri

İlerleyici bir nörodejeneratif bozukluk olan Alzheimer hastalığı, dünya çapında milyonlarca insanı etkilemektedir. Kapsamlı araştırmalara rağmen, bu yıkıcı durumun altında yatan karmaşık mekanizmalar anlaşılması zor olmaya devam etmektedir.

Deneyisel Alzheimer modelleri, hastalığı çevreleyen gizemlerin çözülmesinde çok değerli araçlar olarak ortaya çıkmıştır. Bu modeller, patolojinin çeşitli yönlerini taklit ederek araştırmacılara Alzheimer hakkında daha derin bir anlayış sunmakta ve etkili tedaviler geliştirmek için muazzam bir potansiyel barındırmaktadır.

2.1.4.1. *In vitro* Alzheimer Modelleri

Hücre kültürü modelleri

Hayvan modellerinden veya insan kaynaklarından elde edilen ölümsüzleştirilmiş hücre hatları veya birincil nöronal kültürleri kullanarak AH patolojisinin basitleştirilmiş bir temsilini sağlar. Bu modeller, A β plak oluşumu, tau hiperfosforilasyonu, oksidatif stres, nöroinflamasyon ve sinaptik disfonksiyon gibi AH'de yer alan hücresel süreçlerin aydınlatılmasında etkili olmuştur. Kayda değer örnekler arasında SH-SY5Y nöroblastom hücreleri, birincil kortikal nöronlar ve indüklenmiş pluripotent kök hücre (iPSC) türevli nöronlar bulunmaktadır (Slanzi ve ark., 2020; Trinchese ve ark., 2004).

Organotipik Beyin Dilim Kültürleri

Organotipik beyin dilimi kültürleri, araştırmacıların AH ile ilgili süreçleri daha karmaşık bir doku ortamında incelemelerini sağlar. Bu ex vivo modeller beynin hücresel ve yapısal mimarisini koruyarak nöronal bağlantı, sinaptik plastisite ve AH'de gözlenen ağ düzeyindeki değişikliklerin araştırılmasını kolaylaştırır. Hipokampal ve kortikal dilim kültürleri, A β toksisitesini, tau patolojisini ve nöroinflamasyonun nöronal fonksiyon üzerindeki etkisini araştırmak için kapsamlı bir şekilde kullanılmıştır (Croft & Noble, 2018; Norberg ve ark., 2005).

Mikroakışkan Tabanlı Sistemler

Mikroakışkan cihazlar, beynin karmaşık hücresel mikro ortamını taklit etmek için umut verici bir platform sağlar. Bu sistemler sıvı akışının, hücresel etkileşimlerin ve ilaç dağıtımının hassas bir şekilde kontrol edilmesini sağlayarak hücre-hücre etkileşimlerinin,

nöronal devrelerin ve kan-beyin bariyerinin araştırılmasına olanak tanır. Mikroakışkan modellerin AH'de A β agregasyonu, nöronal migrasyon, sinaptik bağlantı ve nörovasküler disfonksiyonun incelenmesinde değerli olduğu kanıtlanmıştır (Li ve ark., 2020).

3D Beyin Organoidleri

3D beyin organoidlerinin üretimi, iPSC'lerin nöral progenitör hücrelere farklılaştırılmasını ve daha sonra insan beyninin çeşitli bölgelerine benzeyen karmaşık 3D yapılara kendi kendilerine monte olmalarına izin verilmesini içerir. Bu organoidler hücre çeşitliliği gösterir ve gelişmekte olan insan beyninde bulunanlara benzer işlevsel özellikler sergiler. Araştırmacılar, AH ile ilişkili spesifik genetik mutasyonlar ekleyerek veya hastadan türetilen hücreleri kullanarak AH'ye özgü 3D beyin organoid modelleri oluşturabilirler (Chang ve ark., 2020; Venkataraman ve ark., 2020).

2.1.4.2. *In vivo* Alzheimer Modelleri

Transgenik Fare Modelleri

Transgenik fare modelleri, AH'yi incelemek için en yaygın olarak kullanılan *in vivo* modellerdir. Genetiği değiştirilmiş bu fareler, APP, PSEN1 veya tau protein mutasyonları gibi AH'nin ailesel formlarıyla ilişkili insan genlerini ifade eder. Bu modeller, A β birikimi, tau hiperfosforilasyonu, sinaptik disfonksiyon ve bilişsel eksiklikler dahil olmak üzere insan AH beyinlerinde gözlenen temel patolojik özellikleri tekrarlar. AH patogenezinde rol oynayan moleküler yolları anlamamıza önemli ölçüde katkıda bulunmuşlardır (Elder ve ark., 2010; Myers & McGonigle, 2019).

Sıçan Modelleri

Sıçan modelleri, daha büyük boyutları ve insanlara daha yakın fizyolojik benzerlikleri nedeniyle Alzheimer hastalığını incelemek için alternatif bir yaklaşım sağlar. A β oligomerlerinin veya streptozosinin (STZ) intraserebroventriküler enjeksiyonu veya A β peptidlerinin belirli beyin bölgelerine infüzyonu, sıçanlarda AH benzeri

patolojiyi indüklemek için kullanılmıştır. Bu modeller, A β aracılı nörotoksisite, sinaptik işlev bozukluğu ve bilişsel bozukluklar hakkında değerli bilgiler sağlamıştır (Benedikz ve ark., 2009; Flood ve ark., 2009).

İnsan Dışı Primat Modelleri

İnsan olmayan primatlar, özellikle makaklar, insanlarla fizyolojik ve genetik benzerlikler paylaşır, bu da onları Alzheimer hastalığı gibi karmaşık nörolojik bozuklukları incelemek için uygun hale getirir. A β agregatlarının veya AH ile ilişkili genleri taşıyan viral vektörlerin intraserebral enjeksiyonları, bu modellerde AH benzeri patolojiyi indüklemek için kullanılmıştır. İnsan dışı primat modelleri, etkilenen daha üst düzey bilişsel işlevlerin değerlendirilmesine olanak tanıyan daha sofistike bir bilişsel repertuar avantajı sunar (Li & Gu, 2023).

Diğer Hayvan Modelleri

Fareler, sinekler (*Drosophila*) ve nematodlar (*Caenorhabditis elegans*) gibi diğer hayvan modelleri de Alzheimer hastalığını anlamamıza katkıda bulunmuştur. Bu modeller, araştırmacıların hastalığın ilerlemesini etkileyen genetik ve çevresel faktörleri keşfetmelerine ve potansiyel terapötik hedefleri belirlemelerine olanak sağlamaktadır (Alexander ve ark., 2014; Bouleau & Tricoire, 2015).

2.2. Çoklu Doymamış Yağ Asitleri

Çoklu doymamış yağ asitleri, genel sağlığın korunmasında çok önemli bir rol oynayan bir tür temel yağdır. Bu yağ asitleri, karbon zincirlerinde birden fazla çift bağın bulunması ile karakterize edilir ve bu da onları doymuş ve tekli doymamış yağlardan ayırır. Çoklu doymamış yağ asitleri iki ana grupta sınıflandırılır: Omega-3 ve omega-6 yağ asitleri (Tapiero ve ark., 2002).

Eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA) gibi omega-3 yağ asitleri öncelikle somon, uskumru ve sardalya gibi yağlı balıklarda bulunur. Ayrıca keten

tohumu, chia tohumu ve ceviz gibi bitkisel kaynaklardan da elde edilebilirler. Omega-3 yağ asitleri, sağlığa olan sayısız faydaları nedeniyle kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Araştırmalar, enflamasyonu azaltmaya, kardiyovasküler sağlığı iyileştirmeye, beyin fonksiyonlarını geliştirmeye ve hamilelik sırasında sağlıklı fetal gelişimi desteklemeye yardımcı olabileceklerini göstermektedir (Cottin ve ark., 2011; Tapiero ve ark., 2002; von Schacky, 2021).

Öte yandan, linoleik asit (LA) ve AA gibi omega-6 yağ asitleri soya fasulyesi yağı, mısır yağı ve ayçiçeği yağı gibi bitkisel yağlarda yaygın olarak bulunur. Omega-6 yağ asitleri de vücudun normal işleyişi için gerekli olmakla birlikte, omega-3 ile omega-6 yağ asitlerinin dengeli bir oranını korumak önemlidir. Modern Batı diyeti, omega-3'lere kıyasla omega-6 yağ asitlerinde daha yüksek olma eğilimindedir, bu da dengesizliğe ve potansiyel sağlık sorunlarına katkıda bulunabilir (Burns ve ark., 2018; Tapiero ve ark., 2002).

Çoklu doymamış yağ asitleri, anti-enflamatuar etkilerinin yanı sıra uygun hücre fonksiyonunun sürdürülmesinde de hayati bir rol oynarlar. Hücre zarlarının temel bileşenleridir ve hücre sinyalizasyonu, gen ekspresyonu ve hormon sentezi dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde yer alırlar. Çoklu doymamış yağ asitleri, ayrıca merkezi sinir sisteminin, özellikle de beynin gelişimi ve bakımı için önemlidir (Hussein, 2013; Zamaria, 2004).

2.2.1. Araşidonik Asit

AA veya 5,8,11,14-eikosatetraenoik asit olarak da bilinen araşidonik asit, insan vücudundaki çeşitli fizyolojik süreçlerde çok önemli bir rol oynayan temel bir omega-6 yağ asididir. Öncelikle diyet yoluyla, ağırlıklı olarak et, yumurta ve süt ürünleri gibi hayvansal kaynaklardan elde edilir.

Araşidonik asidin kimyasal yapısı, dört çift bağa sahip 20 karbonlu bir zincirden oluşur ve bu da onu çoklu doymamış bir yağ asidi yapar. Bu benzersiz yapı, eikosanoidler olarak bilinen önemli sinyal moleküllerinin sentezi için bir öncü görevi görmesini sağlar (Martin ve ark., 2016). Ayrıca, araşidonik asit beyin fonksiyonu ve gelişiminde de rol oynar. Merkezi sinir sistemindeki hücre zarlarının önemli bir bileşenidir ve sinapsların ve nörotransmisyonun oluşumunda rol oynar. Yetersiz araşidonik asit seviyeleri bilişsel bozukluklar ve nörolojik rahatsızlıklarla ilişkilendirilmiştir (Martin ve ark., 2016; Zamaria, 2004).

Araşidonik asit ve diğer yağ asitleri, özellikle de DHA gibi omega-3 yağ asitleri arasındaki denge optimal sağlık için gereklidir. Omega-3 yağ asitleri aynı enzimatik yollar için araşidonik asit ile rekabet ederek daha az enflamatuar eikosanoid üretimine yol açar. Bu hassas denge, uygun bağışıklık fonksiyonunun sürdürülmesi ve kronik enflamatuar hastalık riskinin azaltılması için çok önemlidir (Colombo ve ark., 2017; Hadders-Algra, 2008; Lauritzen ve ark., 2015).

Prostaglandinler, tromboksanlar ve lökotrienler gibi çeşitli biyoaktif lipidlerin sentezi için önemli bir öncü görevi görür. AA metabolizması, COX, LOX ve CYP450 enzimlerini içeren enzimatik yollarla sıkı bir şekilde düzenlenir. COX enzimleri araşidonik asidi prostaglandinlere ve tromboksanlara dönüştürürken, LOX enzimleri lökotrienleri üretir. Bu yollar, homeostazın korunmasında ve çeşitli uyarılara yanıt verilmesinde kritik rol oynar (Lauritzen ve ark., 2015).

Prostaglandinler:

Araşidonik metabolizma, prostaglandinlerin sentezinde yer alan biyokimyasal yolu ifade eder. Prostaglandinler, insan vücudundaki çeşitli biyolojik süreçlerde önemli roller oynayan bir grup fizyolojik olarak aktif lipid bileşimidir.

Prostaglandinler vücutta yağ asidi araşidonik asitten üretilir. İlk olarak, fosfolipaz A2 enzimi lipid diaçilgliserolü araşidonat molekülüne ayırdığında araşidonik asit oluşur. Siklooksijenaz enzimleri daha sonra her bileşiği sırayla oksitleyerek araşidonik asitten prostaglandinler üretir.(Korbecki, 2014) COX-1 enzimleri bazal düzeyde prostaglandin üretirken, kimyasal medyatörler COX-2 izoformunun prostaglandin üretimini artırmasına neden olur. Prostaglandinler, prostaglandin taşıyıcı (PGT) adı verilen özel bir prostaglandin taşıyıcı yoluyla hücrelere giren oldukça lipofilik moleküllerdir. (Schuster ve ark., 2015) Prostaglandin reseptörlerine bağlanarak orada etki gösterirler.

Lökotrienler:

LOX yolu, AA'dan lökotrienlerin sentezinden sorumludur. Lökotrienler, öncelikle enflamatuar ve immün yanıtlarda rol oynayan bir grup güçlü lipid aracıdır. Lökotrien sentezindeki ilk adım, AA'nın 5-lipoksijenaz (5-LOX) tarafından oksidasyonunu içerir ve 5-hidroperoksiyeikosatetraenoik asit (5-HPETE) oluşumuna yol açar. Bu ara ürün daha sonra enzimatik reaksiyonlar yoluyla farklı lökotrien türlerine dönüştürülebilir (Chen & Yu, 2023; Morales ve ark., 2014).

Tromboksanlar:

Tromboksan yolu özellikle COX enziminin etkisiyle araşidonik asitten türetilen tromboksan A2 (TXA2) üretimine odaklanır. Bu yol özellikle trombosit aktivasyonu ve agregasyonu, vazokonstriksiyon ve inflamasyonda önemlidir.

TXA2, agregasyonu ve kan pıhtısı oluşumunu teşvik etmek için trombositler üzerinde etkili olan güçlü bir prostanoiddir. Bunu, trombosit yüzeylerindeki spesifik reseptörlere bağlanarak, aktivasyonlarını ve agregasyonlarını uyararak başarır. Bu süreç hemostazda çok önemlidir ve yaralanma sonrası aşırı kanamayı önler (Kouba ve ark., 2023).

2.2.2. Araşidonik Asit Metabolizması

Araşidonik asit ağırlıklı olarak diyet kaynaklarından, özellikle de hayvansal kaynaklı katı ve sıvı yağlardan elde edilir. Ek olarak, linoleik asit gibi esansiyel yağ asitlerinden de novo olarak sentezlenebilir. AA alındıktan veya sentezlendikten sonra, yağ asidi bağlayıcı proteinler olarak bilinen spesifik taşıma proteinleri tarafından hücresel membranlar boyunca taşınır. AA'nın hücrelere bu şekilde kolaylıkla alınması, sonraki metabolik süreçler için kullanılabilirliğini sağlar. Araşidonik asit metabolizması iki ana yol üzerinden gerçekleşir: COX yolu ve LOX yolu. CYP P450 yolu, araşidonik asidin genel metabolizmasına katkıda bulunarak bu yolların her ikisine de karmaşık bir şekilde bağlıdır (Kumar ve ark., 2020).

COX Yolağı

AA için başlıca metabolik yollardan biridir. COX enzimleri, yani COX-1 ve COX-2, AA'yı prostanooidlerin sentezinde önemli bir ara madde olan prostaglandin H₂'ye (PGH₂) dönüştürür. Daha sonra PGH₂, prostaglandinler (PGD₂, PGE₂, PGF₂α), prostasiklinler (PGI₂) ve TXA₂ gibi çeşitli prostanooidleri üretmek için spesifik sentazlar tarafından metabolize edilir. Bu lipid aracıları inflamasyon, vasküler homeostaz ve trombosit agregasyonunda hayati rol oynar (Gorica & Calderone, 2022).

LOX Yolağı

LOX yolağı, AA'nın spesifik LOX enzimleri tarafından HPETE'lere dönüştürülmesini içerir. HPETE'lerin spesifik enzimler tarafından daha ileri metabolizması lökotrienlerin (LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄) ve lipoksinlerin (LXA₄, LXB₄) oluşumuna yol açar. Lökotrienler güçlü pro-enflamatuar özellikleri ve astım ve alerjik reaksiyonlardaki rolleri ile bilinirken, lipoksinler anti-enflamatuar etkiler gösterir ve enflamasyonun çözülmesine katkıda bulunur (Esposito ve ark., 2008).

Sitokrom P450 Yolağı

COX yolunda, araşidonik asit siklooksijenaz enzimi tarafından PGH₂'ye dönüştürülür. Bu ilk adım, enflamasyon, trombosit agregasyonu ve diğer fizyolojik süreçlerde hayati rol oynayan çeşitli prostaglandinlerin sentezi için çok önemlidir. Bazı CYP P450 enzimleri de araşidonik asidi COX enzimleri tarafından üretilenlere benzer biyolojik olarak aktif bileşiklere metabolize edebilir.

LOX yolunda, araşidonik asit lipoksijenazlar tarafından lökotrienlere dönüştürülür. Bu moleküller güçlü inflamasyon araçlarıdır ve alerjik reaksiyonlar ve astımda rol oynarlar. CYP P450 yolu da bazı lökotrienlerin üretimine katkıda bulunarak araşidonik asit metabolizmasındaki önemini daha da vurgulayabilir (Chen & Yu, 2023).

Araşidonik asit metabolizmasında yer alan CYP P450 enzimlerinin aktivitesi, hormonal etkiler, diyet, ilaçlar ve genetik varyasyonlar dahil olmak üzere çeşitli faktörler tarafından düzenlenebilir. Bu tür bir düzenleme, araşidonik asit metabolizmasının ve biyoaktif maddelerin sentezinin hassas bir şekilde kontrol edilmesini sağlar.

2.2.3. Nöroinflamasyon ve Araşidonik asit

Nöroinflamasyon, nörodejeneratif hastalıklar ve psikiyatrik bozukluklar da dâhil olmak üzere çeşitli nörolojik bozukluklarda önemli bir rol oynayan karmaşık bir fizyolojik tepkidir (Thakur ve ark., 2023). Nöroinflamasyon, merkezi sinir sisteminde mikrogliya ve astrositler gibi yerleşik bağışıklık hücrelerinin aktivasyonu ile karakterize edilir ve pro-inflamatuar mediatörlerin salınımına yol açar. Giderek artan kanıtlar, nöroinflamatuvar süreçlerin düzensizliğinin çeşitli nörolojik bozuklukların patogenezinin ve ilerlemesine katkıda bulunduğunu göstermektedir (Jang ve ark., 2020). AA biyoaktif lipid araçlarının üretimindeki rolü nedeniyle nöroinflamasyonda kilit bir oyuncu olarak ortaya çıkmıştır. AA'nın nöroinflamasyona katkısının anlaşılması, nöroinflamatuvar süreçleri hedef alan terapötik müdahalelerin geliştirilmesi için umut vaat edebilir.

Nöroinflamasyonda AA metabolizması prostaglandinler, lökotrienler ve tromboksanların üretimine yol açar. Bu moleküller vazodilatasyonu teşvik ederek, vasküler geçirgenliği artırarak ve bağışıklık hücrelerini inflamasyon bölgesine çekerek inflamasyonu düzenleyen sinyal molekülleri olarak işlev görür (Chen & Yu, 2023).

Çalışmalar, AA metabolizmasının düzensizliğinin ve bunu izleyen nöroinflamasyonun Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, multipl skleroz ve inme gibi çeşitli nörolojik bozukluklarda rol oynayabileceğini göstermiştir. Pro-inflamatuar eikosanoidlerin aşırı üretimi nöronal hasara yol açabilir ve bu hastalıkların ilerlemesine katkıda bulunabilir (Gorica & Calderone, 2022).

Bu nedenle, araşidonik asidin nöroinflamasyondaki rolünün anlaşılması, terapötik müdahaleler için fırsatlar sunmaktadır. Araştırma çabaları, nöroinflamatuvar tepkileri modüle etmek için araşidonik asit metabolizmasında yer alan spesifik enzimleri hedef alan ilaçlar geliştirmeye odaklanmıştır. Bu müdahaleler, pro-enflamatuar aracılardan üretimini düzenleyerek ve enflamasyonun çözülmesini teşvik ederek nöronal hasarı azaltmayı ve nöro-enflamatuar hastalıklardan etkilenen bireyler için sonuçları iyileştirmeyi amaçlamaktadır.

2.3. Moleküler Modelleme Çalışmaları

Moleküler yerleştirme, ilaç keşfi alanında yaygın olarak kullanılan bir hesaplama tekniğidir. (Fan ve ark., 2019; Morris & Lim-Wilby, 2008) Küçük moleküller (ligandlar) ve hedef proteinler arasındaki etkileşimlerin tahmin edilmesi ve analiz edilmesinde önemli bir rol oynayarak yeni ilaçların ve tedavilerin geliştirilmesinde değerli bilgiler sağlar.

Moleküler modelleme, bir ligand ve hedef protein arasındaki optimum bağlanma yönünün ve afinitesinin tahmin edilmesini içerir. Süreç, hem ligandın hem de proteinin konformasyonel uzayını keşfeden ve mümkün olan en iyi bağlanma pozunu arayan

algoritmalarla dayanmaktadır (Lukauskis ve ark., 2022; Oshima ve ark., 2020; Wang ve ark., 2020). Bağlanma etkileşimlerinin kalitesini değerlendirmek için çeşitli puanlama fonksiyonları kullanılır ve potansiyel ilaç adaylarının belirlenmesini sağlar.(Askin ve ark., 2021)

Moleküler modelleme, ilaç keşfinin öncü tanımlama, optimizasyon ve sanal tarama gibi çeşitli aşamalarında önemli bir rol oynar. Araştırmacılar, geniş kimyasal kütüphaneleri keşfederek, belirli hedef proteinler için arzu edilen bağlanma afinitelerine sahip potansiyel ilaç adaylarını verimli bir şekilde belirleyebilirler (P. H. Torres ve ark., 2019). Yerleştirme ayrıca ligand-reseptör etkileşimlerinin yapısal temelini anlaşılmaya yardımcı olarak rasyonel ilaç tasarımı kolaylaştırır.

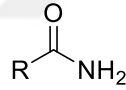
Moleküler modellemenin önemi, ilaç keşif süreçlerini hızlandırma kabiliyetinde yatmaktadır (Pagadala ve ark., 2017). Araştırmacılar, ligand-protein etkileşimlerini tahmin etmek için hesaplamalı yöntemler kullanarak, geleneksel deneysel tarama teknikleriyle ilişkili zaman ve maliyeti önemli ölçüde azaltabilirler. Ayrıca, docking çalışmaları ilaç-hedef etkileşimlerinin daha kapsamlı bir şekilde araştırılmasına olanak tanıyarak öncü bileşiklerin optimizasyonuna ve iyileştirilmesine yardımcı olur (Pinzi & Rastelli, 2019).

Moleküler modelleme ilaç keşfinde devrim yaratmış olsa da, sınırlamaları da yok değildir. Bağlanma afinitelerinin doğru tahmini, protein esnekliği ve solvasyon etkileri ile ilişkili doğal karmaşıklıklar nedeniyle bazı zorlukları olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, algoritmalar ve hesaplama gücündeki gelişmeler, kenetlenme doğruluğunu artırmaya devam etmektedir (Sulimov ve ark., 2019; P. H. Torres ve ark., 2019). Ayrıca, moleküler dinamik simülasyonları ve makine öğrenimi yaklaşımları gibi diğer tekniklerle entegrasyon, moleküler docking performansını daha da iyileştirmek için umut vaat etmektedir (Singh ve ark., 2022).

Moleküler modelleme, araştırmacılara ligand-protein etkileşimleri hakkında değerli bilgiler sağlayarak ilaç keşfinde vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir(Laskowski; Lill; Macalino). Bağlanma yakınlıklarını tahmin etme ve geniş kimyasal kütüphaneleri keşfetme yeteneği, potansiyel ilaç adaylarının tanımlanmasını ve optimizasyonunu kolaylaştırır. Hesaplama gücü ve algoritmalar geliştikçe, moleküler yerleştirme yeni terapötiklerin geliştirilmesini sağlamada daha da önemli bir rol oynamaya, sonuçta hastalara fayda sağlamaya ve modern farmasötik araştırmaları ilerletmeye hazırlanmaktadır(Pinzi & Rastelli, 2019; P. H. M. Torres ve ark., 2019).

2.4. Amidasyon Reaksiyonları

Amidasyon reaksiyonları organik sentezde, özellikle de amidlerin oluşumunda hayati bir rol oynamaktadır (Lanigan & Sheppard, 2013). Bu çok yönlü bileşikler, farmasötikler, zirai kimyasallar ve malzeme bilimi dahil olmak üzere çeşitli endüstrilerde yaygın olarak kullanılmaktadır.



Amidasyon reaksiyonları, hidroksil grubunun (-OH) bir amino grubu (-NH₂) ile değiştirilmesi yoluyla karboksilik asitlerin veya türevlerinin amidlere dönüştürülmesini içerir (Vaidyanathan ve ark., 2004; Woodman ve ark., 2009). Amidasyon reaksiyonları için en yaygın kullanılan reaktifler aminler ve açıl klorürler, anhidritler veya asit anhidritler gibi karboksilik asit türevleridir.

Bu tezde *in siliko* olarak etkin olabileceği tespit edilmiş araşidonik asit türevlerinin *in vitro* ve *in vivo* Alzheimer modellerinde canlılık, kognitif fonksiyonlara etki ve oksidatif hasara etkisinin araştırılması planlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Moleküler Modelleme Çalışmaları

Çalışılan bileşikler Schrödinger program paketi (Schrödinger. (2022b). Schrödinger. In (Version 2022-2) Schrödinger) içerisindeki modüller kullanılarak in siliko hesaplamalar yapılmıştır. Moleküler kenetleme (molecular docking) çalışması için Glide XP (extra precision) metodu kullanıldı (Friesner). Kenetlemede 5-LOX enziminin AA ile kompleks halinde elde edilmiş yüksek çözünürlükteki x-ray kristal yapısı protein veri tabanından indirildi (PDB ID: 3V99, çözünürlük: 2.25 Å). COX-2 için ise, selekoksib ile kompleks halindeki yüksek çözünürlüklü x-ray kristal yapısı, yine protein veri tabanından alındı (PDB ID: 3LN1, çözünürlük: 2.40 Å). Hep iki yapı da hesaplamalara başlamadan önce protein hazırlama modülüyle hazırlandı (Madhavi Sastry). Bu basamakta, eksik hidrojenler eklendip bağ dereceleri ayarlandı. Doğal ligand haricindeki tüm heteroatomlar ve sular da silinip yapı önce optimize edildi. Daha sonrasında da OPLS4 kuvvet alanı kullanılarak minimizasyon işlemi gerçekleştirildi.

Çalışılan tüm bileşikler de LigPrep (LigPrep. In (Version 2022-2) Schrödinger) modülü kullanılarak hesaplamalara hazır hale getirildi. Bu basamakta da her bir yapının olası tüm üç boyutlu konformasyonları ve tatomerleri oluşturuldu. Ayrıca pH 7.00 ± 2 aralığındaki olası iyonlaşma halleri de hesaplanmıştır.

3.2. Sentez Çalışmaları

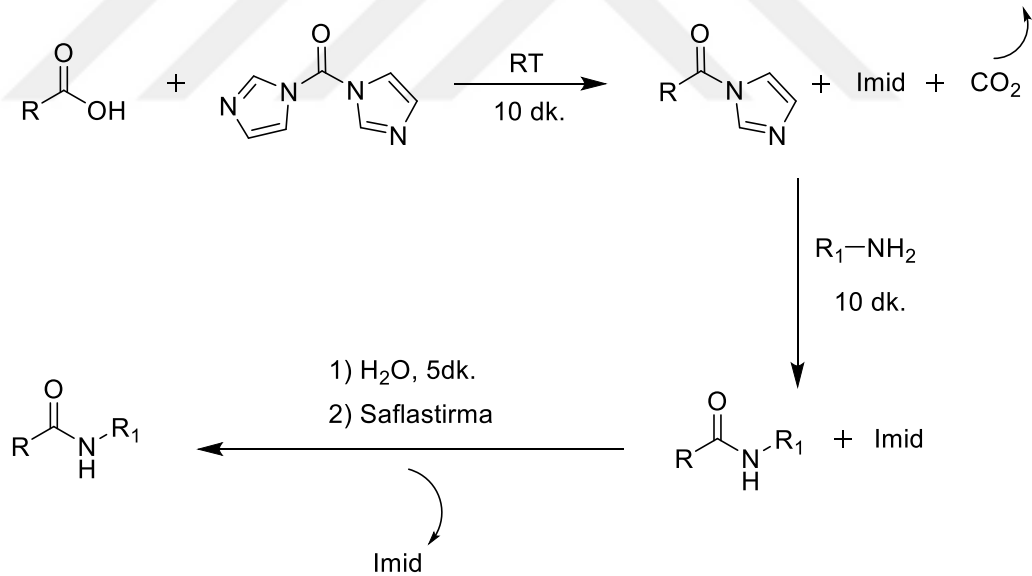
3.2.1. Sentez Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar

Tablo 3.1. Bileşiklerin sentezinde, saflaştırılmasında ve kimyasal analizlerinde kullanılan kimyasallar ve çözücüler

Kimyasalın Adı	Menşei	Kimyasalın Adı	Menşei
Araşidonik asit	Merck	Dopamin HCl	Merck
Karbonil diimidazole	Merck	Morfolin	Fluka
Etilasetat	Carlo Erba	Pirolidin	Sigma
Dötoro kloroform	Merck	Etanolamin	Merck
Amilod-β ₁₋₄₂	Merck	Streptozosin	Sigma
Sisteamin	Merck		

3.2.2. Amidlerin Genel Sentez Yöntemi

Araşidonik asit (1eq) ve 1,1'-karbonildiimidazole (CDI) (1eq) çözücüsüz ortamda 10 dakika iyice karıştırıldı. Üzerine 1eq kullanılması planlanan amin bazından eklenerek 10 dakika daha reaksiyona bırakıldı. Reaksiyon balonuna 4 mL su eklendi ve 5 dakika daha karıştırılmaya bırakıldı. Bütün bu işlemler oda sıcaklığında ve çözücüsüz ortamda yeşil sentez ile gerçekleştirildi. Daha sonra reaksiyon kabına 10 mL etil asetat (EtOAc) eklendi ve work-up yapıldı. EtOAc fazına geçen maddede, reaksiyona girmeden kalan CDI'yı uzaklaştırmak için süzme işlemi yapıldı. Elde edilen süzüntü bir silikajel kolona yüklenerek EtOAc ile madde saflaştırıldı (Métro ve ark., 2015). Toplanan süzüntülere ince tabaka kromatografisi ile bakıldı ve temiz olduğu belirlenen tüpler birleştirilerek çözücülerini uçurulduktan sonra $CDCl_3$ ile 1H -NMR, ^{13}C -NMR ve QTOF-MS spektrumları alındı.

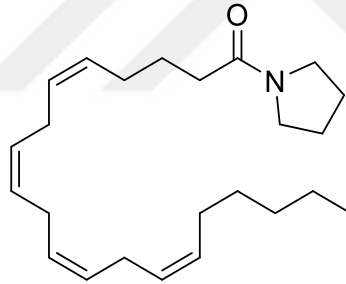


Şekil 3.1. Amidasyon reaksiyon mekanizması (R:Araşidonik Asit, R₁:Aril grup)

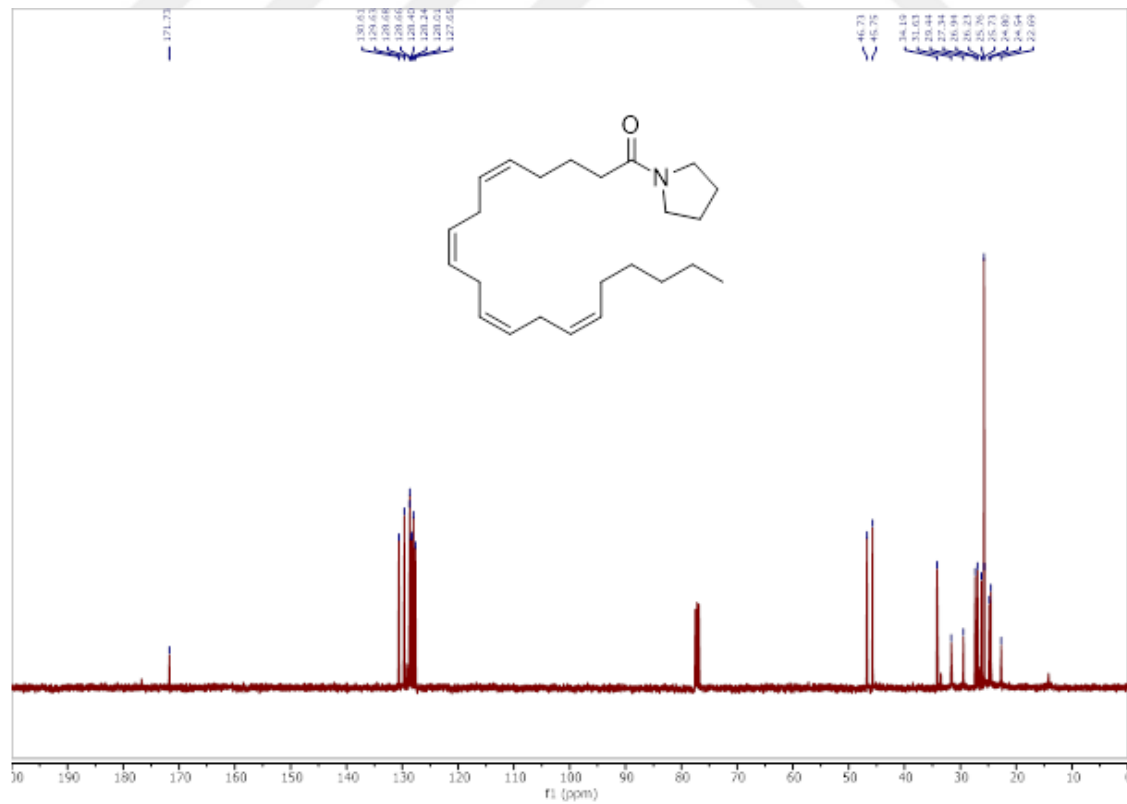
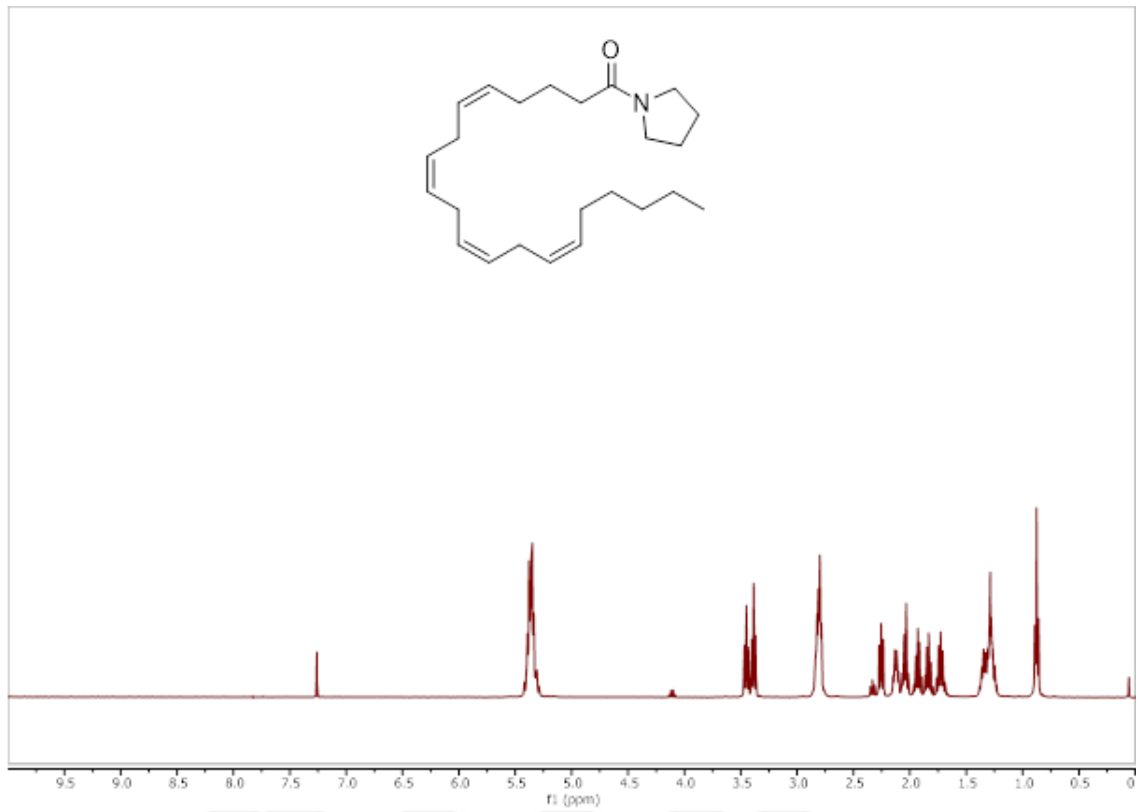
3.2.3.Araşidonik Asitten Türetilen Amidlerin Sentezi (A Serisi) ve Spektrumları

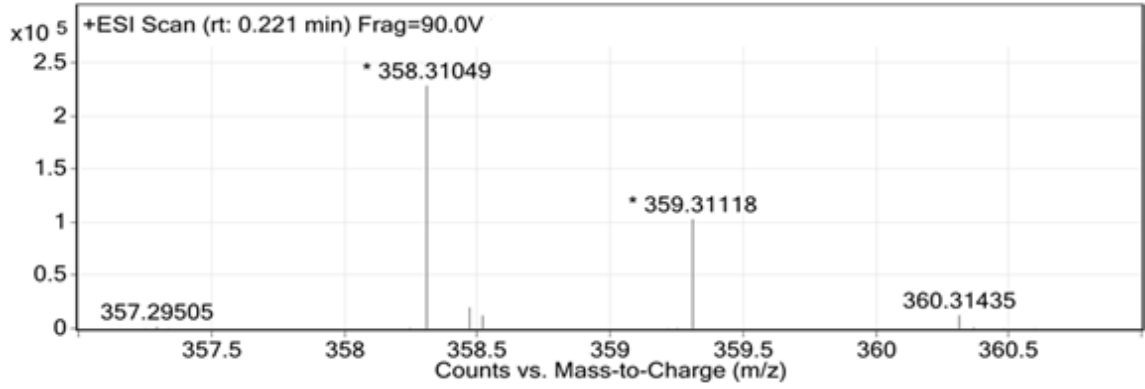
3.2.3.1. A-1: (5Z,8Z,11Z,14Z)-1-(pirolidin-1-il)ikosa-5,8,11,14-tetraen-1-on'un Sentezi

AA (0.100 g, 0.328 mmol) ve CDI (0.053 g, 0.328 mmol) çözücüsüz ortamda 10 dakika iyice karıştırıldı. Üzerine pirolidin (0.023g, 0.328 mmol) eklenerek 10 dakika daha reaksiyona bırakıldı. Reaksiyon balonuna 4 mL su eklendi ve 5 dakika daha karıştırılmaya bırakıldı. Bütün bu işlemler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Daha sonra reaksiyon kabına 10 mL EtOAc eklendi ve work-up yapıldı. Madde kolondan süzdürülüp ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve QTOF-MS spektrumları alındı. %85 izole verimle 100 mg sarı renkli yağimsı bir madde elde edildi.



(5Z,8Z,11Z,14Z)-1-(pirolidin-1-il)ikosa-5,8,11,14-tetraen-1-on

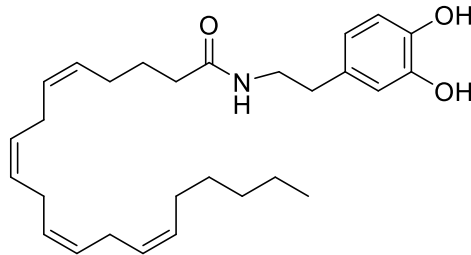




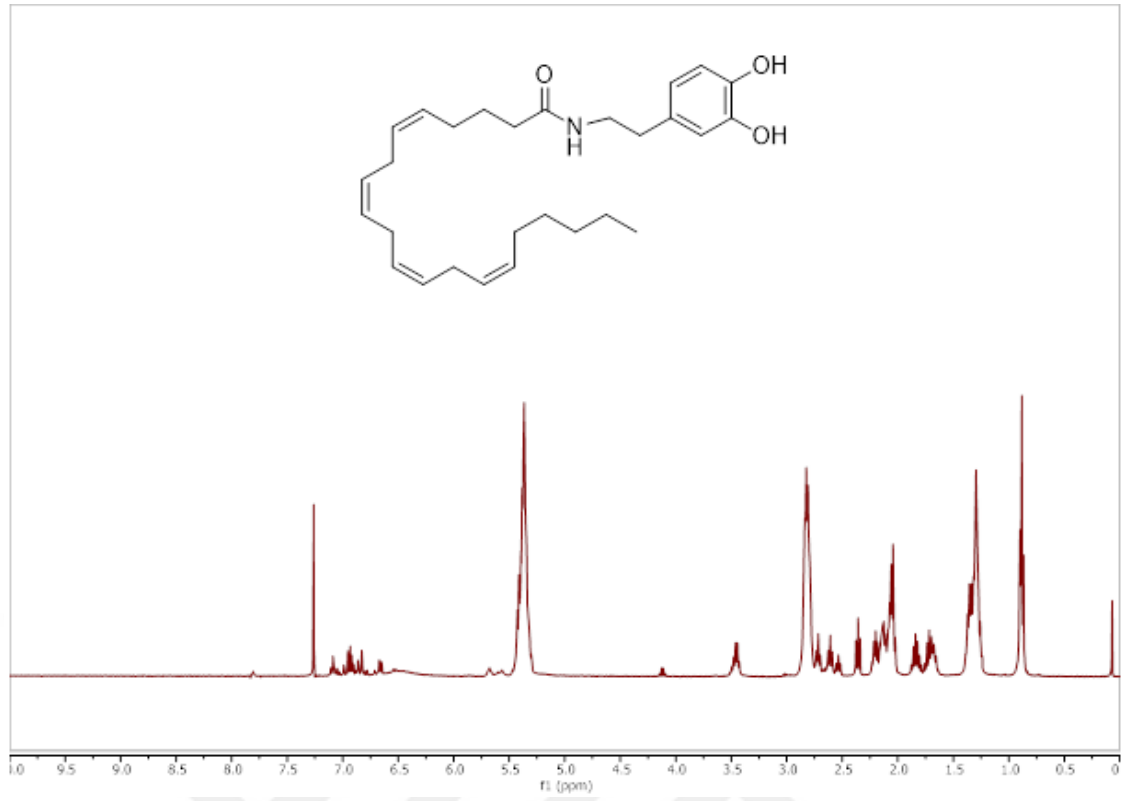
Şekil 3.4. A1'in QTOF-MS Spektrumu

3.2.3.2. A-2: (5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(3,4-dihidroksifenetil)ikosa-5,8,11,14-tetraenamid'in Sentezi

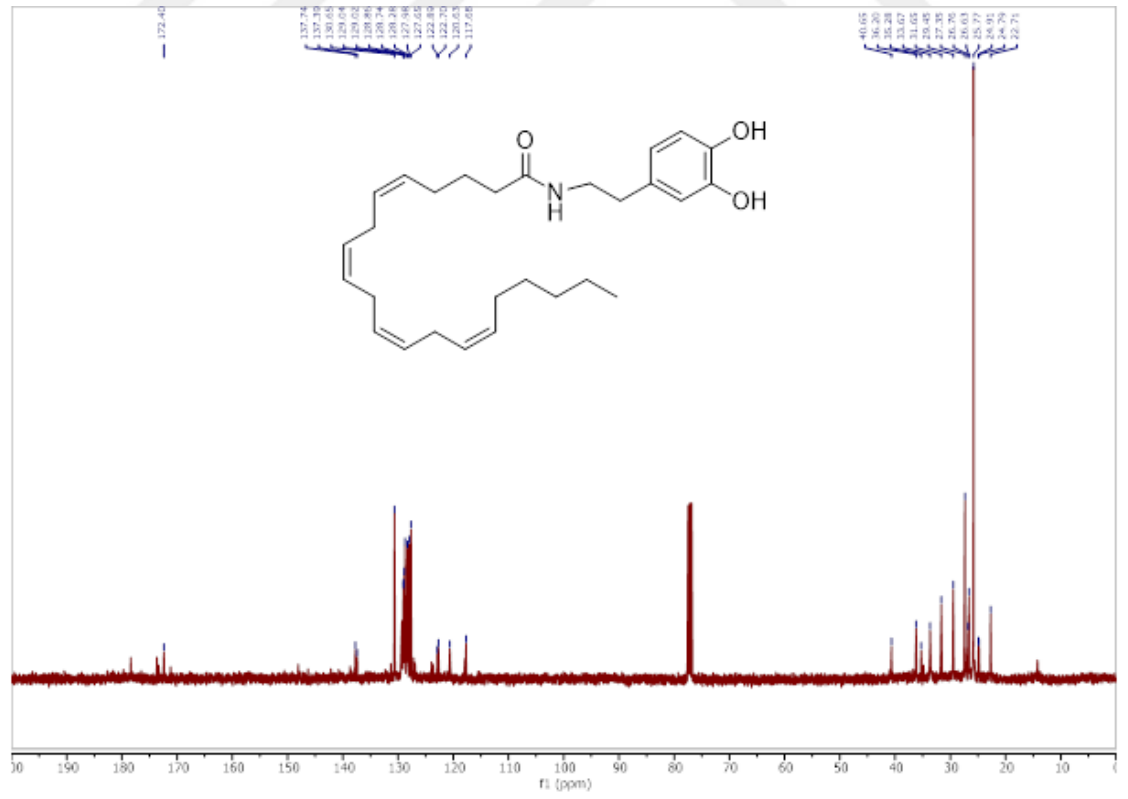
Araşidonik asit (0.100 g, 0.328 mmol) ve CDI (0.100 g, 0.328 mmol) çözücüsüz ortamda 10 dakika iyice karıştırıldı. Üzerine dopamin HCl (0.062 g, 0.328 mmol) eklenerek 10 dakika daha reaksiyona bırakıldı. Reaksiyon balonuna 4 mL su eklendi ve 5 dakika daha karıştırılmaya bırakıldı. Bütün bu işlemler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Daha sonra reaksiyon kabına 10 mL EtOAc eklendi ve work-up yapıldı. Madde kolondan süzdürülüp ^1H -NMR, ^{13}C -NMR ve QTOF-MS spektrumları alındı. %68 izole verimle 98 mg sarı renkli yağimsı bir madde elde edildi.



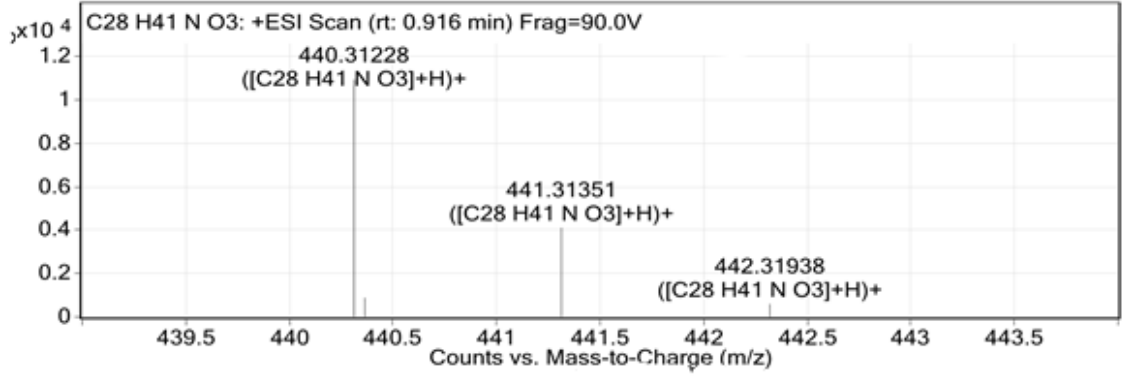
(5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(3,4-dihidroksifenetil)ikosa-5,8,11,14-tetraenamid



Şekil 3.5. A2'nin ¹H-NMR spektrumu



Şekil 3.6. A2'nin ¹³C-NMR spektrumu

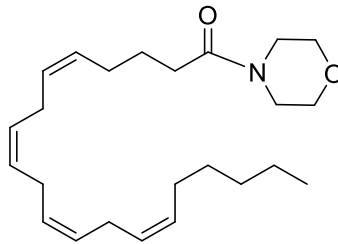


Şekil 3.7. A2'nin QTOF-MS spektrumu

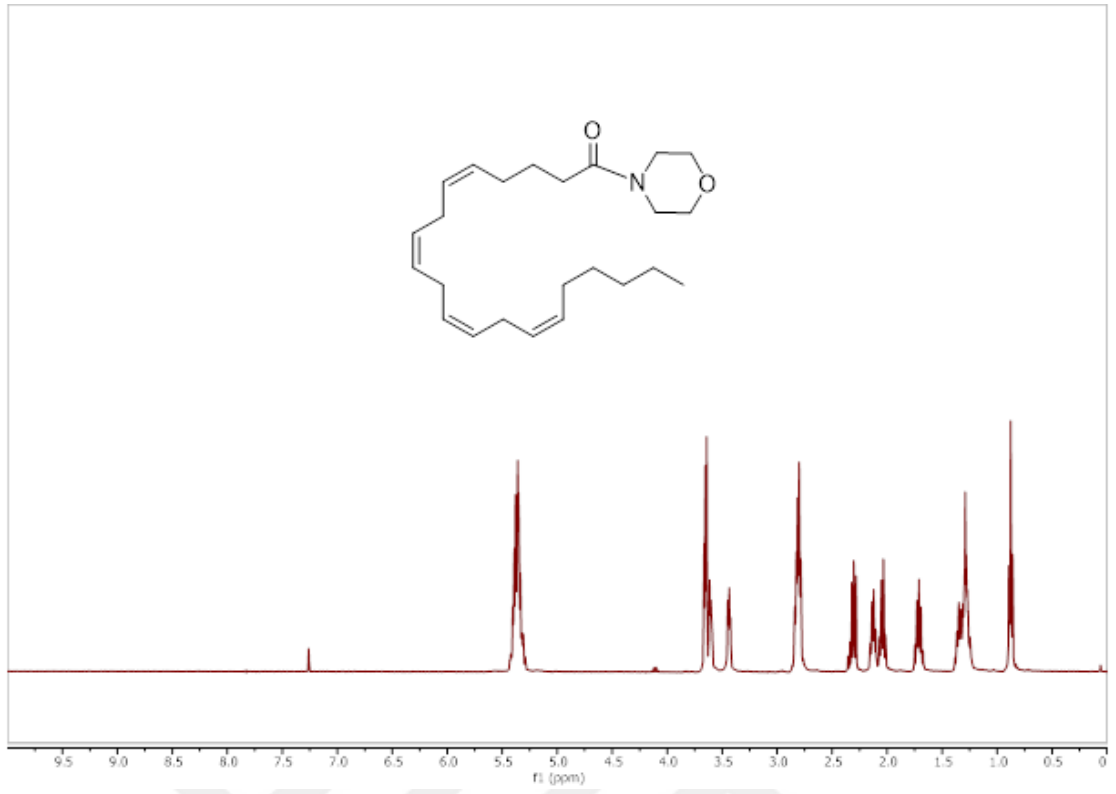
3.2.3.3. A-3: (5Z,8Z,11Z,14Z)-1-morfolinoikosa-5,8,11,14-tetraen-1-on'un

Sentezi

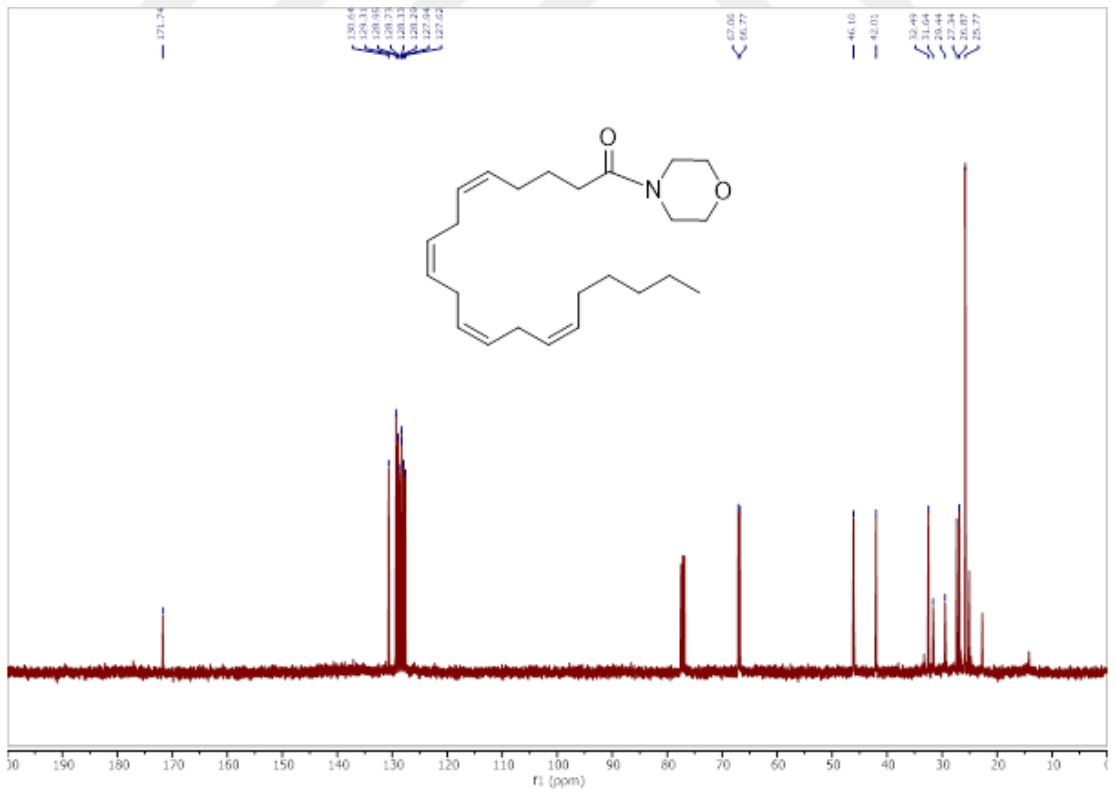
Araşidonik asit (0.100 g, 0.328 mmol) ve CDI (0.053 g, 0.328 mmol) çözücüsüz ortamda 10 dakika iyice karıştırıldı. Üzerine morfolin (0.027 g, 0.328 mmol) eklenerek 10 dakika daha reaksiyona bırakıldı. Reaksiyon balonuna 4 mL su eklendi ve 5 dakika daha karıştırılmaya bırakıldı. Bütün bu işlemler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Daha sonra reaksiyon kabına 10 mL EtOAc eklendi ve work-up yapıldı. Madde kolondan süzdürülüp $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve QTOF-MS spektrumları alındı. %80 izole verimle 98 mg açık sarı renkli yağimsı bir madde elde edildi.

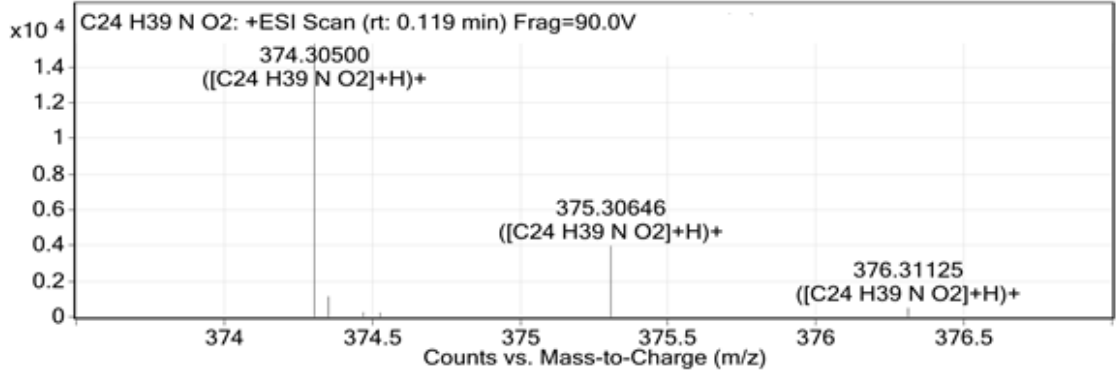


(5Z,8Z,11Z,14Z)-1-morfolinoikosa-5,8,11,14-tetraen-1-on



Şekil 3.8. A3'ün ¹H-NMR spektrumu



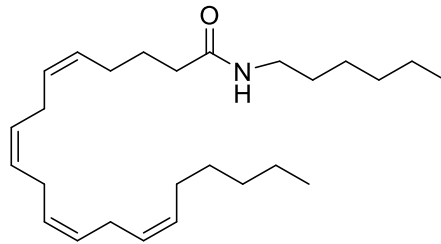


Şekil 3.10. A3'ün QTOF-MS spektrumu

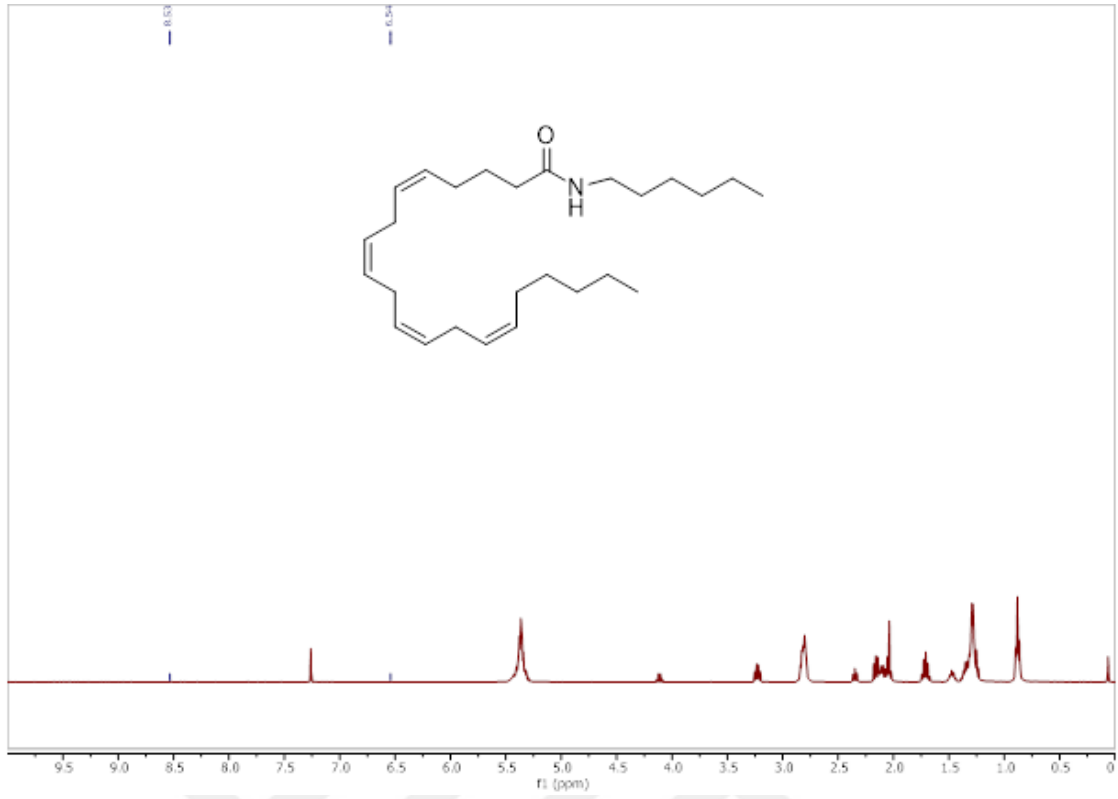
3.2.3.4. A-4: (5Z,8Z,11Z,14Z)-N- heksilikosa-5,8,11,14-tetraenamid'in

Sentezi

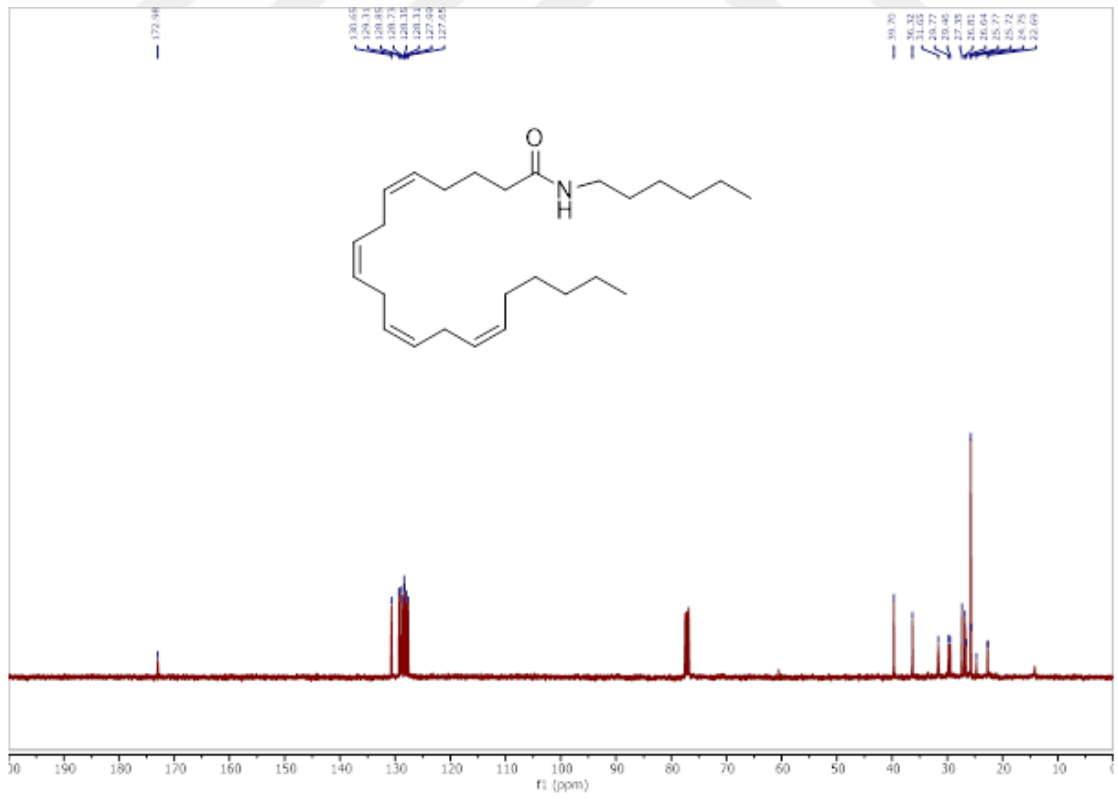
Araşidonik asit (0.100 g, 0.328 mmol) ve CDI (0.053 g, 0.328 mmol) çözücüsüz ortamda 10 dakika iyice karıştırıldı. Üzerine hegzilamin (0.033 g, 0.328 mmol) eklenerek 10 dakika daha reaksiyona bırakıldı. Reaksiyon balonuna 4 mL su eklendi ve 5 dakika daha karıştırılmaya bırakıldı. Bütün bu işlemler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Daha sonra reaksiyon kabına 10 mL EtOAc eklendi ve work-up yapıldı. Madde kolondan süzdürülüp ^1H -NMR, ^{13}C -NMR ve QTOF-MS spektrumları alındı. %73 izole verimle 93 mg koyu sarı renkli yağimsı bir madde elde edildi.



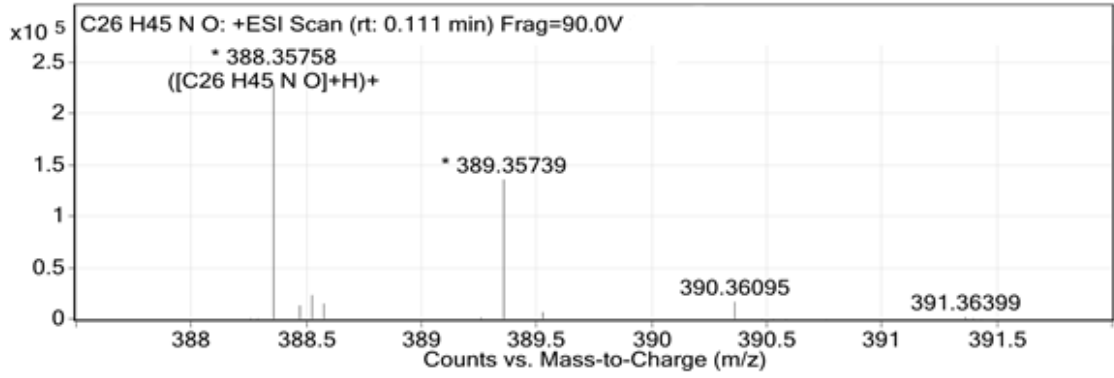
(5Z,8Z,11Z,14Z)-N- heksilikosa-5,8,11,14-tetraenamid



Şekil 3.11. A4'ün ¹H-NMR spektrumu



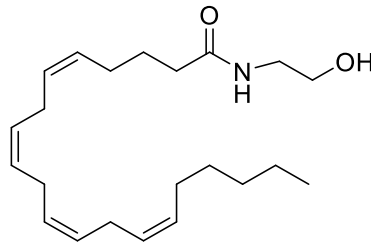
Şekil 3.12. A4'ün ¹³C-NMR spektrumu



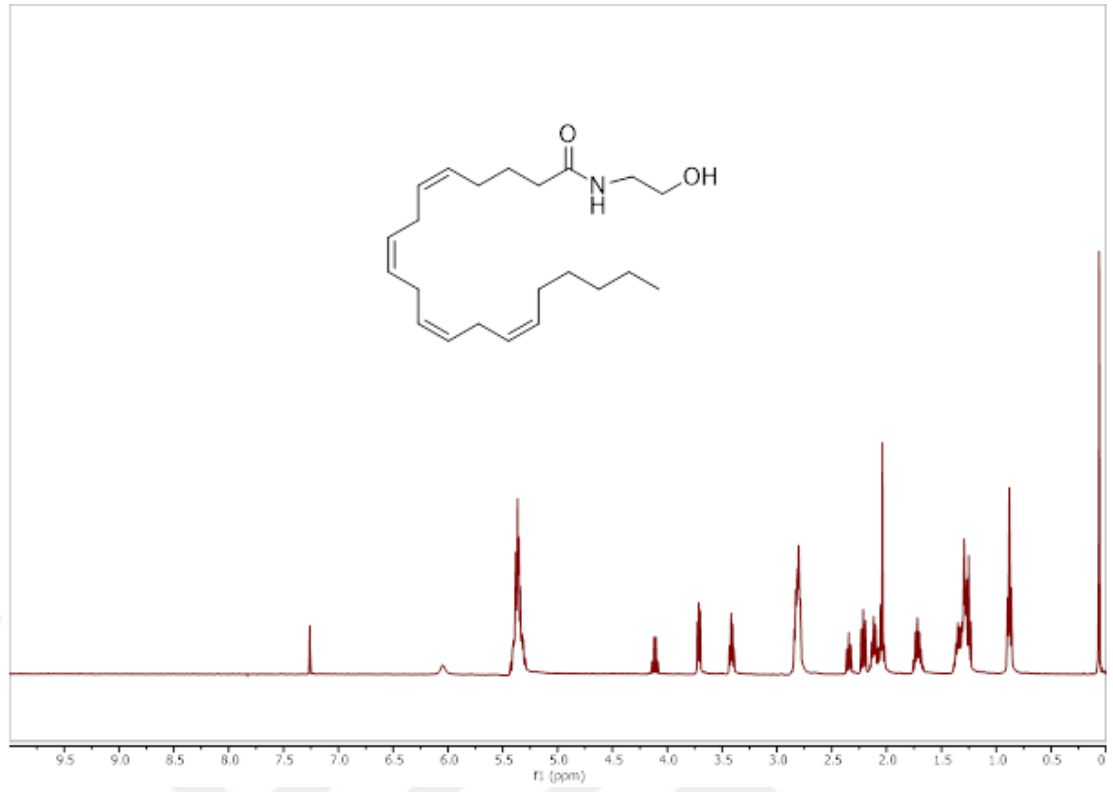
Şekil 3.13. A4'ün QTOF-MS Spektrumu

3.2.3.5. A-5: (5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(2-hidroksietil)ikosa-5,8,11,14-tetraenamid'in Sentezi

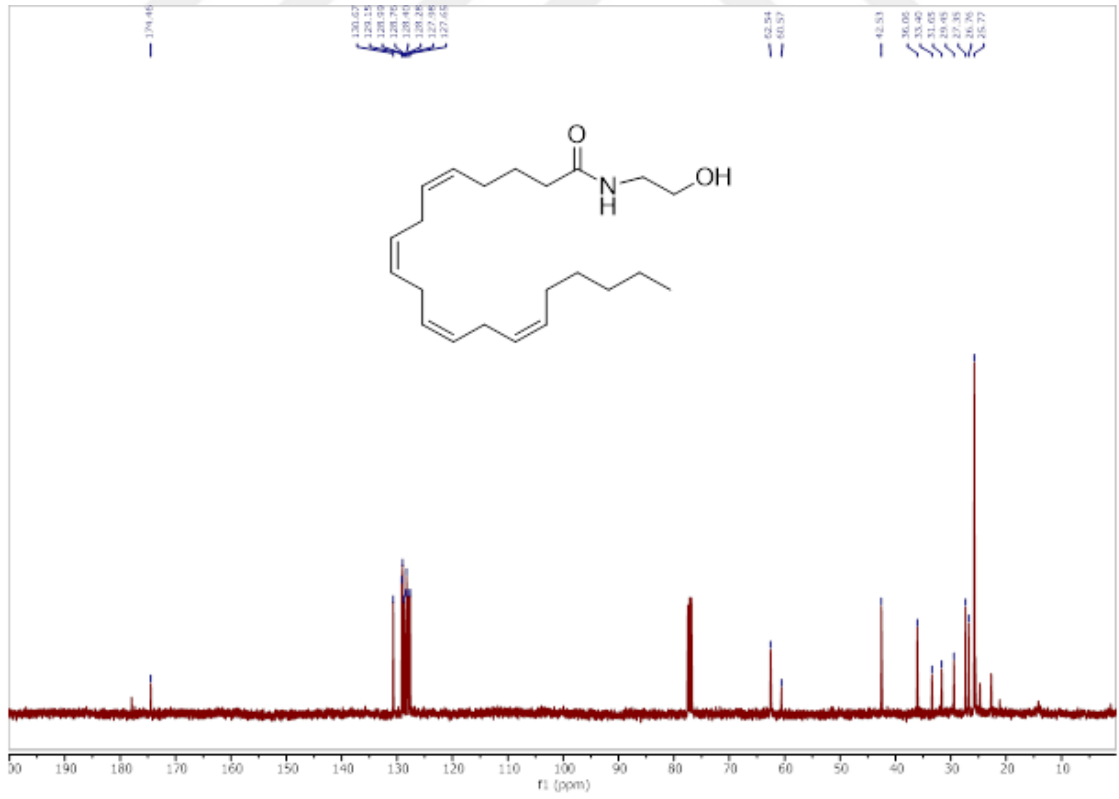
Araşidonik asit (0.100 g, 0.328 mmol) ve CDI (0.053 g, 0.328 mmol) çözücüsüz ortamda 10 dakika iyice karıştırıldı. Üzerine etanolamin (0.019 g, 0.328 mmol) eklenerek 10 dakika daha reaksiyona bırakıldı Reaksiyon balonuna 4 mL su eklendi ve 5 dakika daha karıştırılmaya bırakıldı. Bütün bu işlemler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Daha sonra reaksiyon kabına 10 mL EtOAc eklendi ve work-up yapıldı. Madde kolondan süzdürülüp $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve QTOF-MS spektrumları alındı. %83 izole verimle 90 mg açık sarı renkli yağimsı bir madde elde edildi.



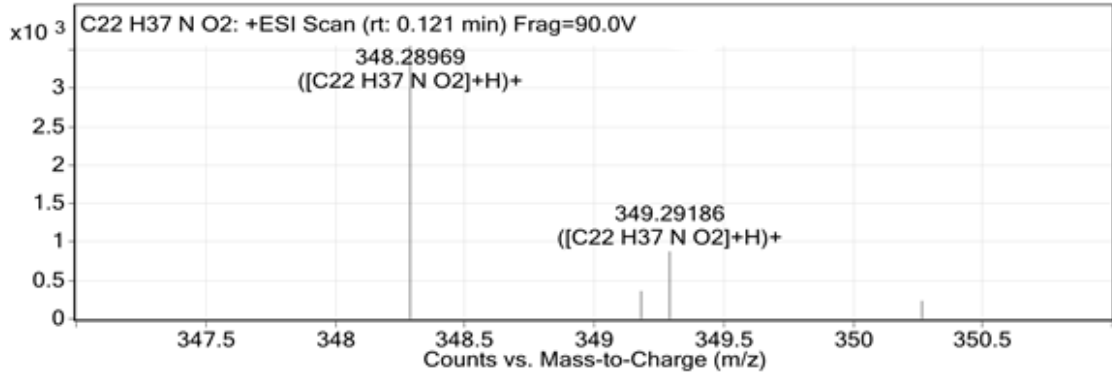
(5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(2-hidroksietil)ikosa-5,8,11,14-tetraenamid



Şekil 3.14. A5'in ¹H-NMR spektrumu



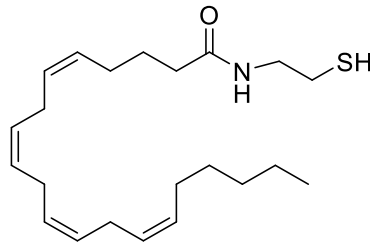
Şekil 3.15. A5'in ¹³C-NMR spektrumu



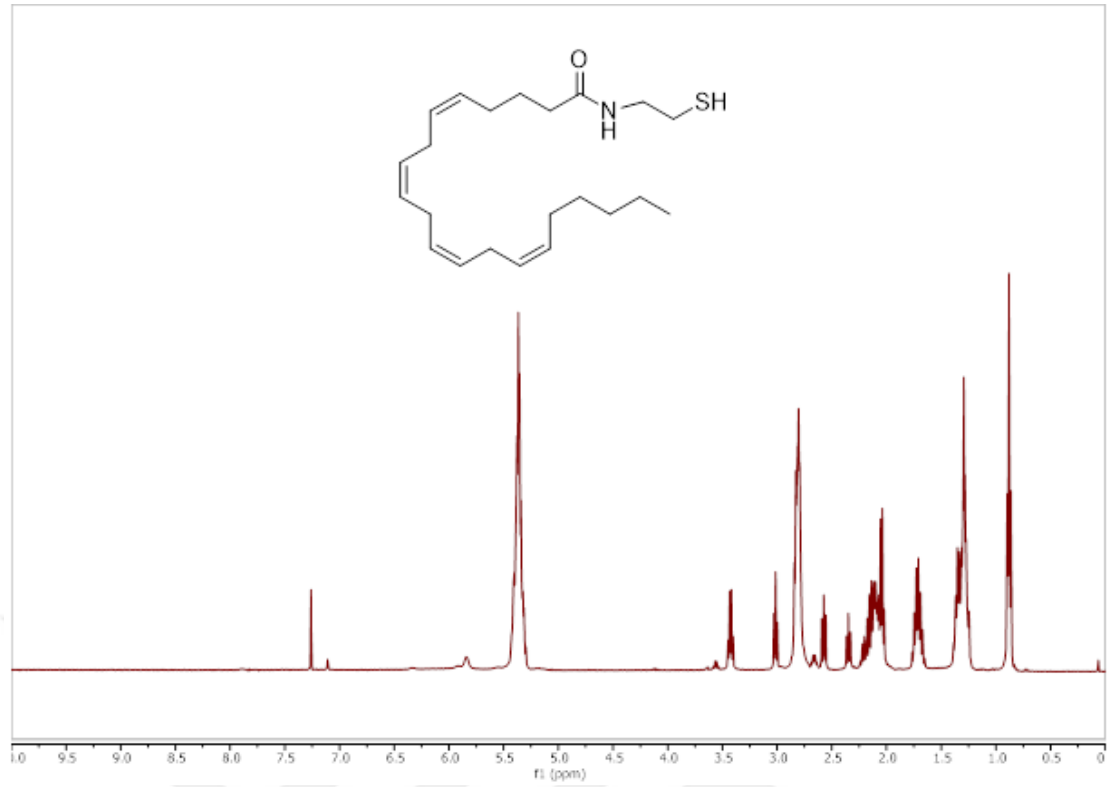
Şekil 3.16. A5'in QTOF-MS spektrumu

3.2.3.6. A-6: (5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(2-merkaptetil)ikosa-5,8,11,14-tetraenamid'in Sentezi

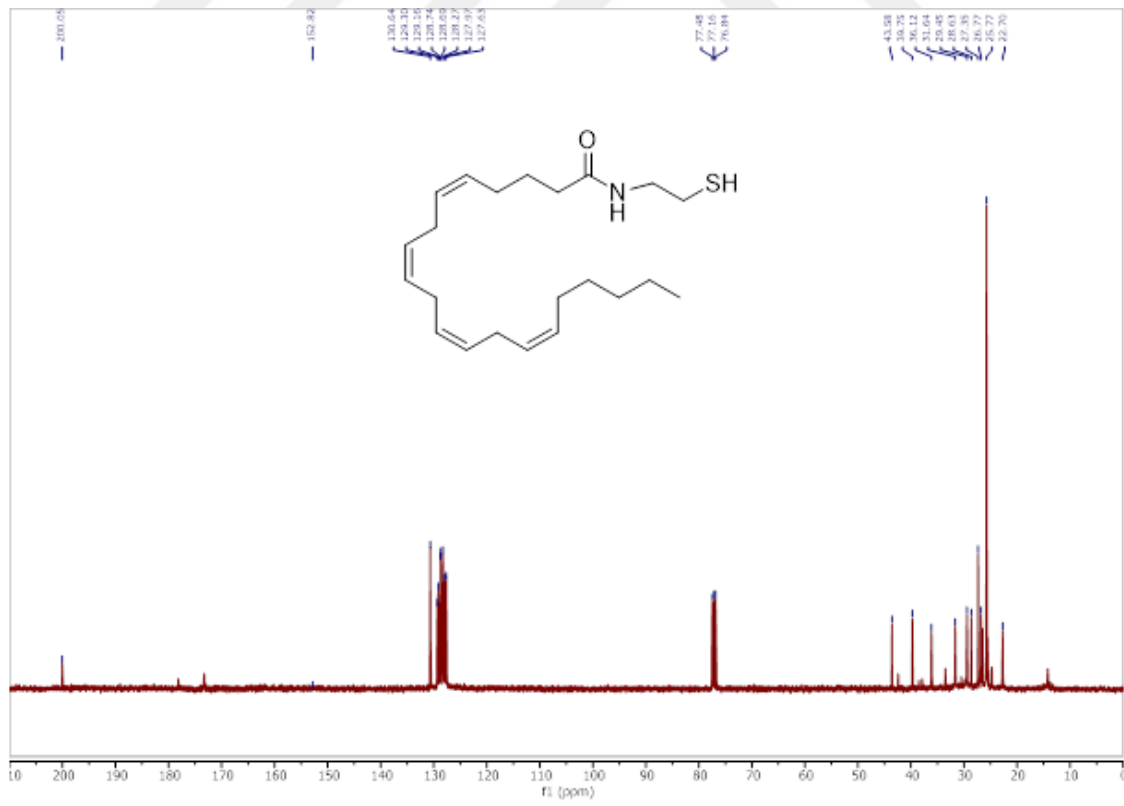
Araşidonik asit (0.100 g, 0.328 mmol) ve CDI (0.053 g, 0.328 mmol) çözücüsüz ortamda 10 dakika iyice karıştırıldı. Üzerine sisteamin (0.037 g, 0.328 mmol) eklenerek 10 dakika daha reaksiyona bırakıldı. Reaksiyon balonuna 4 mL su eklendi ve 5 dakika daha karıştırılmaya bırakıldı. Bütün bu işlemler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Daha sonra reaksiyon kabına 10 mL EtOAc eklendi ve work-up yapıldı. Madde kolondan süzdürülüp ^1H -NMR, ^{13}C -NMR ve QTOF-MS spektrumları alındı. %65 izole verimle 78 mg turkuaz renkli yağimsı bir madde elde edildi.



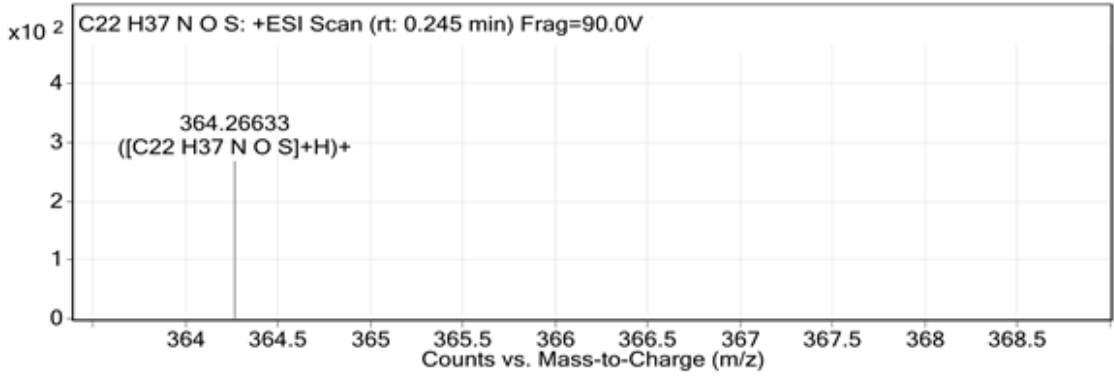
(5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(2-merkaptetil)ikosa-5,8,11,14-tetraenamid



Şekil 3.17. A6'nın ¹H-NMR spektrumu



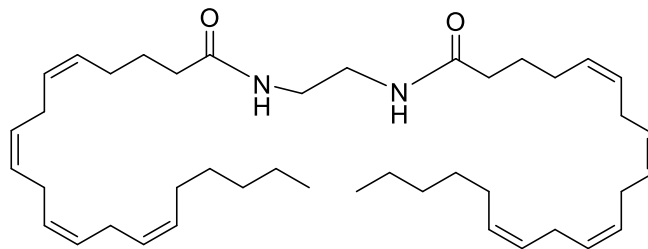
Şekil 3.18. A6'nın ¹³C-NMR spektrumu



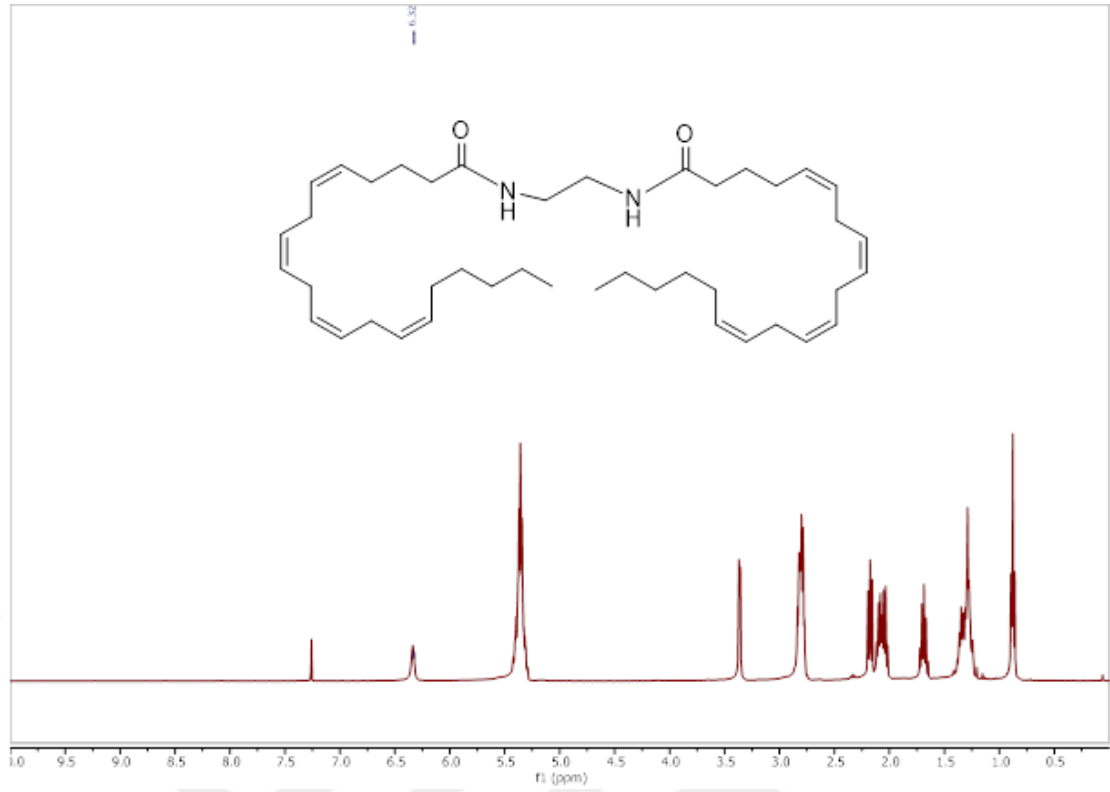
Şekil 3.19. A6'nın QTOF-MS spektrumu

3.2.3.7. A-7: (5Z,5'Z,8Z,8'Z,11Z,11'Z,14Z,14'Z)-N,N'-(etan-1,2-diil) bis(ikosa-5,8,11,14-tetraenamid)'in Sentezi

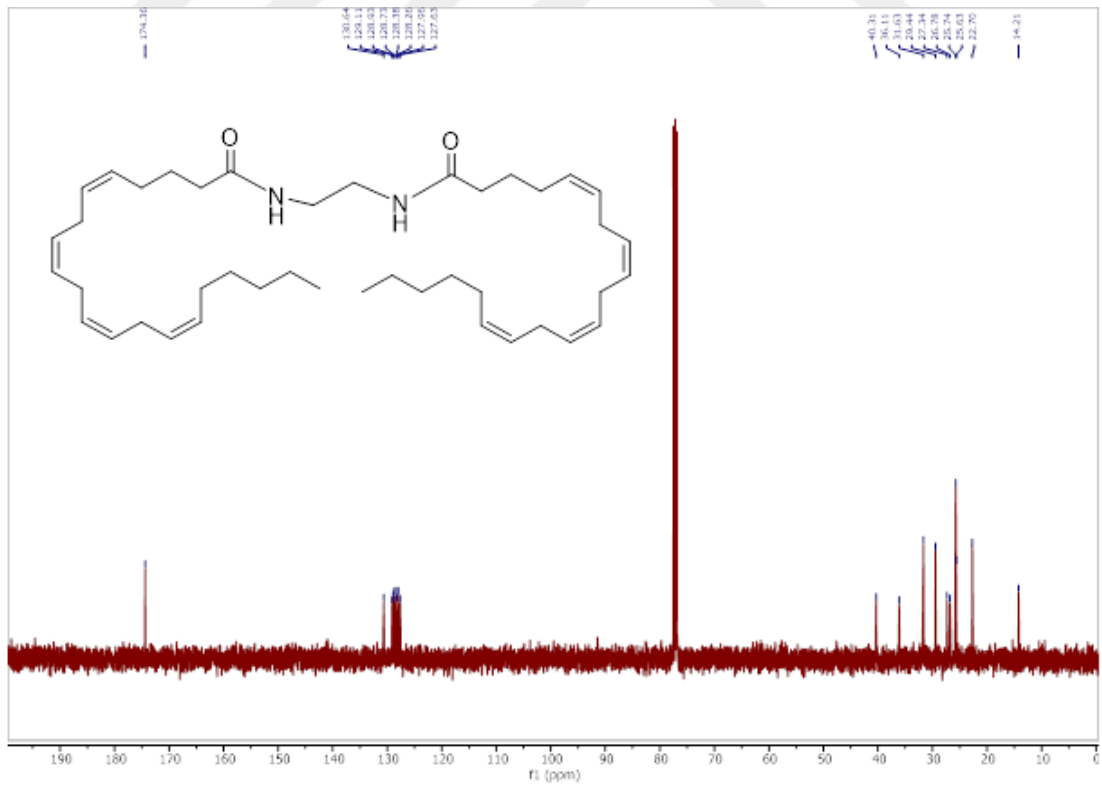
Araşidonik asit (0.100 g, 0.328 mmol) ve CDI (0.053 g, 0.328 mmol) çözücüsüz ortamda 10 dakika iyice karıştırıldı. Üzerine etilendiamin (0.019 g, 0.328 mmol) eklenerek 10 dakika daha reaksiyona bırakıldı. Reaksiyon balonuna 4 mL su eklendi ve 5 dakika daha karıştırılmaya bırakıldı. Bütün bu işlemler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Daha sonra reaksiyon kabına 10 mL EtOAc eklendi ve work-up yapıldı. Madde kolondan süzdürülüp ^1H -NMR, ^{13}C -NMR ve QTOF-MS spektrumları alındı. Spektrumlar incelendiğinde etilen diaminin her iki ucundan da araşidonik asidin bağlandığı belirlendi. %82 izole verimle 170 mg turuncu renkli yağimsı bir madde elde edildi.



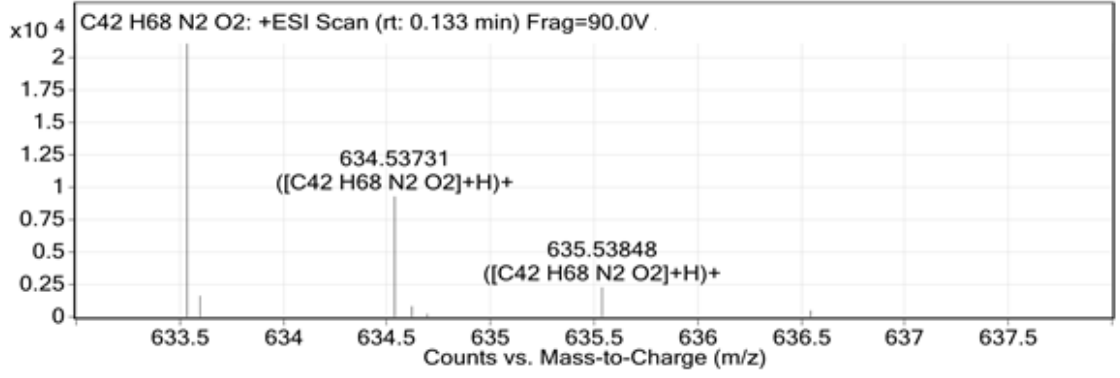
(5Z,5'Z,8Z,8'Z,11Z,11'Z,14Z,14'Z)-N,N'-(etan-1,2-diil)bis(ikosa-5,8,11,14-tetraenamid)



Şekil 3.20. A7'nin ^1H -NMR spektrumu



Şekil 3.21. A7'nin ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.22. A7'nin QTOF-MS spektrumu

3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.3.1. SH-SY5Y Nöroblastoma Kültürü

Çalışmamız için, SH-SY5Y Nöroblastoma hücre hattı, Atatürk Üniversitesi (Erzurum, Türkiye) Tıbbi Farmakoloji bölümünden elde edildi. Hücre süspansiyonu, 5 dakika boyunca 1200 rpm'de santrifüjlendi. Taze ortam Dulbecco ile modifiye edilmiş kartal ortamı (DMEM F-12), %10 Fetal bovin serumu (FBS) ve %1 antibiyotik (penisilin, streptomisin ve amphotrisin B) ile yeniden süspanse hale getirilen hücreler 25 cm²'lik flaskta alındı (Corning, ABD). Hazırlanan flask %5 CO₂ ve 37 °C şartlarında inkübatöre bırakıldı. Flaskın %80'i hücre ile kaplanınca Tripsin-Etilendiamintetraasetikasit (EDTA) (%0.25 tripsin-%0.02 EDTA) ile hücreler yapıştığı zeminden kaldırılarak santrifüj yapıldı. Süpernatant kısım atılarak hücre süspansiyonu 96 kuyucuklu doku kültürü plakalarına 100µl/kuyucuk (10.000 hücre/kuyucuk) dağıtıldı.

3.3.2. Nöroblastoma Hücre Kültüründe Alzheimer Modeli Oluşturma

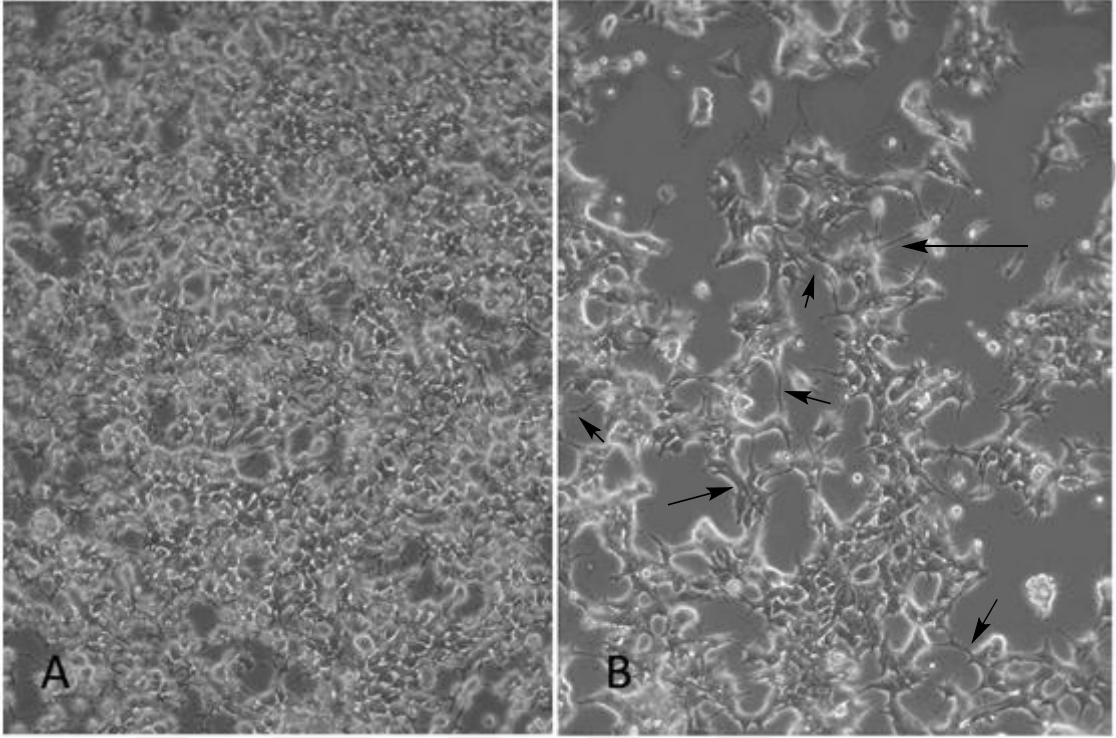
Ticari olarak temin edilebilen liyofilize A β ₁₋₄₂, nörotoksisite çalışmalarında gerekli peptit agregatlarını elde etmek için önerilen ön kültür protokolüne göre hazırlanmıştır (Shipley ve ark., 2016).

Peptit kümelerinin oluşumu:

- Peptidleri çözmek için 167 µl AccuGENE Molecular Biology Water (katalog numarası BE51200, Lonza, Belçika) kullanıldı.
- Son konsantrasyonu 1 mg/ml'ye ayarlamak için 833 µl steril PBS eklenir.
- 37°C'de 48 saat inkübe edilecektir.
- Daha sonra kültür ortamındaki nöroblastoma hücrelerine her kuyucuğa 10 µM'lık konsantrasyonda liyofilize Aβ₁₋₄₂ uygulandı.

Deney Tasarımı

Plakalara büyümesi için bırakılan SH-SY5Y hücrelerinde %80'lik bir yoğunluğa ulaşıldığı zaman 10 µM Retinoik asit (RA) ile muamele edilerek farklılaştırma çalışmaları yapılmıştır. Her 3 günde bir ortam, RA içeren taze medyum ile değiştirilmiştir. 11 günün ardından plakadaki farklılaştırılan hücreler PBS ile yıkanarak deney için hazır hale getirilmiştir. (Şekil 3.23) Aβ₁₋₄₂ peptidinin, hücrelerin %50'sini öldüren dozu (IC₅₀) 20µM kullanılarak in vitro AH modeli oluşturulmuştur. Araşidonik asit türevi olan A serisindeki 7 molekül için 0.1, 1, 10 ve 100 µM olacak şekilde konsantrasyonlar hazırlanarak deney tasarımı yapılmıştır. Her konsantrasyon için 8 tekrar kullanılmıştır.



Şekil 3.23. SH-SY5Y Nöroblastoma hücre hattı A) Model oluşturulmamış SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri B) RA ile muamele edilmiş Nöroblastoma hücreleri

3.3.3. Sitotoksosite Analizi (MTT Testi)

Bu testin temeli, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol 2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) adı verilen PBS'de çözünebilen bir maddedir. Canlı hücreler bu maddeyi işleyerek formazan kristallerine dönüştürür. Ortaya çıkan turuncu renk ayrıca bir spektrofotometre kullanılarak uygun dalga boylarında ölçülür.

MTT uygulaması sonrasında oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için Sher kuyucuğuna 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO) ilave edildi ve tekrar 4 saat inkübe edildi. Daha sonra 570 nm'deki absorbans bir spektrofotometrede (µQuant, Bad Friedrichshall, Biotek) ölçüldü. Veriler SPSS one way anova yöntemi kullanılarak analiz edilecektir.

3.3.4. Elisa Testleri

3.3.4.1. Total Oksidan Seviyeleri (TOS) Testi

TOS tespitinde, numunede bulunan oksidantların miktarıyla ilişkili olan rengin yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülerek değerlendirme yapılmıştır. Çalışmamızda

Rel Assay Diagnostics® firması tarafından üretilen TOS kitleri kullanılmıştır. µQuant, Bad Friedrichshall, Biotek cihazında 530 nm’de okundu. Elde edilen absorbans değerleri H₂O₂ equiv./µmol⁻¹ cinsinden TOS düzeyleri tespit edilmiştir.

3.3.4.2. Total Antioksidan Seviyeleri (TAS) Testi

TAS düzeyi tespitinde, 2-2’-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6- sülfonat = ABTS+) radikal katyonunun oluşumunu inhibe edecek antioksiolan antioksidan kapasitesi tespit edilmiştir. Tespit işleminde Rel Assay Diagnostics® (Sigma, USA) firması tarafından üretilen TAS ticari kitleri kullanılmıştır. µQuant, Bad Friedrichshall, Biotek cihazında 660 nm’de okundu. Elde edilen absorbans değerleri Trolox Equiv/mmol⁻¹ cinsinden TAS düzeyleri tespit edilmiştir.

3.3.4.3. Superoxide Dismutase (SOD) Testi

Serum SOD tayini human superoxide dismutase ELISA ticari kitinde (BT LAB, Cat. No: E4502Hu) belirtilen protokole uygun olarak yapılarak µQuant, Bad Friedrichshall, Biotek cihazında 450 nm’de okundu.

3.3.4.4. Tümör Nekroz Faktör α (TNF-α) Testi

Serum TNF-α tayini human tumor necrosis factor α ELISA ticari kitinde (BT LAB, Cat. No: E0082Hu) belirtilen protokole uygun olarak yapılarak µQuant, Bad Friedrichshall, Biotek cihazında 450 nm’de okundu.

3.4. Hayvan Deneyleri

3.4.1. Deney Grupları

Her biri 9 sıçandan oluşan çalışmamızda gruplar aşağıdaki şekilde tasarlanmıştır ve kontrol grubu hariç diğer deney gruplarına 3 mg/kg STZ intraserebroventriküler (i.c.v) olarak enjeksiyonu yapılarak *in vivo* Alzheimer modeli oluşturulmuştur. Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Ofisi tarafından TDK-2021-9826 kodlu doktora projesi ile desteklenmiştir. Tez çalışmamız Atatürk Üniversitesi Hayvan

Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından 22.06.2021 tarihli E42190979-000-2100159363 sayılı karar ile onaylanmıştır.

A1 ve A2 maddelerinin sıçanlar için dozları belirlenirken literatürdeki AA ile alakalı çalışmalardan faydalanılmıştır (KAŞIKÇI, 2022; Wu, 2007). Bu makalelere göre tedavi gruplarımızın ilaç dozları 3 mg/kg ve 6 mg/kg olarak belirlenmiştir.

Kontrol: Sağlıklı kontrol grubu

ALZ Kontrol: 3 mg/kg uygulanan STZ Alzheimer Kontrol grubu

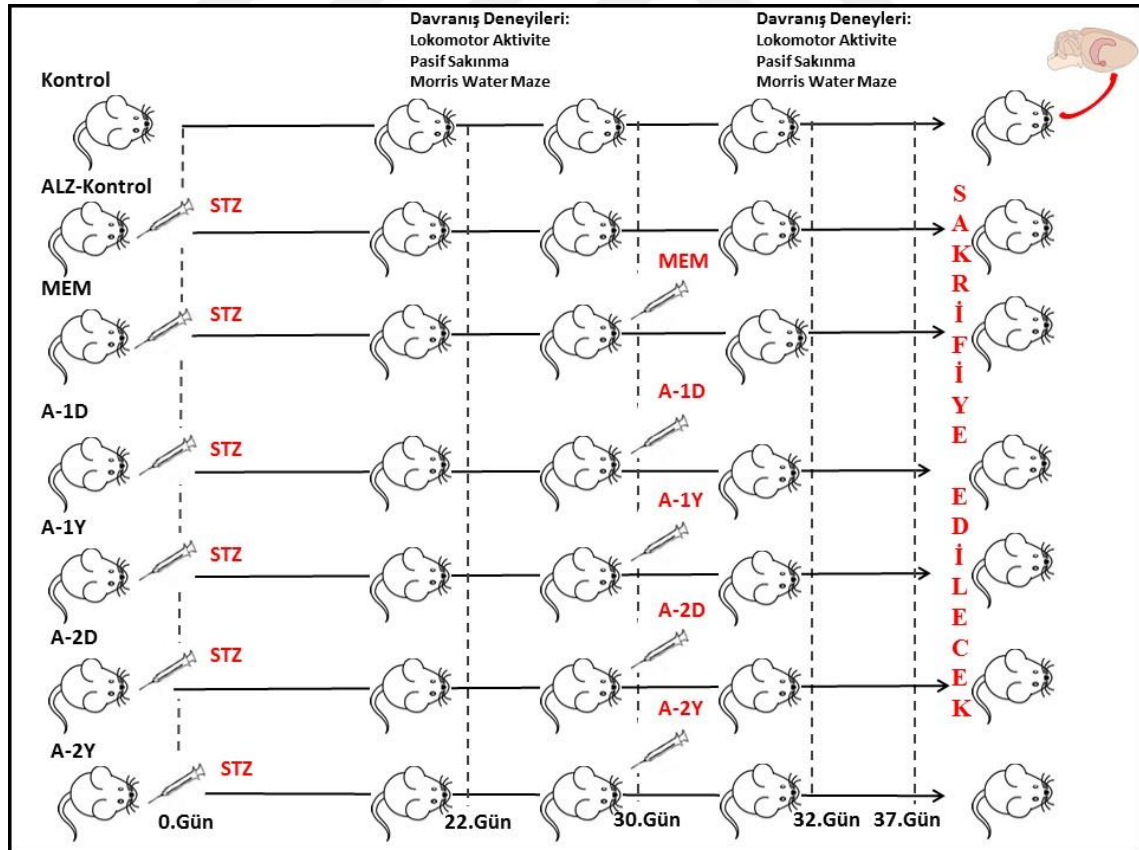
MEM: 3 mg/kg STZ + 10 mg/kg Memantin uygulanan tedavi grubu

A-1D: 3 mg/kg STZ + 3 mg/kg A1 (düşük doz) uygulanan tedavi grubu

A-1Y: 3 mg/kg STZ + 6 mg/kg A1 (yüksek doz) uygulanan tedavi grubu

A-2D: 3 mg/kg STZ + 3 mg/kg A2 (düşük doz) uygulanan tedavi grubu

A-2Y: 3 mg/kg STZ + 6 mg/kg A2 (yüksek doz) uygulanan tedavi grubu



Şekil 3.24. Deney Planı

3.4.2. Deney Hayvanlarında Alzheimer Modeli Oluşturma

Bu çalışmada sıçanlarda i.c.v STZ ile oluşturulmuş Alzheimer modelinde araşıdonik asitten sentezlenen yeni moleküllerin öğrenme ve bellek fonksiyonlarına etkisi araştırıldı. Alzheimer modeli oluşturmak için stereotaksik yöntem ile sıçanlara i.c.v olarak bilateral STZ 3 mg/kg dozda uygulandı. STZ'yi hazırlamak için pH 4.5 olan sitrat tamponunda çözmek gereklidir ve sitrat tamponu soğuk olmalıdır. İcv. enjeksiyon yapmak için stereotaksi cihazı kullanıldı (şekil 3.25). Her iki ventrikülün yeri 0.8 mm anterioposterior; 1.5 mm mediolateral ve 3.6 mm dorsoventral koordinatları ile sıçan beyin atlasından bilateral olarak tespit edildi. Sıçanların kafaları delinerek Hamilton enjektörü ile beyinlerine STZ enjeksiyonu yapıldı (şekil 3.26). Uygulama yapıldıktan sonra model oluşması için yirmi bir gün beklendi. Yirmi ikinci günde sırasıyla lokomotor aktivite testi, pasif sakınma testi ve Morris water mase testleri ile öğrenme ve bellek fonksiyonları değeriendirildi. ğrenmesinin bozulduğu gösterilen sıçanlara 7 gün boyunca deney gruplarında belirtilen şekilde ilaç tedavileri uygulandı ve takiben aynı davranış testleri tekrarlandı. Davranış deneyleri tamamlandıktan sonra tüm hayvanlar dekapite edildi.



şekil 3.25. Stereotaksi cihazı



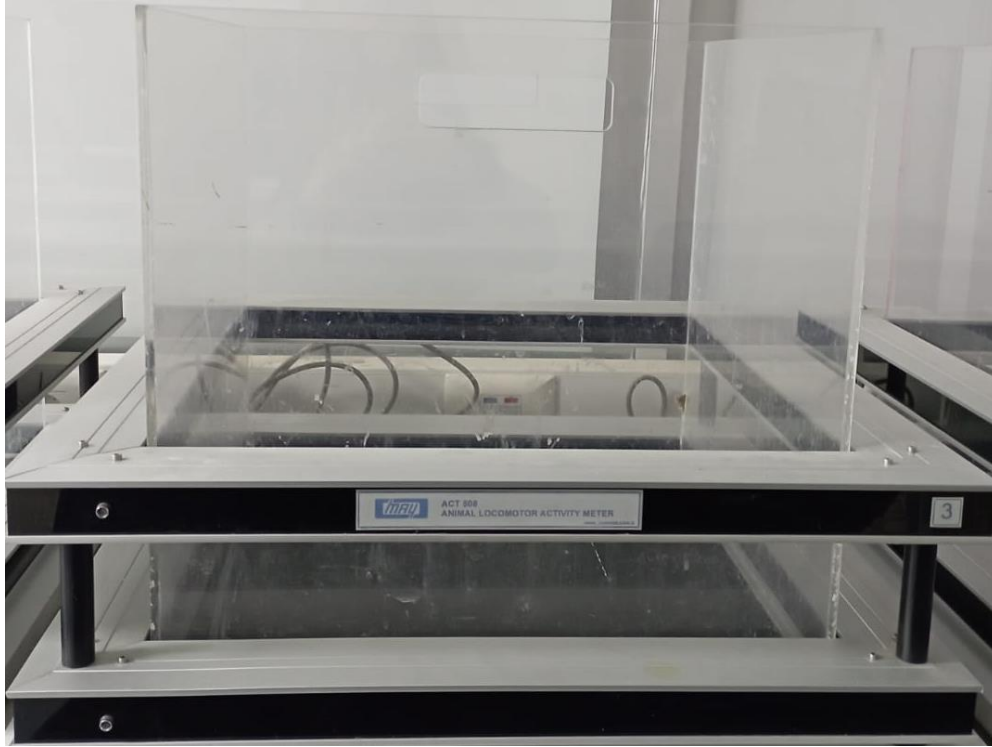
Şekil 3.26. Sıçanda STZ enjeksiyonu aşamaları

3.4.2. Davranış Testleri

3.4.2.1. Lokomotor Aktivite Testi

Lokomotor aktivite ölçüm sisteminin temeli, her bir kenarı üzerinde kızılötesi ışık kaynakları bulunan kare bir dörtlügendir. Bu dikdörtgenin içinde kare şeklinde bir Pleksiglas kafes bulunmaktadır. Bu kafesin boyutu değişebilir. Test edilen hayvanın kafes içerisinde hareket etmesi halinde karşılıklı kızılötesi sensörler arasındaki iletişim kesilerek, cihaza bağlanan kayıt cihazı vasıtasıyla test edilen hayvanın hareketi kayıt altına alınmaktadır. Kemirgenlerin horizontal (yatay), vertikal (dikey) ve ambulator

(yürüme) aktiviteleri kayıt altına alınmaktadır. Yatay hareket, kişinin hareketsiz dururken veya hareket ederken yaptığı bir harektir. Dikey hareketler ayakta yapılan hareketlerdir ve kayışların üzerindeki dikey sensörler tarafından kayıt altına alınır. Ayakta durma hareketleri, ayakta durma durumu hariç, denek tarafından kafeste gerçekleştirilen tüm lokomotor (yürüme) hareketlerdir. Horizontal ve vertikal aktivite, deney hayvanının desenli hareketleri ve saldırganlığı hakkında bir izlenim verir. Aynı zamanda hayvan hareketi, keşfetme duygusu ve birçok davranışsal ve fizyolojik süreçle de ilişkilidir. Ayrıca ritim, beslenme ve su eksikliği gibi iç faktörlerden de etkilenir ancak cinsiyet, yaş ve tür gibi parametreler de belirleyicidir. Tıbbi Farmakoloji Laboratuvarlarında mevcut May ACT 508 Locomotor Activity Meter cihazı aracılığıyla lokomotor aktiviteler değerlendirilmiştir. 10 dakikalık lokomotor aktivite testi esnasında sıçanların stereotypic, ambulatory, vertical, resting, distance ve horizontal ölçümler yapılarak hareket sayıları, dinlenme süreleri ve hareketsiz kalma süreleri sistem tarafından kaydedilmiştir (H., 2010).



Şekil 3.27. Locomotor aktivite ölçüm cihazı

3.4.2.2. Pasif sakinma Testi

Biri aydınlık bölme diğeri karanlık bölme olmak üzere bu testte iki bölmeli bir düzenek kullanılmıştır. Bu bölmelerin arasında yukarıya doğru açılan ve yazılımla otomatik açılıp kapanma fonksiyonu olan bir kapı bulunmaktadır. Test standı, bölmelerin altından geçen iletken yüzey aracılığıyla farelerin ayaklarına elektroşok vermek üzere tasarlandı. Deneyin başlangıcında fare ışıklı bölmede bırakılır ve test başlar. Hayvan test düzeneğine aydınlık tarafında bırakıldığında yazılım tarafından deney otomatik olarak başlatılır ve 20 saniyelik alışma süresinden sonra otomatik kapı açılır. Kapı açıldıktan sonra deney hayvanları içgüdüsel olarak karanlık tarafa geçecek, ardından otomatik kapı kapanacak ve her bir hayvana, hayvanın patilerine üç saniye boyunca 0,5 mA ile elektrik verilmiştir. Ertesi gün aynı test tekrarlanmıştır. Laboratuvar hayvanlarının karanlık bölmeye geçiş süreleri kayıt altına alınacak ve geçiş olmadığı takdirde 5 dakika sonra test sonlandırıldı. Bu test düzeneği ile ikinci gün 5 dakika boyunca karanlık bölmeye girmeyen sıçanlarda öğrenmenin bozulmadığı göstermiştir. Karanlık bölmeye giren hayvanların ise önceki gün hangi taraftan elektroşok aldıklarını unutarak şoka maruz kalmaları, bu farelerde öğrenmenin de bozulduğunu göstermiştir. Tıbbi Farmakoloji Laboratuvarlarında mevcut pasif sakinma deney düzeneği (MAY PAC-214) ve Noldus Ethovision XT10 yazılımı aracılığıyla deneyler gerçekleştirilecektir. Sonuç olarak aydınlık alanda geçirilen süreler sistem tarafından kaydedilmiştir (C Wu, 2020).



Şekil 3.28. Pasif sakınma testi ölçüm cihazı

3.4.2.3. Morris Water Maze Testi

Morris-Tank testi, hipokampusu bağlı öğrenme ve hafıza performansını ölçmek için yaygın olarak kullanılan bir testtir ve özgüllüğü bu amaç için benimsenmiştir. Sözleşme, platformun tank içindeki konumunun kontrol edilmesi ve daha sonra öğrenilen konumun korunmasına dayanmaktadır. Deneklerin dört gün boyunca gösterdikleri performans, çalışma hafızalarının değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Morris Water Maze testi, çapı 150 cm, derinliği 50 cm olan su deposunda gerçekleştirilir. Tank varsayımsal olarak 4 çeyreğe bölünmüştür. Su, doğal boyalarla renklendirilerek platformun görünmez hale getirilmesi sağlanmıştır. Su sıcaklığı $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'dir. Tank su seviyesinin 2 cm altına 10 cm çapında bir platform yerleştirildi. Farelerin platformu

bulmayı öğrenmesine yardımcı olmak için havuzun etrafına görsel ipuçları bırakıldı. Her sıçan, her test arasında 16 dakika olacak şekilde günde dört eğitim testi aldı. Sıçan 90 saniye içinde platformu bulmalıdır. Platformu bulmak için ve alandaki ipuçlarına dikkat etmeleri için platformda 15 saniye durmalarına izin verildi. Test dört gün sürdü ve beşinci gün, platform konumundan çıkarılacak ve son eğitim testinden sonraki 24 saat içinde sıçanın platformun önceki kadranda ne kadar süre kaldığını hesaplandı. Tüm testler sırasında tankın tamamını izlemek ve görüntüyü izleme ve kayıt sistemine iletmek için tepeye bir kamera yerleştirilmiştir. Sıçanların her bir kadranda geçireceği süre, platformu bulana kadar geçen süreler ve 5. gün platformun bulunduğu kadranda geçirilecek süreler üniversitemiz Tıbbi Farmakoloji ABD Laboratuvarlarında mevcut Morris Water maze cihazı içerisinde (MAY WM-150) ve Noldus Ethovision XT10 yazılımı aracılığıyla kaydedilmiştir (Babur E, 2017).



Şekil 3.29. Morris su labirenti tankı

3.4.3. Elisa Testleri

3.4.3.1. IL-6 Testi

Serum IL-6 tayini rat interleukin 6 ELISA ticari kitinde (BT LAB, Cat. No: E0135Ra) belirtilen protokole uygun olarak yapılarak μ Quant, Bad Friedrichshall, Biotek cihazında 450 nm’de okundu.

3.4.3.2. PGE2 Testi

Serum PGE2 tayini rat prostaglandin E2 ELISA ticari kitinde (BT LAB, Cat. No: E0504Ra) belirtilen protokole uygun olarak yapılarak μ Quant, Bad Friedrichshall, Biotek cihazında 450 nm’de okundu.

3.4.3.3. LXA4 Testi

Serum LXA4 tayini rat lipoxin A4 ELISA ticari kitinde (BT LAB, Cat. No: E1136Ra) belirtilen protokole uygun olarak yapılarak μ Quant, Bad Friedrichshall, Biotek cihazında 450 nm’de cihazında okundu.

3.5. Patolojik Çalışmalar

3.5.1. Histopatolojik Yöntem

Alzheimer hastalığında histopatolojik olarak AP, NFY oluşumu, sinaptik nöronların kaybı ve beyinde belirgin atrofi bulunur. NFY ve AP için test yapılması gereklidir, ancak AH'yi teşhis etmek için yeterli değildir. Bu lezyonların her ikisi de normal yaşlanma ve diğer bazı nörodejeneratif hastalıklarda görülebilir. Normal insanlarda, 60 yaşından itibaren limbik sistemin neokorteks ve NFY'sinde plaklar oluşmaya başlar. Anatomik korelasyon çalışmaları, NFY'lerin neokortekste, AP'lerin ise limbik sistemde "nörit plakları" olarak görüldüğünü göstermiştir. AH'ye duyarlılık ve özgüllüklerinin sıfıra yakın olduğu bulunmuştur. NFY limbik sistemde birikir ve normal yaşlanma hafif bir bilişsel bozukluktur. Bazı insanlar, bunamanın esnekliğinin patolojik bir karşılığı olduğunu öne sürmektedir. Benzer şekilde, şekil değiştiren (nörit plakları

haline gelen) ve limbik sistemde görünmeye başlayan nörit plakları, klinik evre ile sayısal ve bölgesel olarak iyi bir korelasyona sahip olmasalar da, hemen hemen her zaman AH'yi HBB'den ayırmaya yardımcı olmaktadır. NFY ve AP, gliosis, inflamasyon, nöron ve sinaps kaybı, kortikal kolinerjik innervasyon kaybı ve diğer nörotransmitter sistemleri AH nöropatolojisinin bileşenleridir.

Sıçanların nekropsileri yapılarak beyin dokuları %10'luk nötral formalin solüsyonunda tespit edildi. Dokular rutin alkol-ksilol takip işlemlerinden geçirilerek parafin bloklara alındı. Poly-lysinli lamlara alınan 4 µm'lik kesitler hematoksilen-eosin ile boyanarak cornu ammonis (CA1/CA2, CA3) kısımlarındaki nöronlarda görülen piknotik ve dejeneratif değişimler yönünden semikantitatif olarak yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

3.5.2. İmmunohistokimyasal Yöntem

Polilisinli lamlara alınan 4 µm'lik kesitler ksilol ve alkol serilerinden geçirilecek, PBS ile yıkandıktan sonra ise %3'lük H₂O₂' de 10 dk. tutularak endojen peroksidaz inaktivasyonu sağlandı. Dokulardaki antijeni açığa çıkarmak için antijen retrieval solüsyonu ile 2x5 dk 500 watt' da muamele edildi. Daha sonra β-amiloid (Santa cruzi Katalog no. sc-28365, dilusyon 1/100), Tau (Santa cruz, Katalog no. sc-390476, dilusyon 1/2000) ve Asetilkolinesteraz (Santa cruz, Katalog no. sc-373901, dilusyon 1/100) primer antikorlarıyla tespit edilen +4 °C'de overnight olarak inkubasyona bırakıldı. Sekonder olarak; Large Volume Detection System: anti-Polyvalent, HRP (Thermofischer, Katalog no: TP-125-HL) üretici firmanın önerdiği şekilde uygulandı. Kromojen olarak AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazole) kullanıldı. Mayer's Hematoksilen ile zıt boya yapıldıktan sonra kesitler su bazlı yapıştırıcı ile kapatılarak ışık mikroskopunda incelendi. İncelemede cornu ammonis (CA1/CA2, CA3) kısımlarındaki immunpozitiflikler

semikantitatif olarak yok (-), hafif (+), orta (++), şiddetli (+++) ve çok şiddetli (++++)
olarak değerlendirildi.

3.5.3. İn Situ Hibridizasyon Yöntemi

Boyamada β -amiloid, Tau ve Asetil kolin esterase oligonükleotidleri kullanıldı (Tablo 1). Bu amaçla polilisinli lamlardaki 4 μ m'lik kesitler parafin kesitler 57 °C de 1 saat bekletildi ve ardından ksilol alkol serisinden geçirilerek deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. PBS ile yıkama işleminden sonra, kesitler proteinaz K ile muamele edildi. Prehibridizasyon solüsyonu ile 50 °C' de 3 saat bekletilen kesitler sonrasında, digoxigenin bağlı prob ve hibridizasyon solüsyonu ile 45 °C de overnight olarak inkube edildi. Yıkama ve bloking işlemlerinden sonra anti-dig antikor (dilüsyon 1/50) ile oda ısısında 4 saat süreyle inkubasyona bırakıldı. Daha sonra 10'ar dk PBS ile üç kere, alkaline fosfat buffer ile 5' er dk. iki kere yıkandıktan sonra 6.6 μ l NBT ve 3.3 μ l BCIP oranındaki kromojen ile oda ısısında boyanma işlemi sağlandı. Daha sonra kesitler distile su ile yıkayıp zıt boya yapılarak mikroskopta incelendi. İncelemede cornu ammonis (CA1/CA2, CA3) kısımlarındaki mRNA ekspresyon düzeyleri semikantitatif olarak yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

Tablo 3.2. β -amiloid, Tau ve Asetil kolin esterase oligonükleotidleri

Oligonükleotid
β -amiloid: 5Dig/GGACTGACCACTCGACCAG (NCBI Reference Sequence: NM_019288.2)
Tau: 5Dig/CATCACAAGCCAGGAGGTGG (NCBI Reference Sequence: NM_017212.2)
Asetil kolin esterase: 5Dig/CACAGACACGCTGGACGAG (NCBI Reference Sequence: NM_172009.1)

3.6. İstatistiksel Analizler

3.6.1. Hücre Kültürü ve Hayvan Deneylerinde Kullanılacak Testler için İstatistiksel Analiz

Tüm hücre kültürü ve deney sıçanları ile yapılan testlerin verilerinin istatistiksel olarak analizi IBM SPSS 20.0 software programı yardımıyla gerçekleştirilecektir. One-Way ANOVA testine göre yapılacak analizde uygulamalar arasındaki farklılıklar LSD ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi ile tespit edilecektir.

3.6.2. Patolojik Çalışmalar için İstatistiksel Analiz

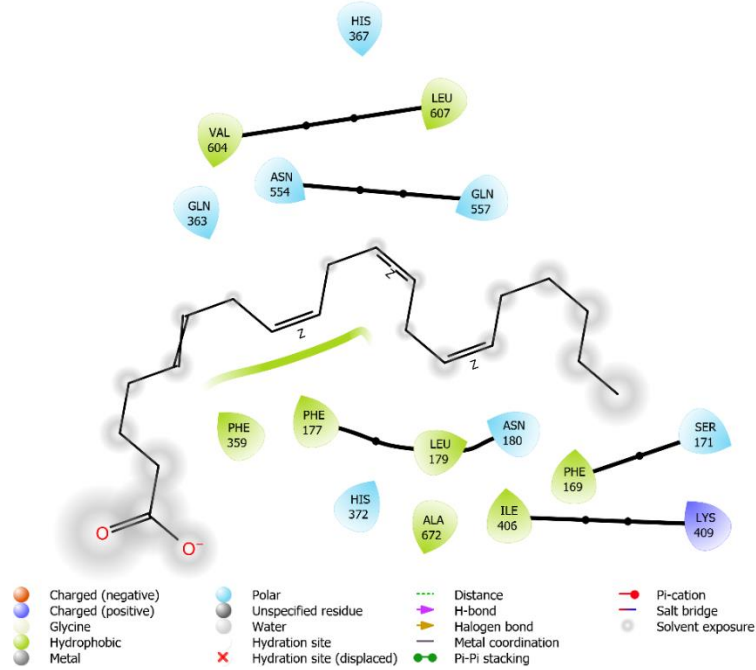
Elde edilen histopatolojik, immunohistokimyasal ve in situ hibridizasyon bulguları SPSS 20.00 programı ile analiz edildi. Gruplar arasındaki farklılık nonparametrik testlerden olan Kruskal Wallis ile farklılığı oluşturan grup ise Mann Whitney U testi ile belirlendi. ($p < 0.05$).

4. BULGULAR

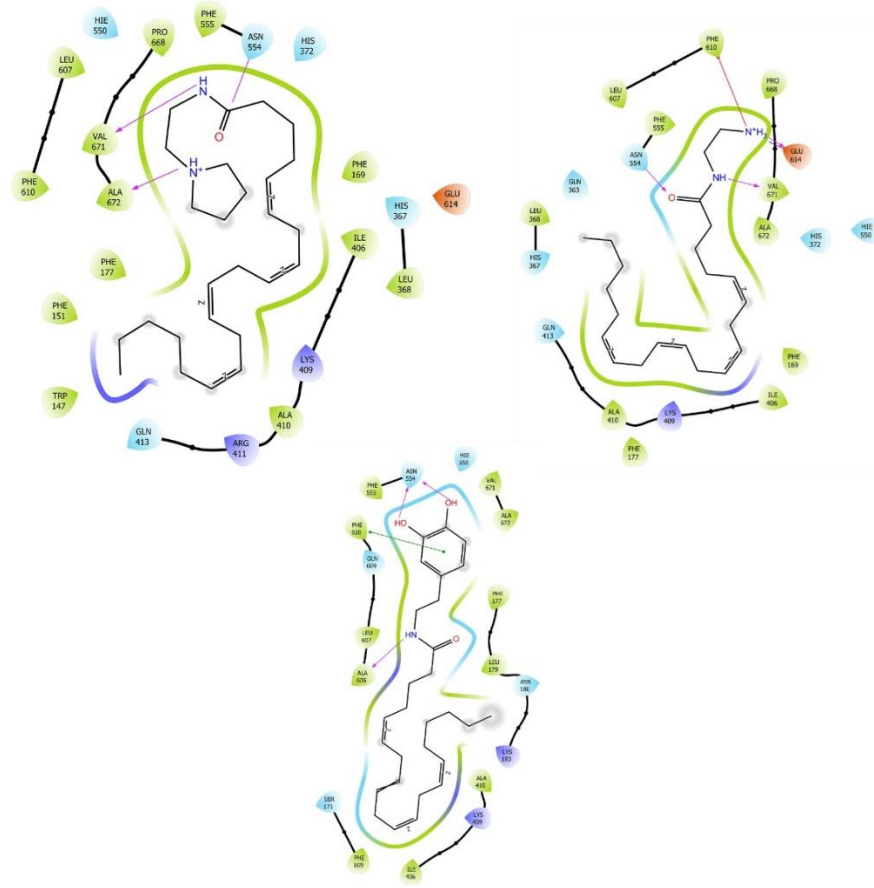
4.1. Moleküler Modelleme Bulguları

Tablo 4.1. 5-LOX ve COX-2'ye karşı doğal ligand and Araşidonik Asid türevleri için hesaplanan moleküler kenetleme skorları.

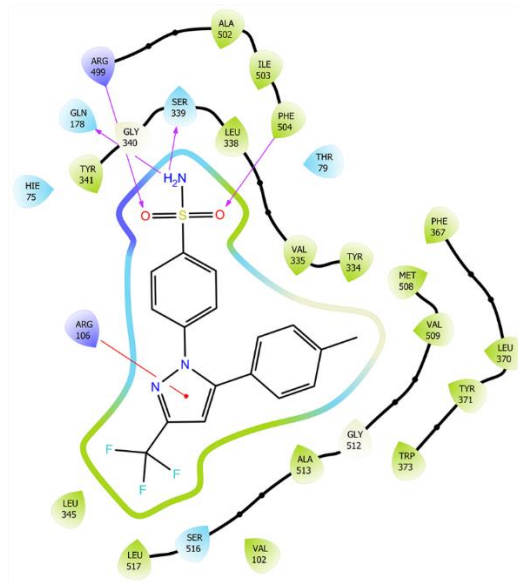
5-LOX		COX-2	
Bileşik	Skor (kcal/mol)	Bileşik	Skor (kcal/mol)
A1	-7.66	3LN1-NL	-10.94
A2	-6.66	A6	-8.74
A7	-6.53	A4	-8.38
A3	-5.69	A5	-7.93
A5	-5.56	A1	-7.61
A6	-5.22	A2	-6.82
3V99-NL	-3.02	A3	-2.02



Şekil 4.1. Schrödinger yazılımı kullanarak üretilmiş araşidonik asid'in 5-LOX ile yaptığı X-ışını iki boyutlu bağlanma etkileşimi.



Şekil 4.2. Moleküler kenetleme sonucu hesaplanmış **A1** (üst sol), **AA19** (üst sağ) ve **A2** (alt) bileşiklerinin 5-LOX ile yaptığı iki boyutlu ligand etkileşim diyagramı.



Şekil 4.3. Moleküler kenetleme sonucu hesaplanmış doğal ligand ve COX-2 etkileşimi.

Tablo 4.3. Sentezlenen bileşiklerin ¹H-NMR verileri

Bileşik	δ (ppm)
A-1	5.34-5.37 (8H, m), 3.38-3.44 (4H, m), 2.78-2.82 (8H, m), 2.26-2.30 (2H, m), 2.10-2.14 (2H, m), 1.99-2.03 (2H, m), 1.93-1.95 (2H, m), 1.80-1.84 (2H, m), 1.69-1.72 (2H, m), 1.28-1.32 (8H, m), 0.86-0.90 (3H, m).
A-2	6.63-7.12 (3H, m), 5.36-5.40 (8H, m), 3.44-3.48 (2H, m), 2.78-2.82 (4H, m), 2.68-2.72 (2H, m), 2.59-2.61 (2H, m), 2.48-2.52 (1H, m), 2.34-2.38 (2H, m), 2.02-2.22 (4H, m), 1.79-1.88 (2H, m), 1.66-1.76 (2H, m), 1.26-1.37 (2H, m), 0.87-0.90 (3H, m).
A-3	5.36-5.38 (8H, m), 3.61-3.65 (6H, m), 3.42-3.46 (2H, m), 2.79-2.82 (6H, m), 2.30-2.34 (2H, m), 2.11-2.14 (2H, m), 2.01-2.04 (2H, m), 1.68-1.72 (2H, m), 1.28-1.32 (6H, m), 0.85-0.87 (3H, m).
A-4	5.34-5.38 (9H, m), 3.18-3.22 (2H, m), 2.80-2.84 (8H, m), 2.28-2.32 (1H, M), 2.08-2.12 (8H, m), 1.69-1.72 (3H, m), 1.43-1.46 (2H, m), 1.26-1.30 (9H, m), 0.86-0.9 (3H, m).
A-5	6.05 (1H, bs), 5.34-5.38 (8H, m), 3.68-3.72 (2H, m), 3.39-3.42 (2H, m), 2.80-2.84 (4H, m), 2.34-2.36 (1H, m), 2.19-2.21 (2H, m), 2.06-2.1 (4H, m), 1.69-1.72 (3H, m), 1.28-1.32 (7H, m), 0.86, 0.90 (3H, m).
A-6	5.86 (1H, bs), 5.33-5.37 (8H, m), 3.40-3.44 (2H, m), 2.98-3.02 (2H, m), 2.78-2.84 (4H, m), 2.58-2.62 (2H, m), 2.32-2.37 (2H, m), 2.02-2.20 (5H, m), 1.67-1.75 (4H, m), 1.26-1.37 (4H, m), 0.82-0.93 (3H, m).
A-7	6.34 (2H, bs), 5.33-5.36 (16H, m), 3.34-3.38 (4H, m), 2.78-2.82 (12H, m), 2.17-2.20 (4H, m), 2.06-2.08 (8H, m), 1.67-1.70 (4H, m), 1.28-1.32 (14H, m), 0.91-0.87 (6H, m).

Tablo 4.4. Sentezlenen bileşiklerin ¹³C-NMR verileri

Bileşik	δ (ppm)
A-1	171.7, 130.6, 129.6, 128.7, 128.6, 128.4, 128.2, 128.0, 127.6, 46.7, 45.7, 34.2, 31.6, 29.4, 27.3, 26.9, 26.2, 25.8, 25.7, 24.8, 24.5, 22.7.
A-2	172.4, 137.7, 137.4, 130.6, 129.0, 128.9, 128.7, 128.3, 128.0, 127.6, 122.9, 122.7, 120.6, 117.7, 40.6, 36.2, 35.3, 33.7, 31.7, 29.5, 27.4, 26.8, 26.6, 25.8, 24.9, 24.8, 22.7.
A-3	171.7, 130.6, 129.3, 128.9, 128.7, 128.3, 128.3, 127.9, 127.6, 67.1, 66.8, 46.1, 42.0, 32.5, 31.6, 29.4, 27.3, 26.9, 25.8.
A-4	172.9, 130.6, 129.3, 128.8, 128.7, 128.3, 128.3, 128.0, 127.6, 39.7, 36.3, 31.6, 29.8, 29.5, 27.3, 26.8, 26.6, 25.8, 25.7, 24.7, 22.7.
A-5	174.5, 130.7, 129.2, 129.0, 128.8, 128.4, 128.3, 128.0, 127.7, 62.5, 60.6, 42.5, 36.1, 33.4, 31.6, 29.4, 27.3, 26.8, 25.8.
A-6	200.0, 152.8, 130.6, 129.3, 129.2, 128.7, 128.7, 128.3, 128.0, 127.6, 43.6, 39.7, 36.1, 31.6, 29.5, 28.6, 27.4, 26.8, 25.8, 22.7.
A-7	174.4, 130.6, 129.1, 128.9, 128.7, 128.4, 128.3, 127.9, 127.6, 40.3, 36.1, 31.6, 29.4, 27.3, 26.8, 25.7, 25.6, 22.7, 14.2.

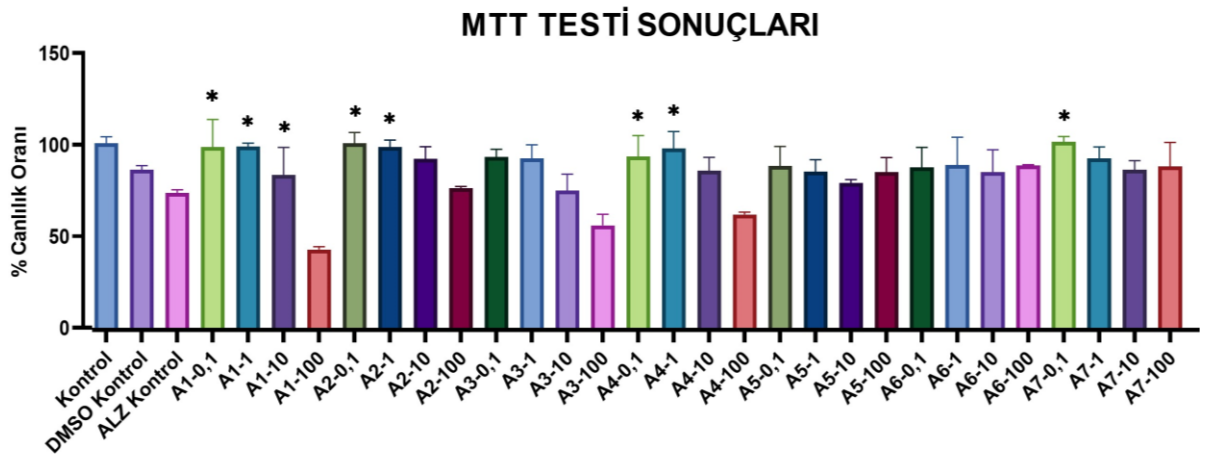
Tablo 4.5. Sentezlenen Bileşiklerin QTOF-MS verileri

Bileşik	M ⁺ +1 Hesaplanan	M ⁺ +1 Ölçülen
A-1	358.3100	358.3105
A-2	440.3100	440.3050
A-3	374.3100	374.3050
A-4	388.3600	388.3576
A-5	348.2900	348.2897
A-6	364.2700	364.2663
A-7	634.5300	634.5374

4.3. Hücre Kültürü Bulguları

4.3.1. MTT Analizi (Sitotoksosite Analizi)

SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattında Alzheimer Modeli oluşturularak sentezlenen 7 molekülün tamamı hücre kültüründe kullanılmıştır. Moleküllerin 0.1, 1, 10 ve 100 μ M'lık konsantrasyonu hazırlanarak *in vitro* Alzheimer modeli oluşturulan hücrelerin olduğu plakalara uygulanmıştır. 24 saat sonra deney sonlandırılmış ve MTT testi yapılmıştır. MTT testi sonuçları Şekil 4.5 'tedir.



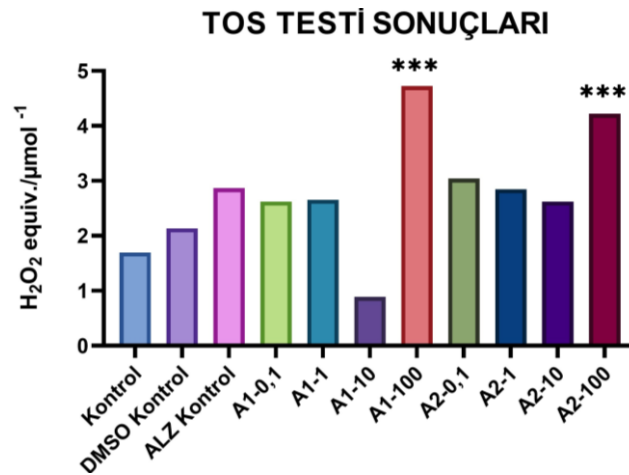
Şekil 4.5. A serisinin MTT sonuçları. ALZ Kontrol grubuyla diğer gruplar kıyaslandığında *p<0.05

MTT testi sonuçlarına göre ALZ kontrol grubu ile A1 molekülünün A1-0.1 μM (1.061 ± 0.15), A1-1 μM (1.061 ± 0.02), A1-10 μM (0.89 ± 0.15) konsantrasyon grupları, A2 molekülünün A2-0.1 μM (1.08 ± 0.06) ve A2-1 μM (1.06 ± 0.04) konsantrasyon grupları, A4 molekülünün A4-0.1 μM (1.00 ± 0.12) ve A4-1 μM (1.05 ± 0.09) konsantrasyon grupları ve A7 molekülünün ise A7-0.1 μM (1.89 ± 0.03) konsantrasyon grubu karşılaştırıldığında istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (* $p < 0.05$). MTT testi sonuçlarına bakıldığında nörorejenerasyon etkisi daha fazla olduğu için hayvan deneylerinde bu iki molekülün kullanılması uygun görüldü. Bu sebepten dolayı elisa testlerindeki analizlerde de bu iki maddenin biyokimyasal testleri yapıldı.

4.3.2. Elisa Testleri

4.3.2.1. TOS Testi

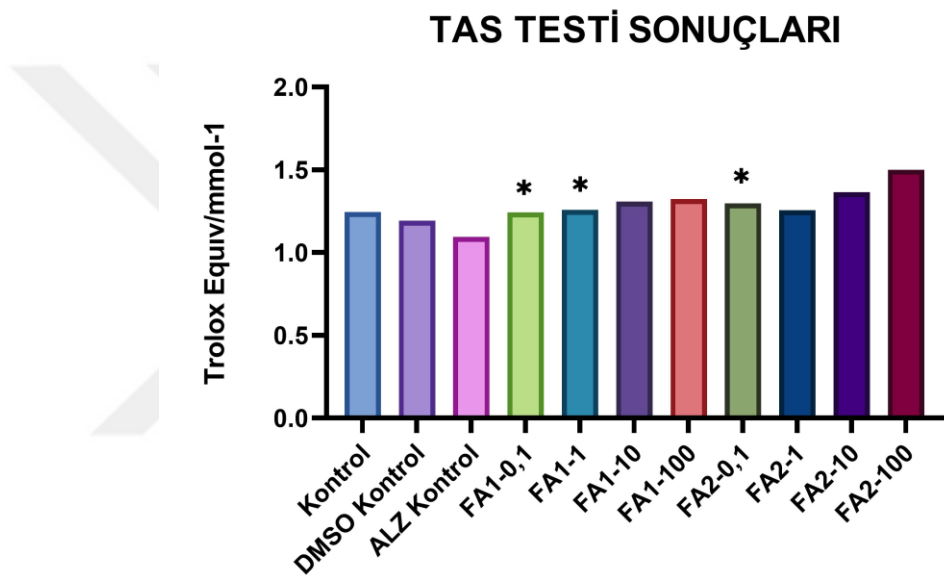
TOS testi sonuçları Şekil 4.6'da verilmiştir. Sonuçlara göre bütün ilaç konsantrasyonları ALZ kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. Sonuç olarak A1-100 μM ve A2-100 μM 'lık konsantrasyonları istatistiksel verilere bakıldığında çok anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (** $p < 0.001$). Bu konsantrasyonlar MTT sonuçlarıyla uyumludur. ALZ grubu ile diğer konsantrasyon grupları kıyaslandığında istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.6. TOS testi sonuçları ALZ Kontrol grubuyla diğer gruplar kıyaslandığında
*** $p < 0.001$

4.3.2.2. TAS Testi

TAS testi sonuçları Şekil 4.7’de verilmiştir. Bütün ilaç konsantrasyonları ALZ kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. Sonuç olarak ALZ kontrol grubu ile kıyaslanan A1-0.1 μM , A1-1 μM ve A2-0.1 μM ’lık konsantrasyonları istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır. (* $p<0.05$). Bu konsantrasyonlar MTT sonuçlarıyla da uyumludur. ALZ grubu ile diğer konsantrasyon grupları istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır.

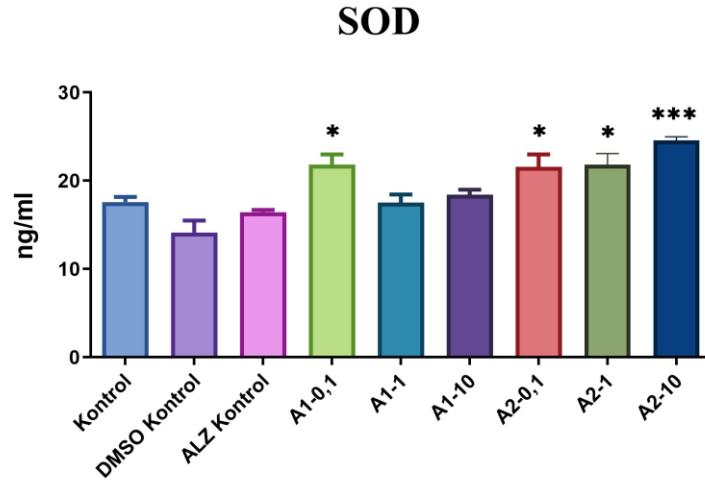


Şekil 4.7. TAS testi sonuçları. ALZ Kontrol grubuyla diğer gruplar kıyaslandığında
* $p<0.05$

4.3.2.3. SOD Testi

SOD testi sonuçları Şekil 4.8’de verilmiştir. Bütün ilaç konsantrasyonları ALZ kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. ALZ kontrol grubu ile kıyaslanan konsantrasyonlardan A1-1 μM (17.52 ± 1.29), A2-0.1 μM (21.57 ± 1.99) ve A2-1 μM ’lık (21.82 ± 1.80) konsantrasyonları istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (* $p<0.05$). ALZ kontrol grubu ile kıyaslanan ilaç gruplarından A2-10 μM (24.59 ± 0.55) μM ’lık konsantrasyonu ile arasında istatistiksel verilere bakıldığında çok anlamlı olduğu

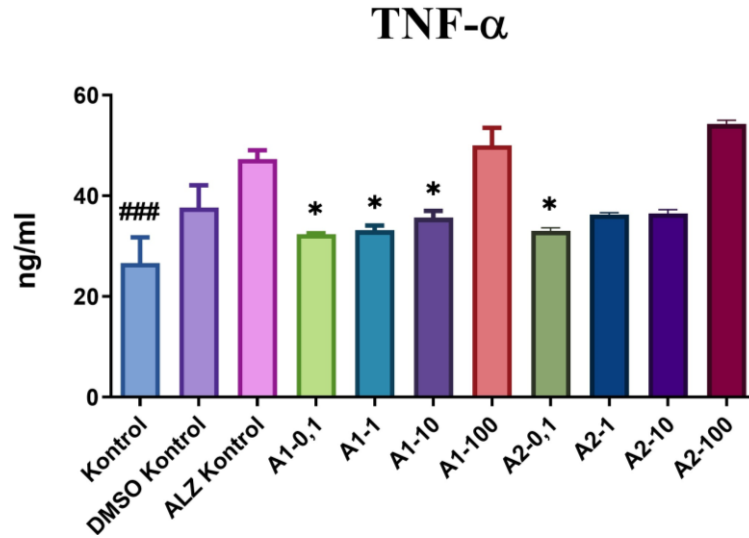
sonucuna varılmıştır (**p<0.001). ALZ kontrol grubu ile diğer konsantrasyon grupları kıyaslandığında ise aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.



Şekil 4.8. SOD testi sonuçları. ALZ Kontrol grubuyla diğer gruplar kıyaslandığında *p<0.05, ***p<0.001

3.3.4.4. TNF- α Testi

TNF- α testi sonuçları Şekil 4.9’da verilmiştir. Kontrol grubu (26.68 ± 7.22) ile ALZ Kontrol grubu (37.68 ± 6.26) birbiriyle kıyaslandığında aralarında istatistiksel verilere bakıldığında çok anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (###p<0.001). ALZ kontrol grubu ile bütün konsantrasyonların birbiriyle kıyaslanması sonucunda ile A1-0.1 μ M (32.40 ± 0.24), A1-1 μ M (33.18 ± 1.34), A1-10 μ M (35.65 ± 1.94) ve A2-0.1 μ M’lık (33.07 ± 0.86) konsantrasyonlar istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (*p<0.05). ALZ Kontrol grubu ile diğer konsantrasyon grupları arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 4.9. TNF- α testi sonuçları Kontrol grubu ile ALZ Kontrol grubu kıyaslandığında ###p<0.001. ALZ Kontrol grubuyla diğer gruplar kıyaslandığında *p<0.05

4.4. Hayvan Deneyleri Bulguları

4.4.1. Lokomotor Aktivite Testi Sonuçları

Lokomotor aktivite testi STZ enjeksiyonundan sonra yirmi ikinci günde gerçekleştirilmiştir. Sıçanların 10 dakika boyunca alandaki hareketleri izlendi. Lokomotor aktivite testinde stereotipik, ambulatuvar hareket, dinlenme zamanı yüzdelere ve katedilen mesafeye bakıldı. Yapılan tedavi sonrasında elde edilen ölçüm sonuçları Şekil 4.10'da verildi.

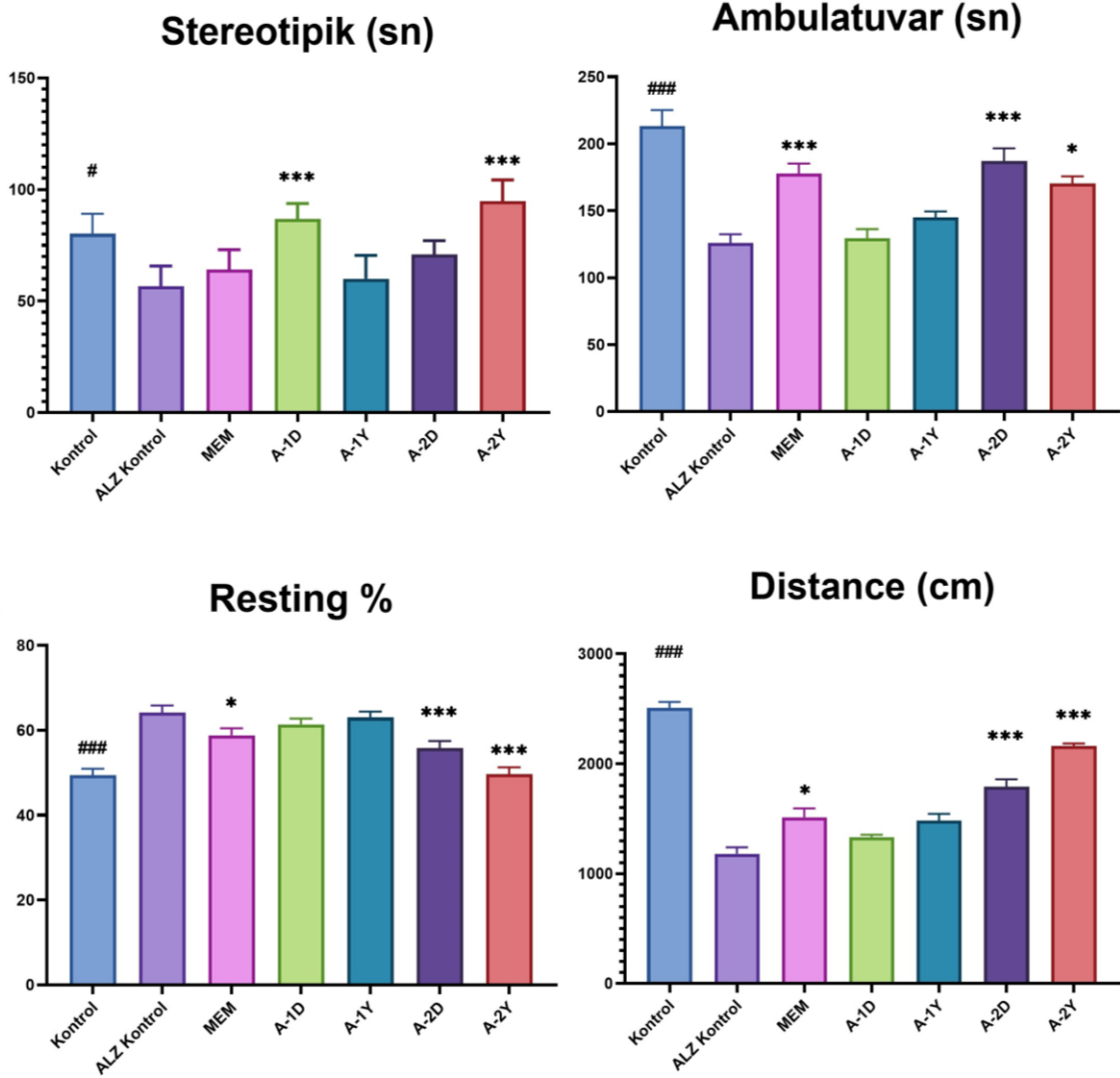
Lokomotor testi tedavi ölçümü sonrasında stereotipik hareket için kontrol (80.17 ± 9.00) ve ALZ kontrol grubu (56.65 ± 9.00) arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (#p<0.05). ALZ kontrol grubu ile tedavi grupları kıyaslandığında A-1D (86.77 ± 7.00) ve A-2Y (94.74 ± 9.00) grupları arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (*p<0.05). A-1Y ve A-2D grupları ile ALZ kontrol grubu arasında anlamlı bir fark yoktur.

Ambulatuvar hareket yüzdeleri dikkate alındığında kontrol (213.2 ± 11.00) ve ALZ kontrol grubu (125 ± 6.00) birbiriyle kıyaslandığında aralarındaki fark istatistiksel

verilere bakıldığında çok anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (### $p<0.001$). ALZ kontrol grubu ile tedavi grupları kıyaslandığında MEM grubu (177.6 ± 7.00) ve A-1Y (86.77 ± 7.00) grubu ile çok anlamlı bir fark, A-2Y (170.3 ± 5.00) grubu ile arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (*** $p<0.001$, * $p<0.05$). ALZ kontrol grubu ile A-1D ve A-2D grupları arasında ise anlamlı bir fark yoktur.

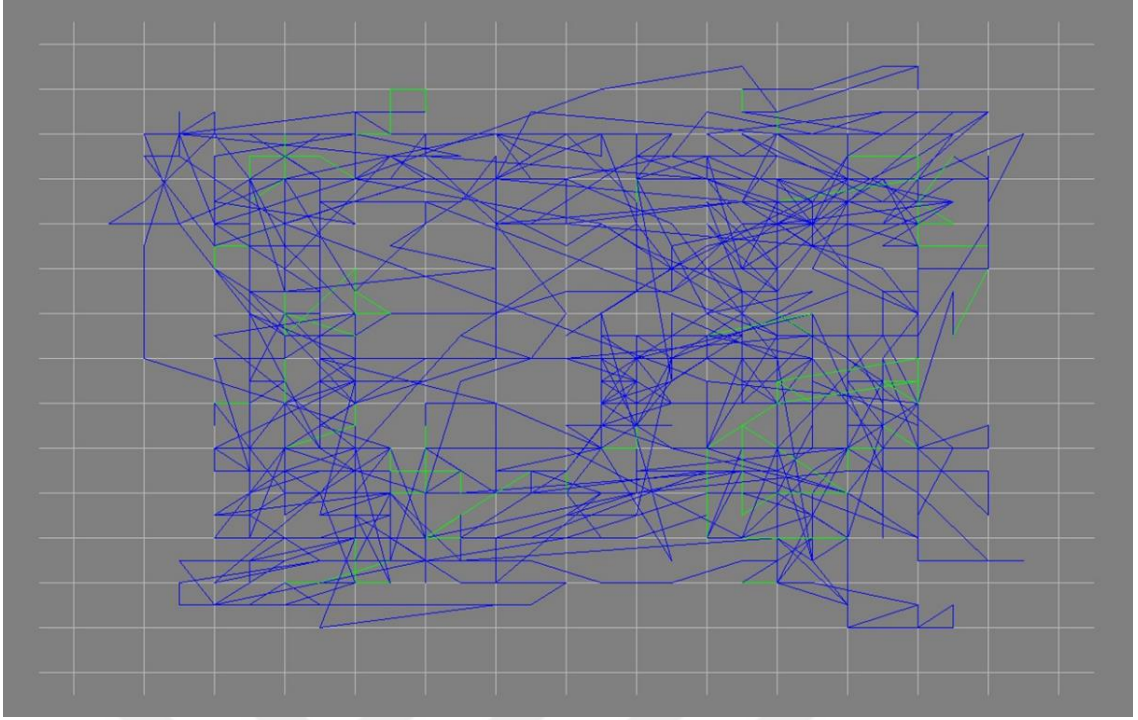
Dinlenme zaman yüzdeleri dikkate alındığında ise kontrol (49.40 ± 1.00) ile ALZ kontrol grubu (64.20 ± 1.00) arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (### $p<0.001$). ALZ kontrol grubu ile MEM grubu (58.80 ± 1.00) kıyaslamasında fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (* $p<0.05$). ALZ kontrol ve tedavi gruplarımız olan A-1Y (55.80 ± 1.00) ve A-2Y (49.60 ± 1.00) kıyaslandığında da istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (*** $p<0.001$). ALZ kontrol grubu ile A-1D ve A-2D grupları arasında ise anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Katedilen mesafeleri ölçümleri incelendiğinde ise kontrol (2508 ± 55.00) ile ALZ kontrol grubu (1180 ± 59.00) arasında istatistiksel verilere bakıldığında çok anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (### $p<0.001$). ALZ kontrol grubu ile MEM grubu (1513 ± 80.00) kıyaslamasında da arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (* $p<0.05$). ALZ kontrol ve tedavi gruplarımız olan A-1Y (1793 ± 65.00) ve A-2Y (2160 ± 23.00) kıyaslandığında da istatistiksel verilere bakıldığında çok anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (*** $p<0.001$). ALZ kontrol grubu ile A-1D ve A-2D grupları arasında ise anlamlı bir fark bulunmamıştır.



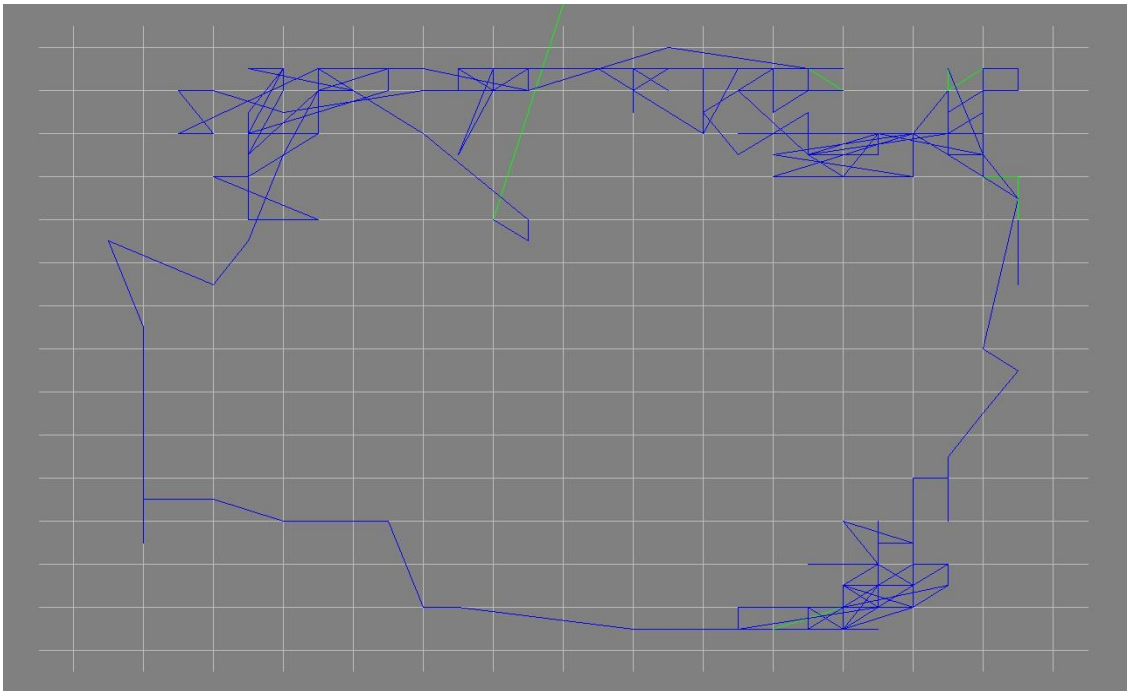
Şekil 4.10. Tedavi Sonrası Lokomotor Aktivite Testi Sonuçları. Kontrol grubu ile ALZ Kontrol grubu kıyaslandığında # $p<0.05$, ### $p<0.001$. ALZ Kontrol grubuyla diğer gruplar kıyaslandığında * $p<0.05$, *** $p<0.001$

Lokomotor aktivite testi ile ratların alandaki stereotipik, ambulatuvar, resting ve kat ettikleri mesafeler ölçüldü. Grupların kafes içinde bulundukları sırada bilgisayar tarafından elde edilen ambulatuvar hareketleri mavi renk ile vertikal hareketleri yeşil renkte olmak üzere bir aktivite haritası oluşturuldu. Elde edilen ölçüm sonuçları Şekil 4.11 - Şekil 4.17' de gösterildi.

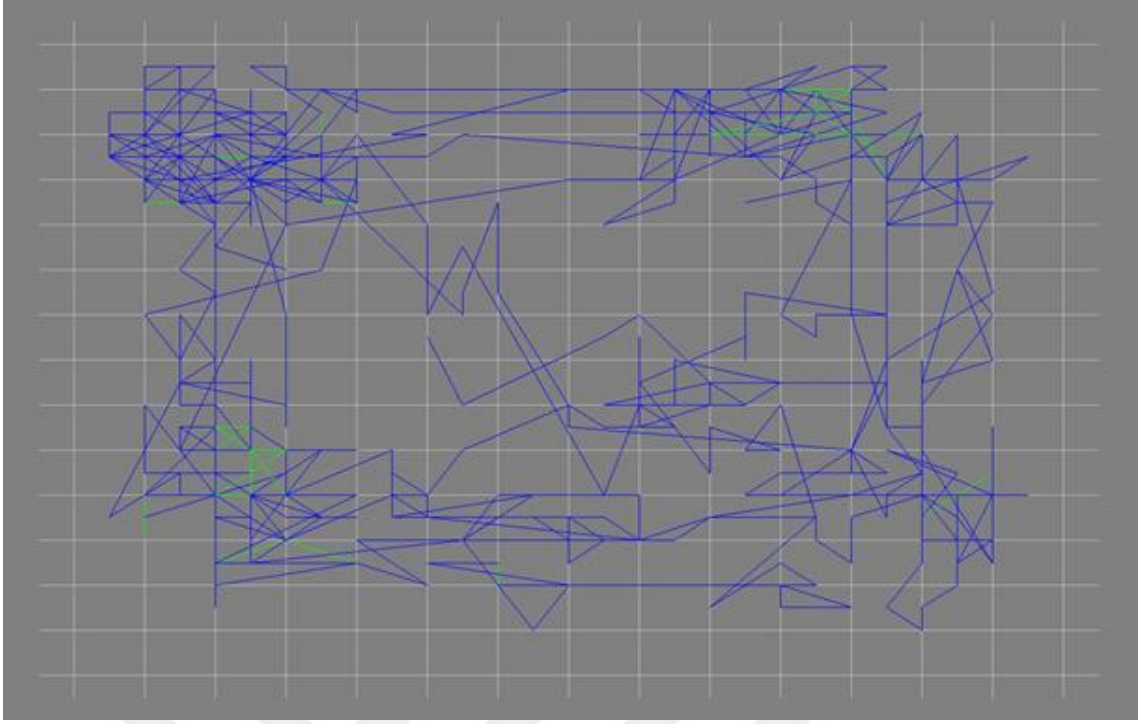


Şekil 4.11. Kontrol grubuna ait örnek lokomotor aktivite haritası

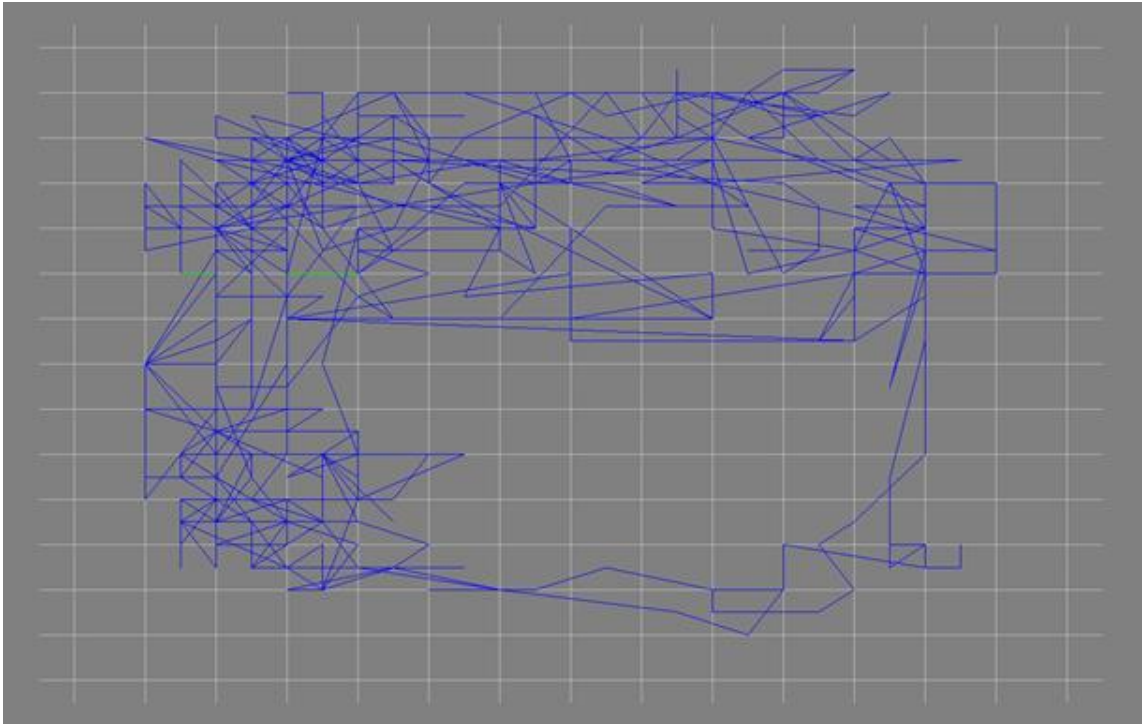
Kontrol ve tedavi grupları alandaki her bölgeyi kullandığı belirlenirken ALZ kontrol grubundaki sıçanların orta alana girmedikleri ve genellikle kenarlarda dolaştıkları belirlendi. Tedavi dozları ise MEM grubu ve kontrol arasında bir lokomotor aktivite gösterdiler.



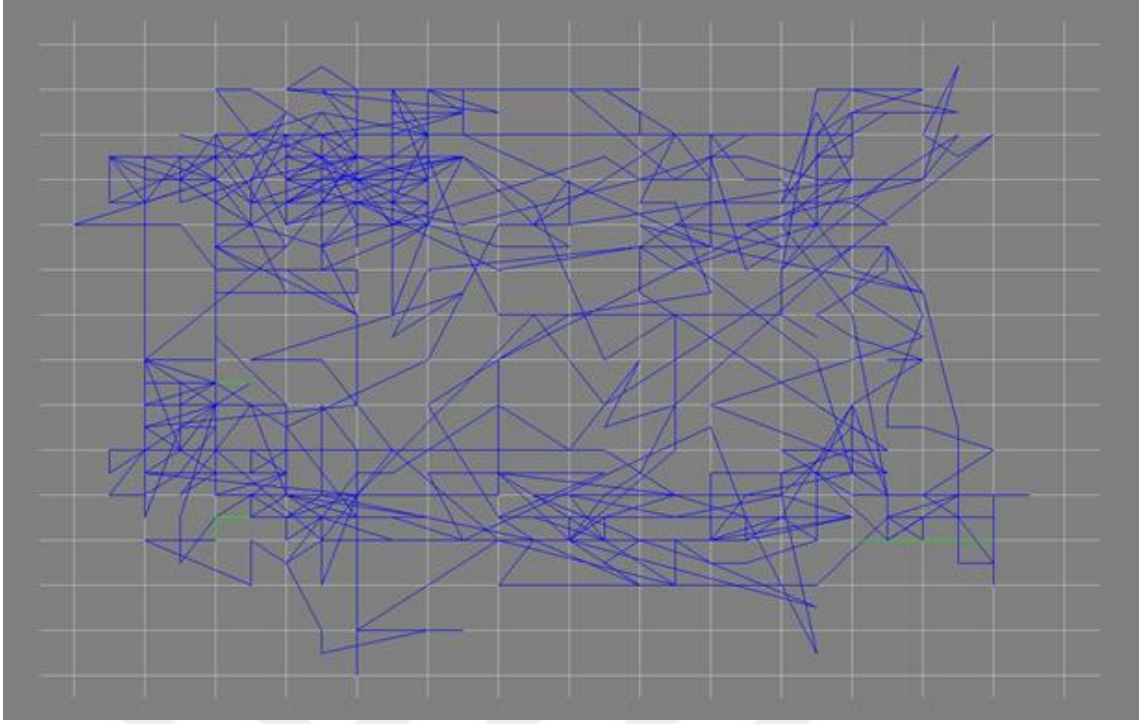
Şekil 4.12. Alzheimer kontrol grubuna ait örnek lokomotor aktivite haritası



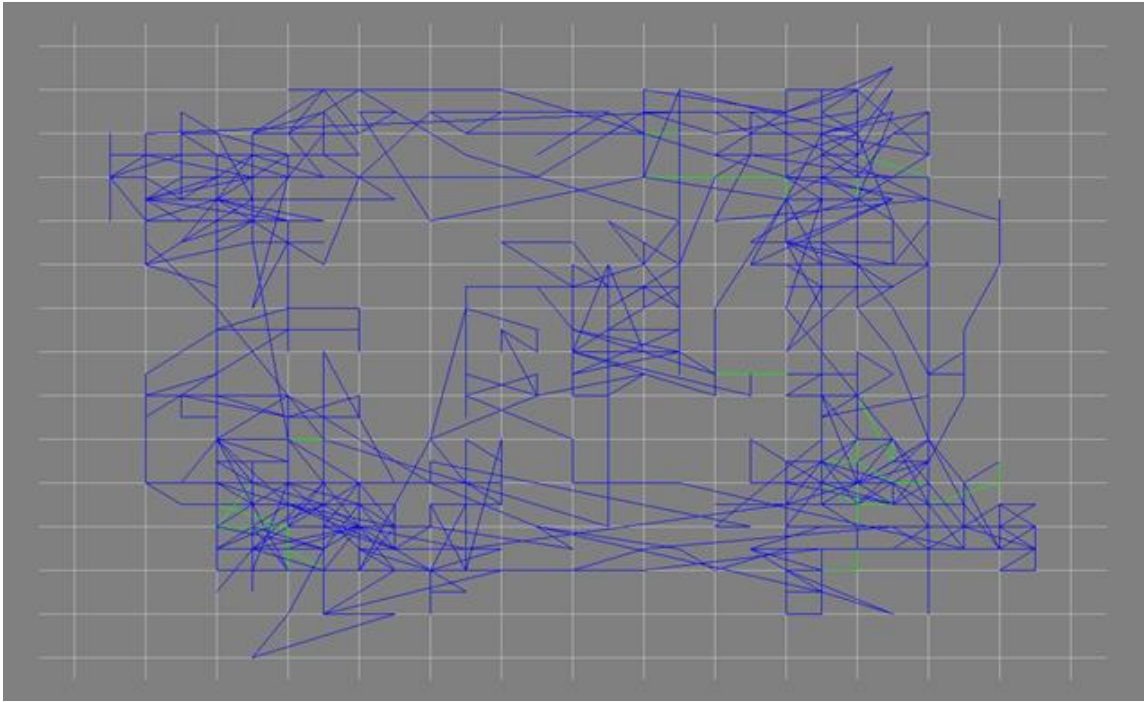
Şekil 4.13. Memantin grubuna ait örnek lokomotor aktivite haritası



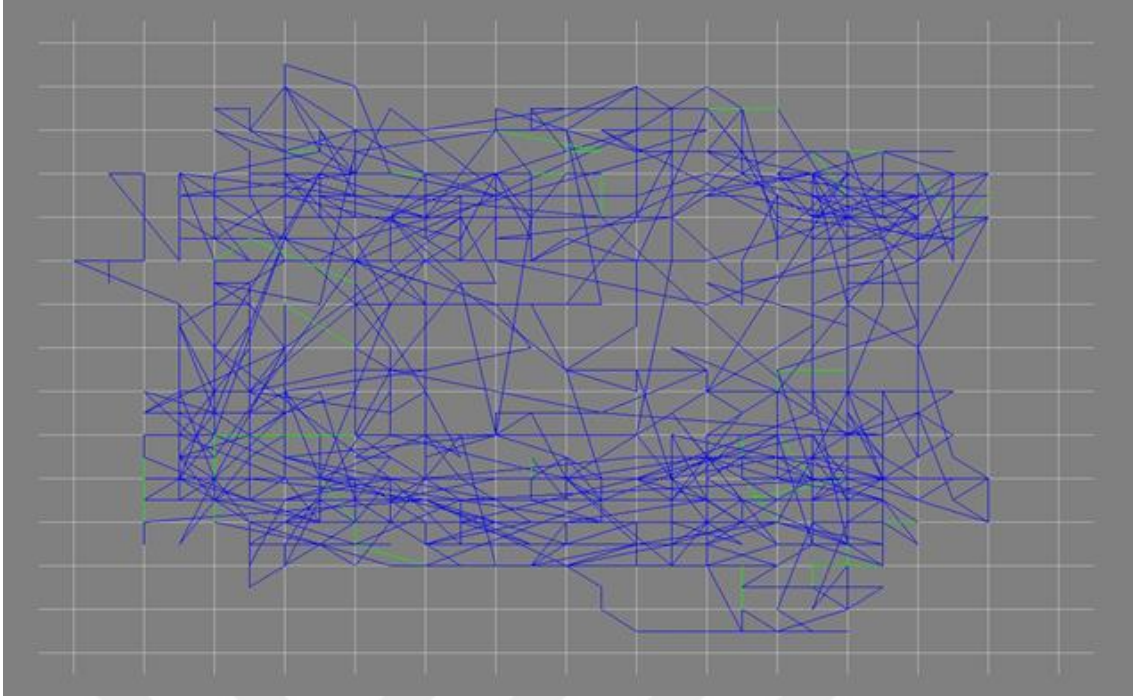
Şekil 4.14. A-1D grubuna ait örnek lokomotor aktivite haritası



Şekil 4.15. A-1Y grubuna ait örnek lokomotor aktivite haritası



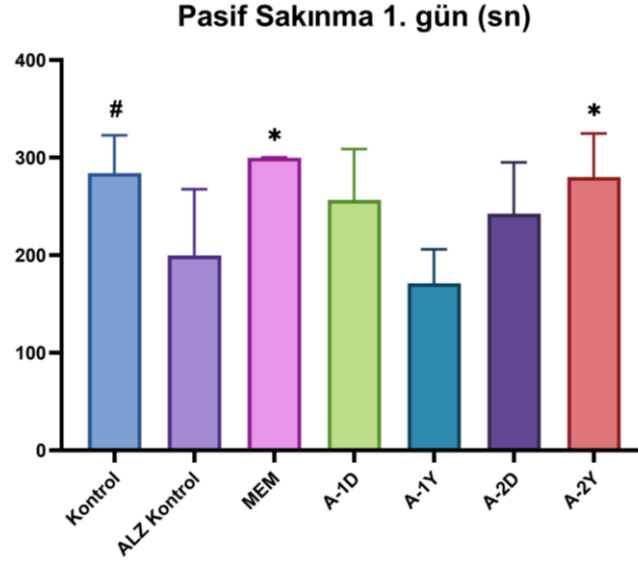
Şekil 4.16. A-2D grubuna ait örnek lokomotor aktivite haritası



Şekil 4.17. A-2Y grubuna ait örnek lokomotor aktivite haritası

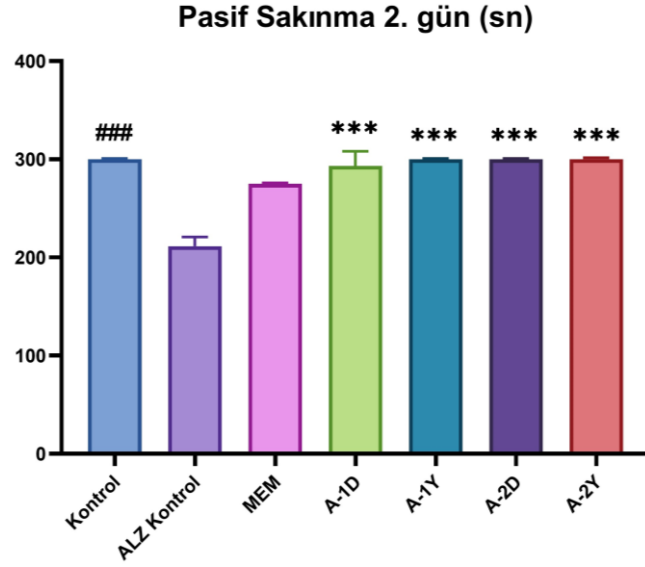
4.4.2. Pasif Sakınma Testi Sonuçları

Sıçanlara STZ ile muamele edilip 21 gün bekletildikten sonra iki gün ard arda yapılan ve sıçanları ilk gün eğitip sonraki gün öğrenmelerini kontrol eden Pasif Sakınma testinin 1. gün sonuçları Şekil 4.18’de verildi. 1. gün yapılan eğitim testi sonuçlarına göre kontrol grubu (284.2 ± 38.78) ile ALZ Kontrol grubu (199.6 ± 68.12) arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır ($\#p<0.05$). ALZ kontrol grubu ile MEM grubu (299.8 ± 0.40) kıyaslamasında da arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında çok anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır ($*p<0.05$). ALZ kontrol ve tedavi grubundan A-2Y (280.0 ± 44.72) kıyaslandığında da aralarındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır ($*p<0.05$). ALZ kontrol grubu ile A-1D, A-2D ve A-1Y grupları arasında ise anlamlı bir fark bulunmamıştır.



Şekil 4.18. Tedavi Sonrası Pasif Sakınma 1. gün Test sonuçları. Kontrol grubu ile ALZ kontrol grubu kıyaslandığında # $p<0.05$. ALZ kontrol grubuyla diğer gruplar kıyaslandığında * $p<0.05$

Pasif Sakınma testinin 2. gün sonuçları Şekil 4.19’da verilmiştir. 2. gün yapılan öğrenme testi sonuçlarına göre kontrol grubu (300.0 ± 0.70) ile ALZ kontrol grubu (211.5 ± 9.29) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (### $p<0.001$). ALZ kontrol grubu ile MEM grubu (275.0 ± 0.81) kıyaslamasında istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (** $p<0.001$). ALZ kontrol ve tedavi grupları kıyaslandığında A-1D (293.4 ± 14.76), A-2D (300.0 ± 0.70), A-1Y (300.0 ± 0.70) ve A-2Y (300.0 ± 1.58) gruplarının tamamında arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (** $p<0.001$).



Şekil 4.19. Tedavi Sonrası Pasif Sakınma 2. gün Test sonuçları. Kontrol grubu ile ALZ kontrol grubu kıyaslandığında ### $p<0.001$. ALZ kontrol grubuyla diğer gruplar kıyaslandığında *** $p<0.001$

4.4.3. Morris Water Mase Test Sonuçları

Morris Water Mase testinde güney, doğu, kuzey ve batı olmak üzere hergün farklı bir yönden atılmak koşuluyla sıçanların 4 gün boyunca havuzda yüzdürülmesi ile oluşur.

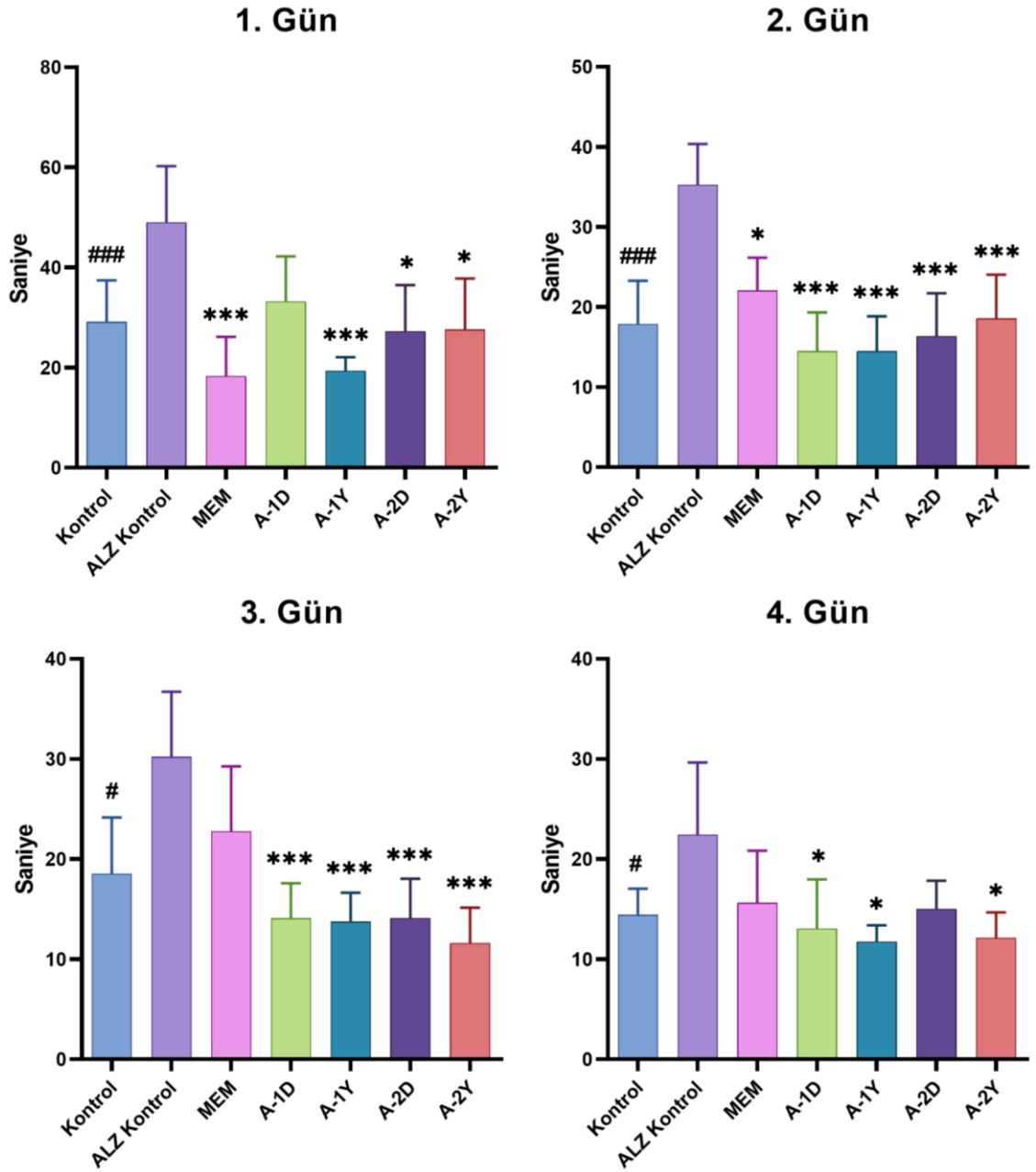
1. gün yapılan water mase testi sonuçlarına göre kontrol grubu (29.13 ± 8.28) ile ALZ Kontrol grubu (49.0 ± 11.24) kıyaslandığında arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (### $p<0.001$). ALZ Kontrol grubu ile MEM grubu (18.25 ± 7.88) kıyaslamasında da arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (*** $p<0.001$). ALZ kontrol ve tedavi grupları kıyaslandığında A-2D grubu (14.46 ± 4.39) kıyaslamasında da istatistiksel verilere bakıldığında çok anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (*** $p<0.001$). ALZ kontrol grubu ile A-1Y (27.25 ± 9.24) ve A-2Y (27.58 ± 10.18) gruplarında ise fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (* $p<0.05$). ALZ kontrol grubu ile A-1D grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlılık yoktur.

2. gün yapılan water mase testi sonuçlarına göre kontrol grubu (17.85 ± 5.42) ile ALZ kontrol grubu (35.25 ± 5.10) kıyaslandığında arasında istatistiksel verilere

bakıldığında çok anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (#### $p<0.001$). ALZ kontrol grubu ile MEM grubu (22.05 ± 4.09) kıyaslamasında da arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır ($*p<0.05$). ALZ kontrol ve tedavi grupları kıyaslandığında A-1D grubu (14.46 ± 4.86), A-2D grubu (14.46 ± 4.39), A-1Y grubu (16.40 ± 5.31) ve A-2Y grubu (18.55 ± 5.47) kıyaslamasında ise arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (*** $p<0.001$).

3. gün yapılan water mase testi sonuçlarına göre kontrol grubu (18.54 ± 5.61) ile ALZ kontrol grubu (30.20 ± 6.50) kıyaslandığında arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır ($\#p<0.05$). ALZ kontrol ve tedavi grupları kıyaslandığında A-1D grubu (14.07 ± 3.52), A-2D grubu (13.75 ± 2.89), A-1Y grubu (14.10 ± 3.93) ve A-2Y grubu (11.60 ± 3.54) ile arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (*** $p<0.001$). ALZ kontrol grubu ile MEM grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

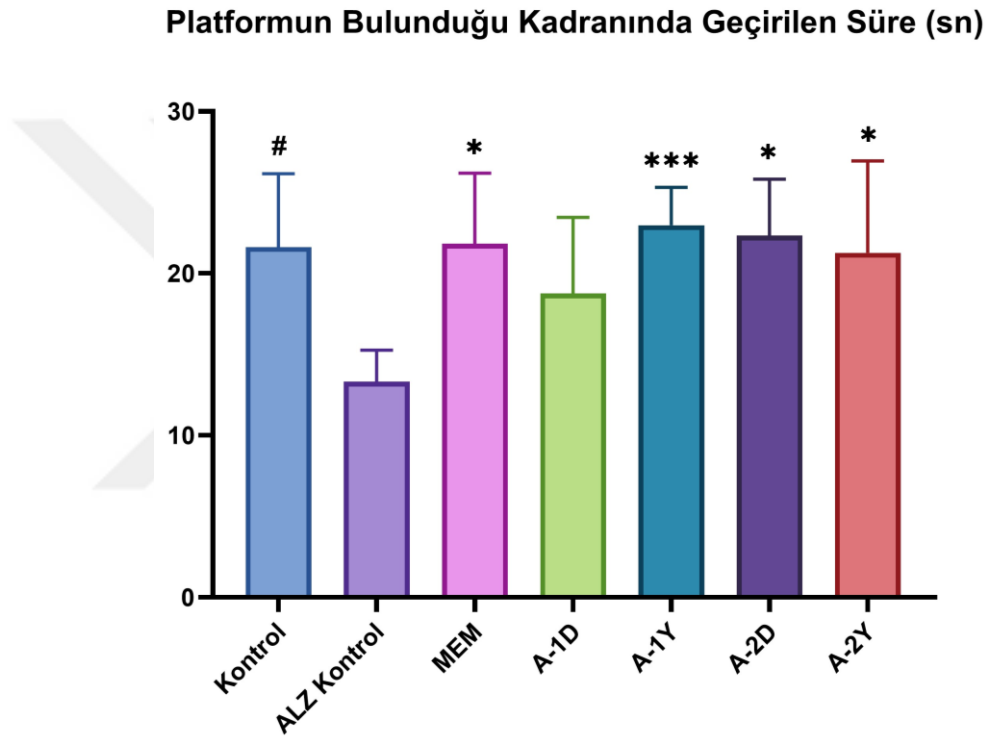
4. gün yapılan water mase testi sonuçlarına göre kontrol grubu (14.42 ± 2.62) ile ALZ kontrol grubu (22.43 ± 7.22) kıyaslandığında arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır ($\#p<0.05$). ALZ kontrol ve tedavi grupları kıyaslandığında A-1D grubu (13.04 ± 4.92), A-2D grubu (11.75 ± 1.63) ve A-2Y grubu (12.15 ± 2.52) ile aralarında arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır ($*p<0.05$). ALZ kontrol grubu ile MEM ve A-1Y grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur.



Şekil 4.20. Tedavi sonrası ilk dört gün Water Mase test sonuçları. Kontrol grubu ile ALZ kontrol grubu kıyaslandığında # $p<0.05$, ### $p<0.001$. ALZ kontrol grubuyla diğer gruplar kıyaslandığında * $p<0.05$, *** $p<0.001$

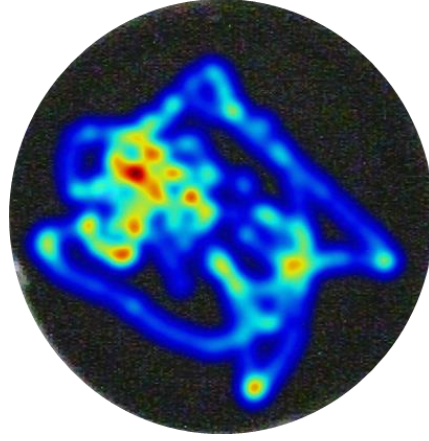
Deney sonu ısı haritalarında tüm grupların kadranda geçirdikleri süre incelendiğinde kontrol grubu (21.63 ± 4.53) ile ALZ kontrol grubu (13.30 ± 1.95) kıyaslandığında arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (# $p<0.05$). ALZ kontrol grubu ile MEM grubu (21.83 ± 4.36) kıyaslamasında da arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (* $p<0.05$). ALZ kontrol grubu

ile A-2D grubu (22.97 ± 2.33) kıyaslamasında da istatistiksel verilere bakıldığında çok anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır ($***p<0.001$). ALZ kontrol ve diğer tedavi grupları kıyaslandığında A-1Y grubu (22.23 ± 3.48), ve A-2Y grubu (21.27 ± 5.68) ile aralarında arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır ($*p<0.05$). ALZ kontrol grubu ile A-1D grubu arasındaki fark istatistiksel verilerde anlamlılık yoktur(Şekil 4.21).

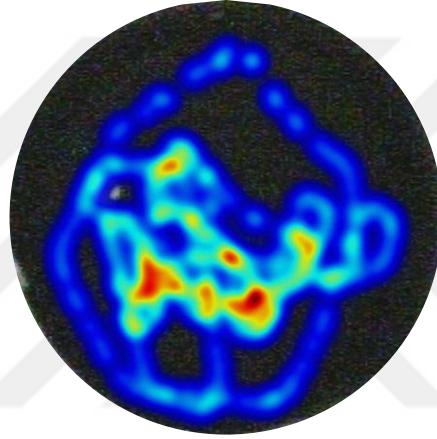


Şekil 4.21. Platformun bulunduğu kadranda geçirilen süre grafiği. Kontrol grubu ile ALZ kontrol grubu kıyaslandığında $\#p<0.05$. ALZ kontrol grubuyla diğer gruplar kıyaslandığında $*p<0.05$, $***p<0.001$

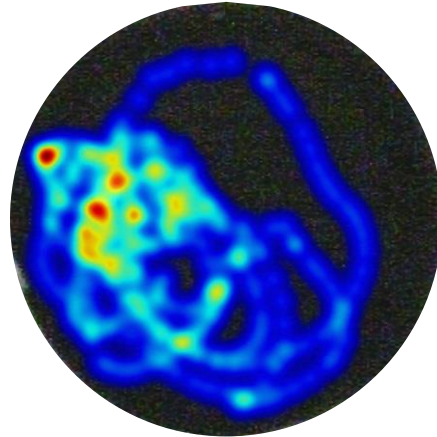
Deney gruplarındaki örnek sıcaklık harita görüntüleri Şekil 4.21 - Şekil 4.27 arasında verilmiştir. Sıcaklık haritaları incelendiğinde de kadranda bulunma süreleri ile benzer bir görüntü elde edilmiştir.



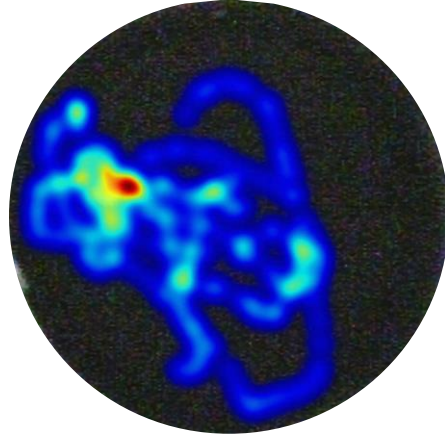
Şekil 4.22. Water Mase Testi Kontrol grubu örnek sıcaklık haritası



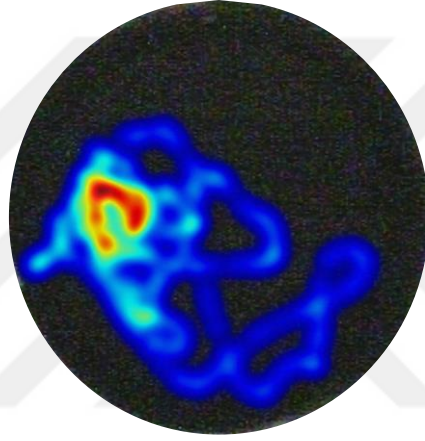
Şekil 4.23. Water Mase Testi ALZ Kontrol grubu örnek sıcaklık haritası



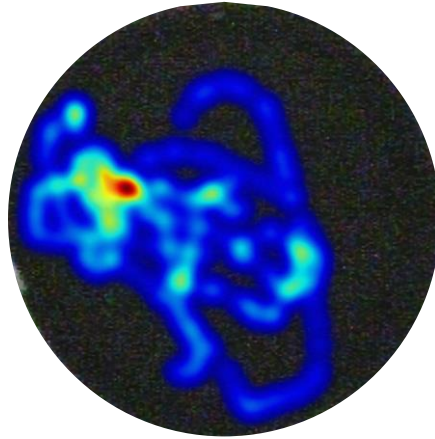
Şekil 4.24. Water Mase Testi MEM grubu örnek sıcaklık haritası



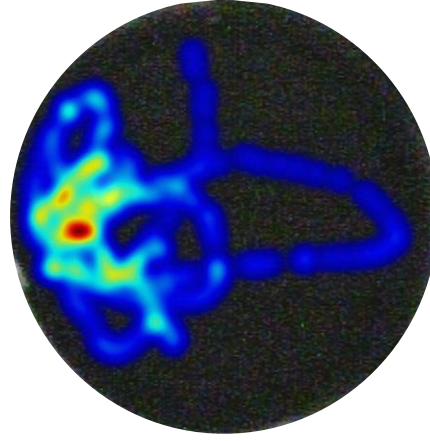
Şekil 4.25. Water Mase Testi A-1D grubu örnek sıcaklık haritası



Şekil 4.26. Water Mase Testi A-1Y grubu örnek sıcaklık haritası



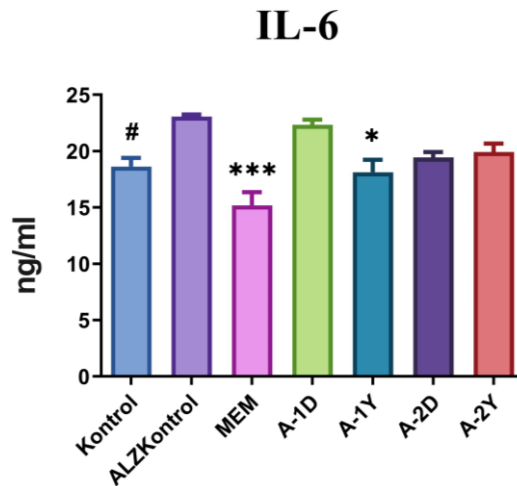
Şekil 4.27. Water Mase Testi A-2D grubu örnek sıcaklık haritası



Şekil 4.28. Water Mase Testi A-2Y grubu örnek sıcaklık haritası

4.4.4. IL-6 Test Sonuçları

IL-6 testi sonuçları Şekil 4.29’da verilmiştir. Kontrol grubu (18.63 ± 1.33) ile ALZ kontrol grubu (22.08 ± 0.26) kıyaslandığında arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır ($\#p<0.05$). ALZ kontrol ve MEM grubu (15.20 ± 2.02) kıyaslandığında arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında çok anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır ($***p<0.001$). ALZ kontrol ve A-2D grubu (18.14 ± 1.89) kıyaslandığında arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır ($*p<0.05$). ALZ kontrol grubu ile A-1D, A-1Y ve A-2Y grupları arasında istatistiksel olarak anlamlılık yoktur.

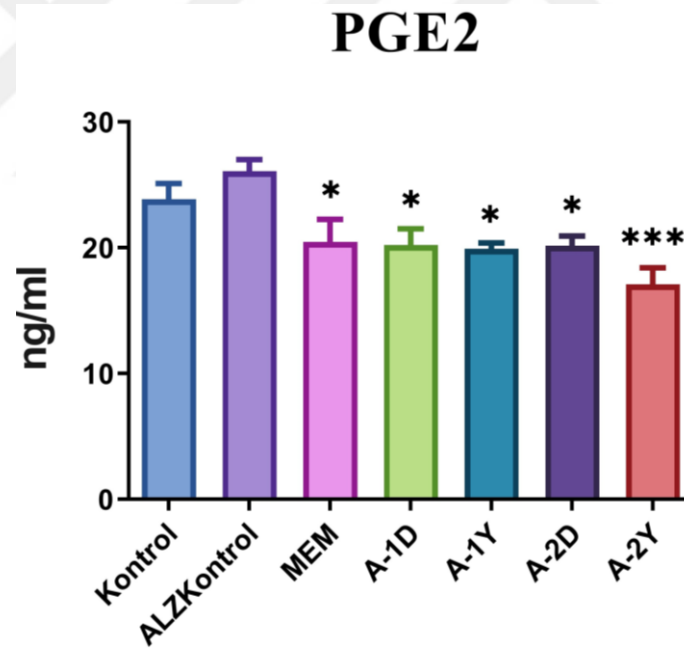


Şekil 4.29. IL-6 test sonuçları

Kontrol grubu ile ALZ kontrol grubu kıyaslandığında $\#p<0.05$. ALZ kontrol grubuyla diğer gruplar kıyaslandığında $*p<0.05$, $***p<0.001$

4.4.5. PGE2 Test Sonuçları

PGE2 testi sonuçları Şekil 4.30’da verilmiştir. Kontrol grubu (23.86 ± 2.52) ile ALZ kontrol grubu (26.10 ± 1.57) kıyaslandığında arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır. ALZ kontrol ve MEM grubu (20.47 ± 3.61) kıyaslandığında aralarında arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (* $p < 0.05$). ALZ kontrol ve A-1D grubu (20.21 ± 2.24), A-2D grubu (19.91 ± 0.96) ve A-1Y grubu (20.16 ± 1.33) kıyaslandığında arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (* $p < 0.05$). ALZ kontrol grubu ile A-2Y grupları (17.09 ± 2.67) kıyaslandığında arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında çok anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (*** $p < 0.001$).

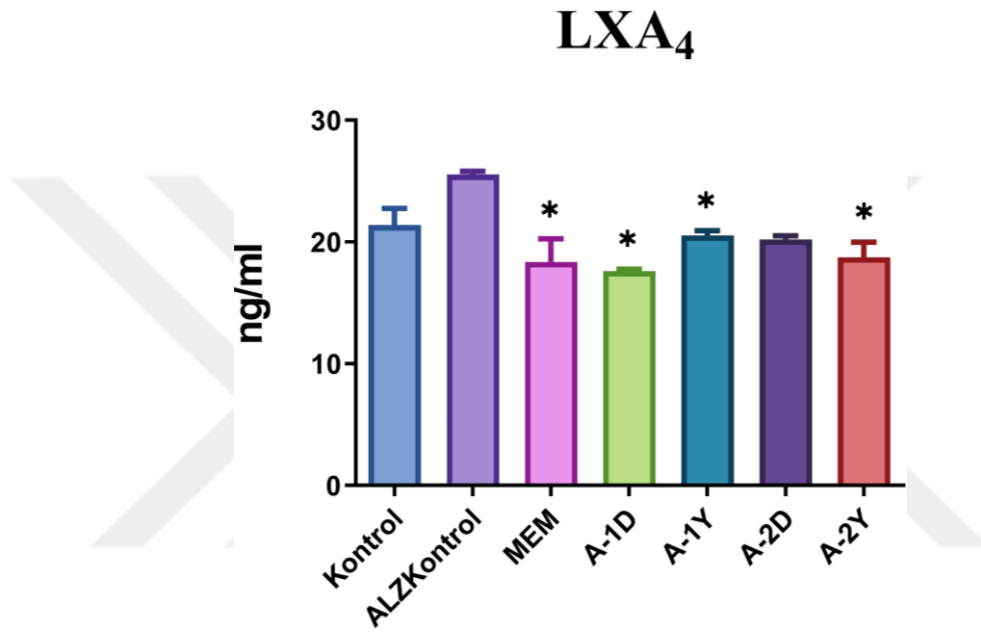


Şekil 4.30. PGE2 test sonuçları. ALZ kontrol grubuyla diğer gruplar kıyaslandığında * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

4.4.6. LXA4 Test Sonuçları

LXA4 testi sonuçları Şekil 4.31’de verilmiştir. Kontrol grubu (21.40 ± 2.36) ile ALZ kontrol grubu (25.55 ± 0.44) kıyaslandığında arasındaki fark istatistiksel

olarak herhangi bir anlamlılık bulunmamıştır. ALZ kontrol ve MEM grubu (18.37 ± 3.78) kıyaslandığında aralarında arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (* $p < 0.05$). ALZ kontrol ve A-1D grubu (17.61 ± 0.25), A-2D grubu (20.54 ± 0.88) ve A-2Y grubu (18.73 ± 2.18) kıyaslandığında aralarında arasındaki fark istatistiksel verilere bakıldığında çok anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (* $p < 0.05$). ALZ kontrol grubu ile A-1Y grubu arasındaki fark istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık bulunmamıştır.



Şekil 4.31. LXA₄ test sonuçları. ALZ kontrol grubuyla diğer gruplar kıyaslandığında * $p < 0.05$

4.6. Patolojik Bulgular

4.6.1. Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik değerlendirmede gruplar arasındaki farklar istatistiksel verilere bakıldığında anlamlı olduğu sonuçlarına varılmıştır (Tablo 4.6).

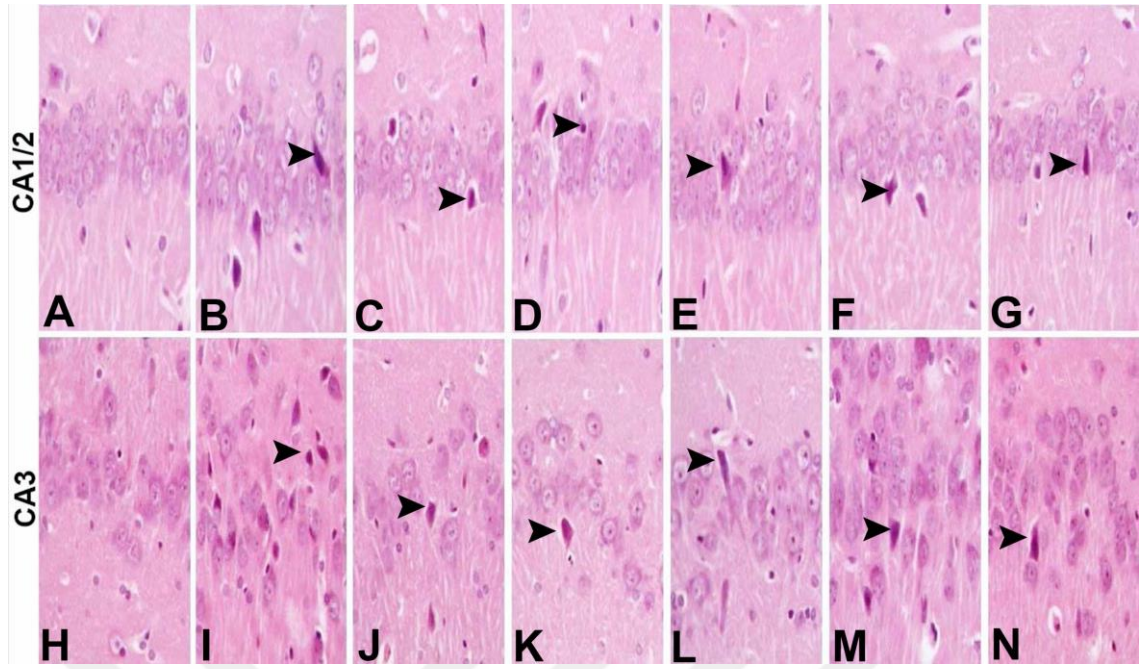
Tablo 4.6. Nöronlarda görülen dejeneratif değişimlerin istatistiksel analizi.

Gruplar	CA1/CA2	CA3
Kontrol	0,16±0,40 ^a	0,33±0,51 ^a
ALZ Kontrol	2,83±0,40 ^b	3,00±0,00 ^b
MEM	1,83±0,40 ^c	2,16±0,40 ^c
FA-1D	1,83±0,40 ^c	1,00±0,00 ^d
FA-1Y	1,33±0,51 ^d	1,16±0,40 ^d
FA-2D	1,83±0,40 ^c	2,16±0,40 ^c
FA-2Y	2,00±0,00 ^c	1,33±0,51 ^d

^{a,b,c,d} Aynı sütundakigruplar arası farklılığı göstermektedir (p <0.05)

Kontrol sıçanların CA1/CA2 ve CA3 kısımlarındaki nöronlar normal histolojik görünümdeydi. Diğer uygulama gruplarında beyin CA1/CA2 ve CA3 kısımlarındaki nöronlarda farklı düzeyde piknotik ve dejeneratif değişimlere rastlandı.

CA1/CA2 kısmındaki dejeneratif nöronların en fazla ALZ kontrol grubunda olduğu belirlendi. Kombine gruplardan MEM, A-1D, A-2D ve A-2Y gruplarında orta düzeyde, A-1Y grubunda ise hafif düzeyde dejeneratif nöronların olduğu tespit edildi. CA3 kısmında ise dejeneratif nöronların CA1/CA2'ye benzer şekilde en fazla ALZ kontrol grubunda olduğu tespit edildi. Diğer uygulama gruplarından MEM ile A-2D'de dejeneratif nöronlar orta düzeyde, A-1D, A-1Y ile A-2Y'de ise hafif düzeydeydi. Mikroskopik olarak piknotik ve dejeneratif değişimlerin olduğu nöronların çekirdekleri koyu ve büzüşmüş haldeydi (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. Deney Gruplarının Histopatolojik değerlendirilmesi

(A-G) CA1/2 kısmındaki piknotik-dejeneratif nöronlar. (A)-Kontrol grubu. Normal histolojik görünüm, (B)-ALZ kontrol grubu. Şiddetli düzeyde, (C)-MEM grubu. Orta düzeyde (D)-A-1D grubu. Orta düzeyde, (E)-A-1Y grubu. Hafif düzeyde, (F)-A-2D grubu. Orta düzeyde, (G)-A-2Y grubu. Orta düzeyde piknotik-dejeneratif nöronlar, (H-N) CA3 kısmındaki piknotik-dejeneratif nöronlar. (H)-Kontrol grubu. Normal histolojik görünüm, (I)-ALZ kontrol grubu. Şiddetli düzeyde, (J)-MEM grubu. Orta düzeyde (K)-A-1D grubu. Hafif düzeyde, (L)-A-1Y grubu. Hafif düzeyde, (M)-A-2D grubu. Orta düzeyde, (N)-A-2Y grubu. Hafif düzeyde piknotik-dejeneratif nöronlar, (►), H-E.

4.6.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

β -Amyloid, Tau ve AChE yönünden yapılan immünohistokimyasal boyamalarda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edildi ($p < 0.05$).

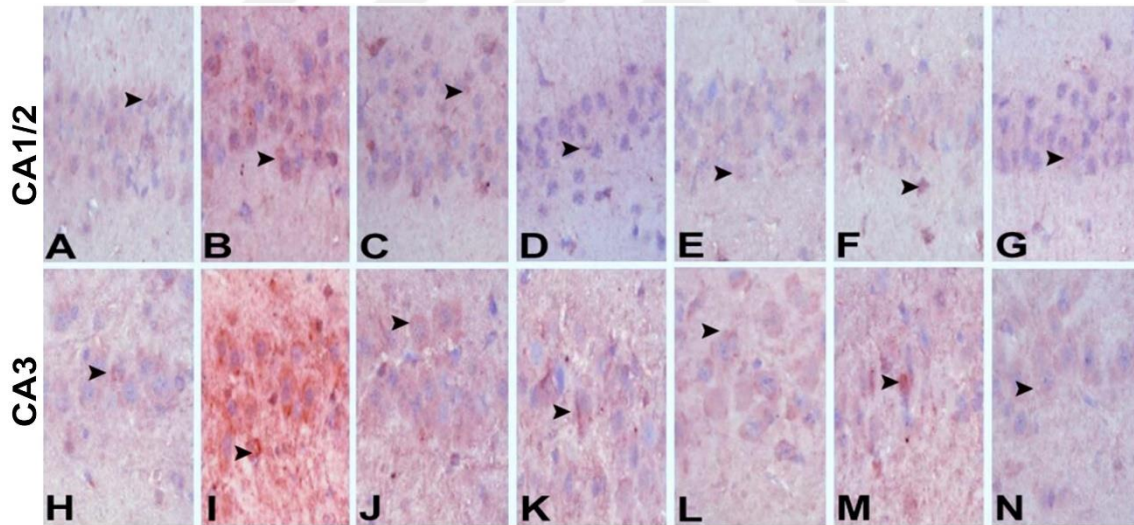
İmmünohistokimyasal olarak β -Amyloid ile yapılan boyamalarda CA3 kısmındaki immünopozitiflikler CA1/2 kısmına göre daha fazlaydı. CA1 kısmında ALZ kontrol grubunda şiddetli düzeyde, MEM grubunda orta düzeyde, diğer gruplarda ise hafif düzeyde immünopozitiflikler görüldü. CA3 kısmında ALZ kontrol grubunda çok şiddetli

düzeydeki immunpozitifliklerin MEM, A-1D ile A-2D grubunda şiddetli, A-1Y ile A-2Y grubunda orta düzeyde olduğu tespit edildi (Tablo 4.7, Şekil 4.33).

Tablo 4.7. β -Amyloid ile yapılan immunohistokimyasal boyamaları

Gruplar	CA1/CA2	CA3
Kontrol	0,83±0,40 ^a	1,16±0,40 ^a
ALZ kontrol	2,83±0,40 ^b	3,66±0,51 ^b
MEM	2,00±0,00 ^c	2,66±0,51 ^c
A-1D	1,33±0,51 ^a	2,83±0,40 ^c
A-1Y	1,16±0,40 ^a	2,00±0,00 ^d
A-2D	1,33±0,51 ^a	2,66±0,51 ^c
A-2Y	1,00±0,00 ^a	1,83±0,40 ^d

^{a,b,c,d} Aynı sütundaki gruplar arası farklılığı göstermektedir (p <0.05)



Şekil 4.33. β -Amyloid immunpozitiflikler.

(A-G) CA1/2 kısmındaki β -Amyloid immunpozitiflikler. (A)-Kontrol grubu. Hafif düzeyde, (B)-ALZ kontrol grubu. Şiddetli düzeyde, (C)-MEM grubu. Orta düzeyde (D)-A-1D grubu. Hafif düzeyde, (E)-A-1Y grubu. Hafif düzeyde, (F)-A-2D grubu. Hafif düzeyde, (G)-A-2Y grubu. Hafif düzeyde immunpozitiflik, (H-N) CA3 kısmındaki β -Amyloid immunpozitiflikler. (H)-Kontrol grubu. Hafif düzeyde, (I)-ALZ kontrol grubu.

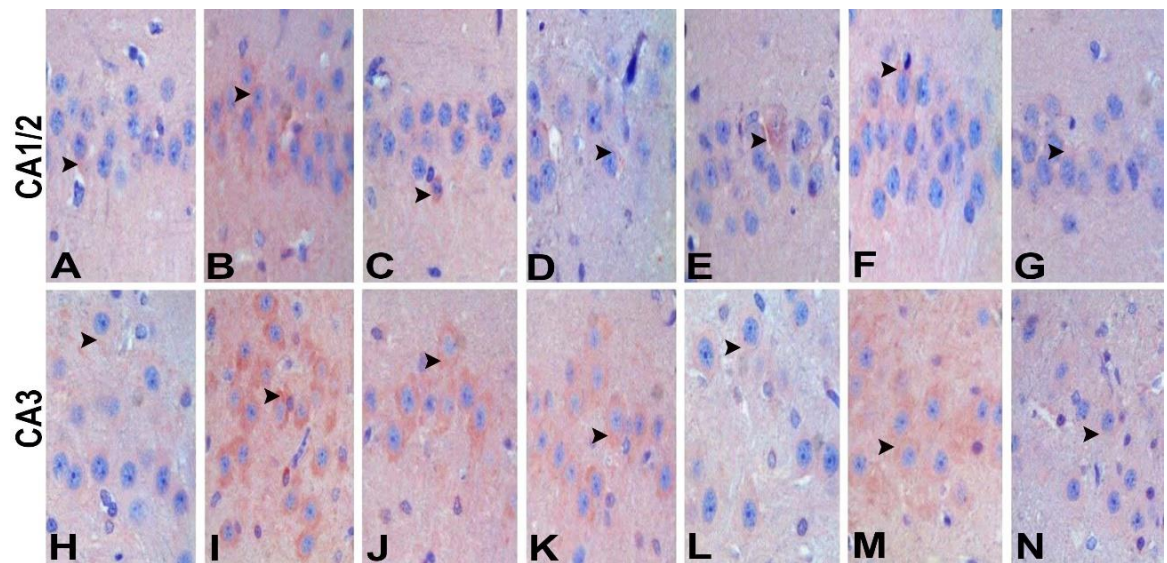
Çok şiddetli düzeyde, (J)-MEM grubu. Şiddetli düzeyde (K)-A-1D grubu. Şiddetli düzeyde, (L)-A-1Y grubu. Orta düzeyde, (M)-A-2D grubu. Şiddetli düzeyde, (N)-A-2Y grubu. Orta düzeyde immunpozitiflikler (►). IHC.

İmmunohistokimyasal olarak Tau ile yapılan boyamalarda CA1/2 kısmındaki immunpozitiflikler ALZ kontrol grubunda şiddetli iken, MEM ile A-2D grubunda orta, diğer uygulama grupları olan A-1D, A-1Y ile A-2Y’de ise genel olarak hafif seviyedeydi. CA3 kısmında da CA1/2’ye benzer bulgular tespit edilmekle birlikte, sadece A-1D grubunda CA1/2 bölgesinde görülen hafif düzeydeki immunpozitifliklerin yerini CA3 bölgesinde orta düzeyde immunpozitifliklerin aldığı gözlemlendi (Tablo 4.8, Şekil 4.34).

Tablo 4.8. Tau ile yapılan immunohistokimyasal boyamaları.

Gruplar	CA1/CA2	CA3
Kontrol	0,83±0,40 ^a	1,00±0,00 ^a
ALZ kontrol	2,66±0,51 ^b	3,00±0,00 ^b
MEM	2,16±0,40 ^c	2,33±0,51 ^c
A-1D	1,16±0,40 ^a	2,16±0,40 ^c
A-1Y	1,33±0,51 ^a	1,00±0,00 ^a
A-2D	1,83 ±0,40 ^c	2,16±0,40 ^c
A-2Y	0,83±0,40 ^a	1,16±0,40 ^a

^{a,b,c} Aynı sütundaki gruplar arası farklılığı göstermektedir (p <0.05)



Şekil 4.34. Tau immunpozitiflikler.

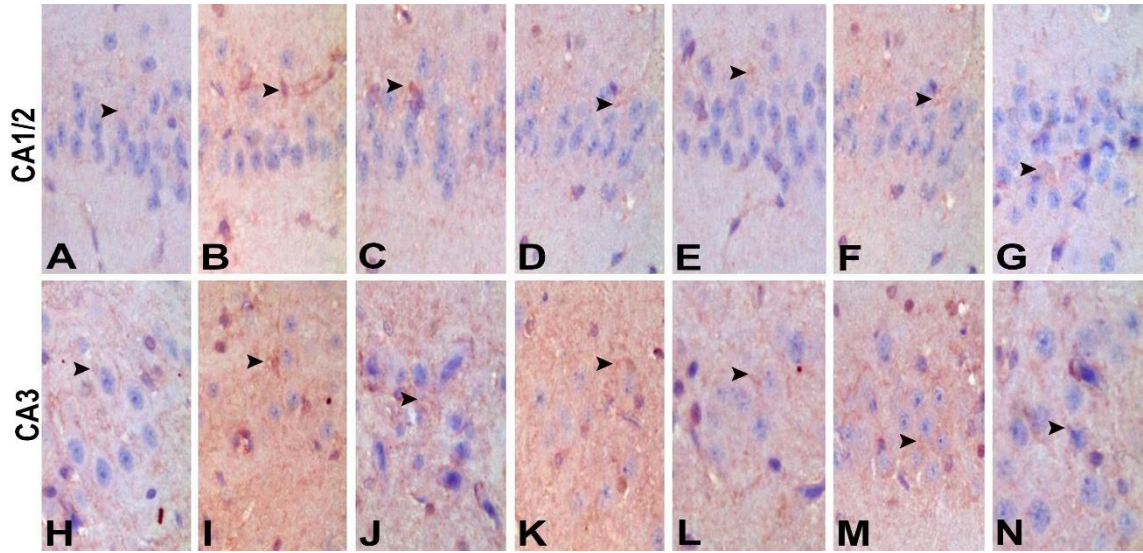
(A-G) CA1/2 kısmındaki Tau immunpozitiflikler. (A)-Kontrol grubu. Hafif düzeyde, (B)-ALZ kontrol grubu. Şiddetli düzeyde, (C)-MEM grubu. Orta düzeyde (D)-A-1D grubu. Hafif düzeyde, (E)-A-1Y grubu. Hafif düzeyde, (F)-A-2D grubu. Orta düzeyde, (G)-A-2Y grubu. Hafif düzeyde immunpozitiflik, (H-N) CA3 kısmındaki Tau immunpozitiflikler. (H)-Kontrol grubu. Hafif düzeyde, (I)-ALZ kontrol grubu. Şiddetli düzeyde, (J)-MEM grubu. Orta düzeyde (K)-A-1D grubu. Orta düzeyde, (L)-A-1Y grubu. Hafif düzeyde, (M)-A-2D grubu. Orta düzeyde, (N)-A-2Y grubu. Hafif düzeyde İmmunpozitiflikler (►). IHC.

İmmunohistokimyasal olarak AChE ile yapılan boyamalarda CA3 kısmındaki immunpozitiflikler ALZ kontrol ve A-1D grubunda şiddetli iken, MEM ile A-2D grubunda orta seviyedeydi. Kontrol, A-1Y ve A-2Y gruplarında ise hafif olarak belirlendi. CA1/2 kısmında ise şiddetli İmmunpozitiflikler en fazla ALZ kontrol grubundaydı. Diğer uygulama gruplarından MEM, A-1D ile A-2D gruplarında orta, Kontrol, A-1Y ile A-2Y gruplarında hafif düzeyde immunpozitifliklere rastlandı (Tablo 4.9, Şekil 4.35).

Tablo 4.9. AChE ile yapılan immunohistokimyasal boyamaları.

Gruplar	CA1/CA2	CA3
Kontrol	1,16±0,51 ^a	1,33±0,51 ^a
ALZ kontrol	2,83±0,40 ^b	3,00±0,00 ^b
MEM	2,00±0,00 ^c	2,16±0,40 ^c
A-1D	2,16±0,40 ^c	2,83±0,40 ^b
A-1Y	1,16±0,40 ^a	1,33±0,51 ^a
A-2D	1,83 ±0,40 ^c	2,00±0,00 ^c
A-2Y	1,00±0,00 ^a	1,16±0,40 ^a

^{a,b,c} Aynı sütundaki gruplar arası farklılığı göstermektedir (p <0.05)



Şekil 4.35. AChE immupozitiflikler.

(A-G) CA1/2 kısmındaki AChE immupozitiflikler (A)-Kontrol grubu. Hafif düzeyde, (B)-ALZ kontrol grubu. Şiddetli düzeyde, (C)-MEM grubu. Orta düzeyde (D)-A-1D grubu. Orta düzeyde, (E)-A-1Y grubu. Hafif düzeyde, (F)-A-2D grubu. Orta düzeyde, (G)-A-2Y grubu. Hafif düzeyde immupozitiflik, (H-N) CA3 kısmındaki AChE immupozitiflikler. (H)-Kontrol grubu. Hafif düzeyde, (I)-ALZ kontrol grubu. Şiddetli düzeyde, (J)-MEM grubu. Orta düzeyde (K)-A-1D grubu. Şiddetli düzeyde, (L)-A-1Y grubu. Hafif düzeyde, (M)-A-2D grubu. Orta düzeyde, (N)-A-2Y grubu. Hafif düzeyde immupozitiflikler (►). IHC.

4.6.3. İn situ Hibridizasyon Bulgular

β -Amyloid, Tau ve AChE yönünden yapılan in situ hibridizasyon ile yapılan boyamalarda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edildi ($p < 0.05$).

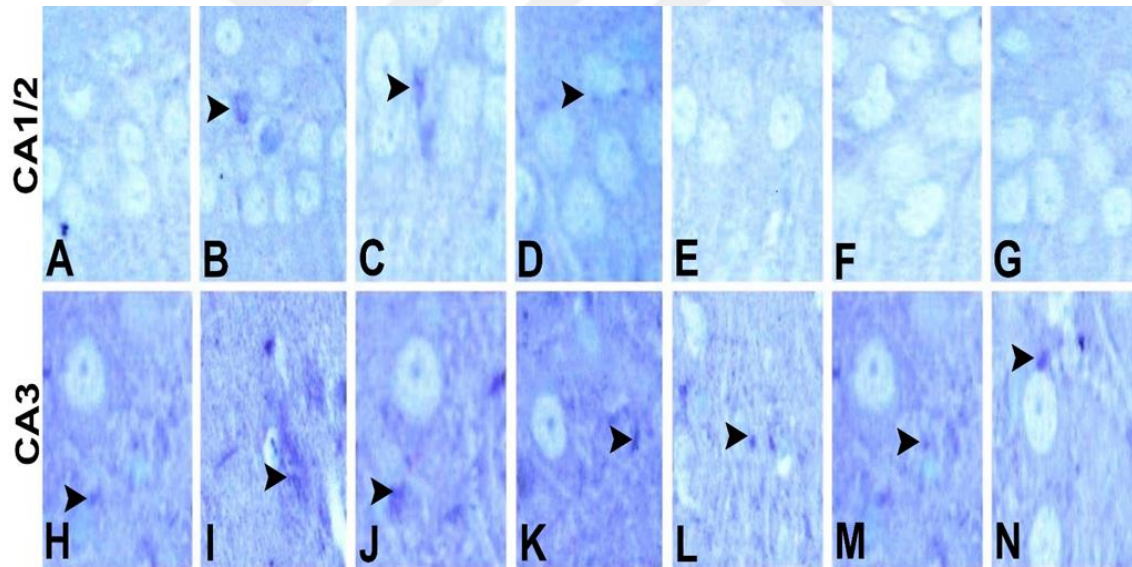
İn situ hibridizasyonla yapılan boyamalarda da immunohistokimyasal bulgulara benzer olmakla birlikte daha hafif düzeyde pozitiflikler tespit edildi. β -Amyloid mRNA ekspresyon düzeyi CA1 kısmında ALZ ve MEM gruplarında orta, A-1D grubunda hafif düzeydeydi. Diğer gruplarda ise önemli düzeyde pozitiflikler tespit edilmedi. CA3 kısmındaki β -Amyloid mRNA ekspresyonu ALZ grubunda şiddetli, MEM, A-1D ve A-

2D grubunda orta iken, kontrol, A-1Y ile A-2Y gruplarında hafif düzeydeydi (Tablo 4.10, Şekil 4.36).

Tablo 4.10. β -Amyloid ile yapılan in situ hibridizasyon boyamaları.

Gruplar	CA1/CA2	CA3
Kontrol	0,33 $\pm$ 0,51 ^a	1,00 $\pm$ 0,00 ^a
ALZ kontrol	1,83 $\pm$ 0,40 ^b	2,66 $\pm$ 0,51 ^b
MEM	1,66 $\pm$ 0,51 ^b	1,83 $\pm$ 0,40 ^c
A-1D	1,00 $\pm$ 0,00 ^c	1,83 $\pm$ 0,40 ^c
A-1Y	0,33 $\pm$ 0,51 ^a	1,00 $\pm$ 0,00 ^a
A-2D	0,16 $\pm$ 0,40 ^a	1,66 $\pm$ 0,51 ^c
A-2Y	0,33 $\pm$ 0,51 ^a	1,16 $\pm$ 0,40 ^a

^{a,b,c,d} Aynı sütundaki gruplar arası farklılığı göstermektedir (p <0.05)



Şekil 4.36. β -Amyloid mRNA ekspresyon düzeyleri.

(A-G) CA1/2 kısmındaki β -Amyloid mRNA ekspresyon düzeyleri. (A)-Kontrol grubu. Negatiflik (B)-ALZ kontrol grubu. Orta düzeyde, (C)-MEM grubu. Orta düzeyde (D)-A-1D grubu. Hafif düzeyde mRNA ekspresyonu, (E)-A-1Y grubu. Negatiflik, (F)-A-2D grubu. Negatiflik, (G)-A-2Y grubu. Negatiflik, (H-N) CA3 kısmındaki β -Amyloid mRNA ekspresyon düzeyleri. (H)-Kontrol grubu. Hafif düzeyde, (I)-ALZ kontrol grubu.

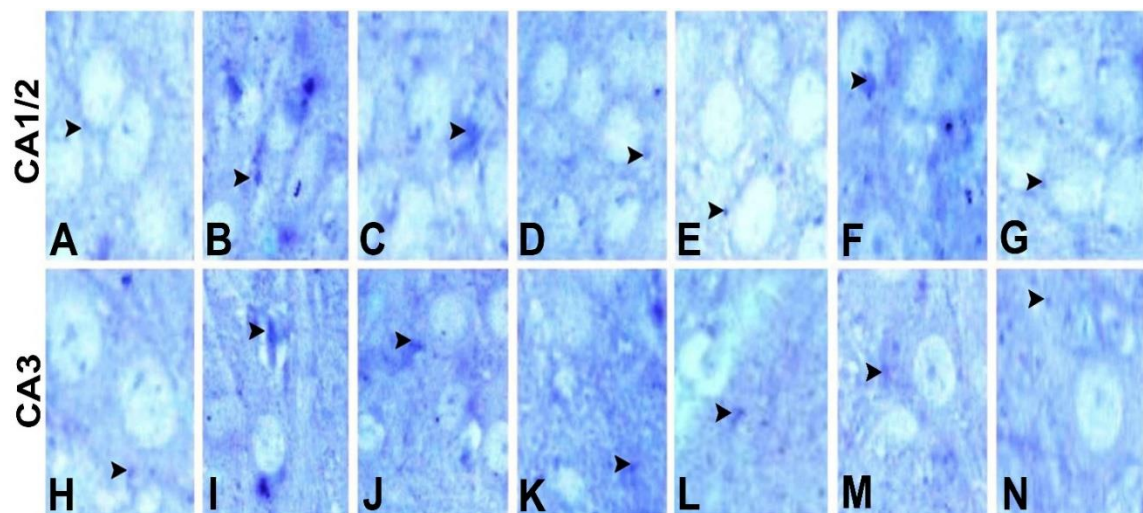
Şiddetli düzeyde, (J)-MEM grubu. Orta düzeyde (K)-A-1D grubu. Orta düzeyde, (L)-A-1Y grubu. Hafif düzeyde, (M)-A-2D grubu. Orta düzeyde, (N)-A-2Y grubu. Hafif düzeyde mRNA ekspresyonu (►). ISH.

İn situ hibridizasyon ile yapılan boyamalarda CA1/2 ve CA3 kısımlarındaki Tau mRNA ekspresyonu aynı bölgedeki Tau immunpozitiflikleri ile benzerdi (Tablo 4.11, Şekil 4.37).

Tablo 4.11. Tau ile yapılan in situ hibridizasyon boyamaları.

Gruplar	CA1/CA2	CA3
Kontrol	0,83±0,40 ^a	1,00±0,00 ^a
ALZ kontrol	2,66±0,51 ^b	2,83±0,40 ^b
MEM	1,66±0,51 ^c	1,83±0,40 ^c
A-1D	0,83±0,40 ^a	2,00±0,00 ^c
A-1Y	1,00±0,40 ^a	1,16±0,40 ^a
A-2D	1,83±0,40 ^b	1,66±0,51 ^c
A-2Y	0,83±0,40 ^a	1,00±0,00 ^a

^{a,b,c} Aynı sütundaki gruplar arası farklılığı göstermektedir (p <0.05)



Şekil 4.37. Tau mRNA ekspresyon düzeyleri.

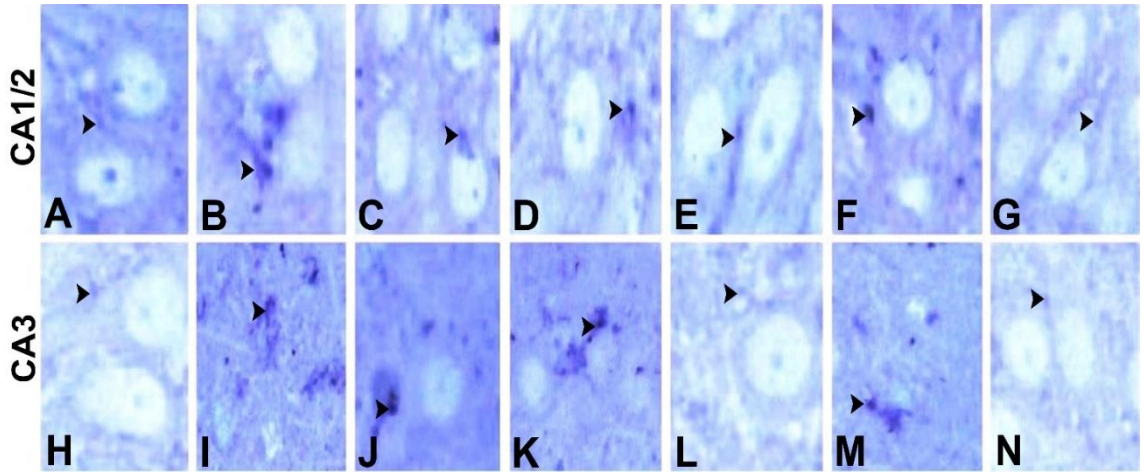
(A-G) CA1/2 kısmındaki Tau mRNA ekspresyon düzeyleri. (A)-Kontrol grubu. Hafif düzeyde (B)-ALZ kontrol grubu. Şiddetli düzeyde, (C)-MEM grubu. Orta düzeyde (D)-A-1D grubu. Hafif düzeyde, (E)-A-1Y grubu. Hafif düzeyde, (F)-A-2D grubu. Orta düzeyde, (G)-A-2Y grubu. Hafif düzeyde mRNA ekspresyonu, (H-N) CA3 kısmındaki Tau mRNA ekspresyon düzeyleri. (H)-Kontrol grubu. Hafif düzeyde, (I)-ALZ kontrol grubu. Şiddetli düzeyde, (J)-MEM grubu. Orta düzeyde (K)-A-1D grubu. Orta düzeyde, (L)-A-1Y grubu. Hafif düzeyde, (M)-A-2D grubu. Orta düzeyde, (N)-A-2Y grubu. Hafif düzeyde mRNA ekspresyonu (►). ISH.

İn situ hibridizasyonla yapılan boyamalarda CA3 kısmındaki AChE mRNA ekspresyonları, immunohistokimyasal boyalamalardaki immunpozitifliklere benzer düzeyde tespit edildi. Fakat CA1/2 kısmındaki AChE mRNA ekspresyonlarından sadece A-1Y’de orta düzeyde pozitiflikler gözlenirken immunohistokimyasal kısımda bu grupta hafif düzeyde İmmunpozitiflikler tespit edildi (Tablo 4.12, Şekil 4.38).

Tablo 4.12. AChE ile yapılan in situ hibridizasyon boyamaları.

Gruplar	CA1/CA2	CA3
Kontrol	0,83±0,40 ^a	0,83±0,40 ^a
ALZ kontrol	2,66±0,51 ^b	2,83±0,40 ^b
MEM	1,83±0,40 ^c	1,83±0,40 ^c
A-1D	1,66±0,51 ^c	2,66±0,51 ^b
A-1Y	1,66±0,51 ^c	0,83±0,40 ^a
A-2D	1,83±0,40 ^c	1,66±0,51 ^c
A-2Y	1,00±0,00 ^a	0,66±0,51 ^a

^{a,b,c} Aynı sütundaki gruplar arası farklılığı göstermektedir (p <0.05).



Şekil 4.38. AChE mRNA ekspresyon düzeyleri.

(A-G) CA1/2 kısımdaki AChE mRNA ekspresyon düzeyleri. (A)-Kontrol grubu. Hafif düzeyde (B)-ALZ kontrol grubu. Şiddetli düzeyde, (C)-MEM grubu. Orta düzeyde (D)-A-1D grubu. Orta düzeyde, (E)-A-1Y grubu. Orta düzeyde, (F)-A-2D grubu. Orta düzeyde, (G)-A-2Y grubu. Hafif düzeyde mRNA ekspresyonu, (H-N) CA3 kısımdaki AChE mRNA ekspresyon düzeyleri. (H)-Kontrol grubu. Hafif düzeyde, (I)-ALZ kontrol grubu. Şiddetli düzeyde, (J)-MEM grubu. Orta düzeyde (K)-A-1D grubu. Şiddetli düzeyde, (L)-A-1Y grubu. Hafif düzeyde, (M)-A-2D grubu. Orta düzeyde, (N)-A-2Y grubu. Hafif düzeyde mRNA ekspresyonu (►). ISH.

5. TARTIŞMA

Alzheimer hastalığı, ilerleyici bilişsel gerileme ve hafıza kaybıyla karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. Tüm vakaların yaklaşık %80'ini oluşturan en yaygın demans türüdür (Zhang ve ark., 2021) Alzheimer hastalığının kesin nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak bu hastalığa yakalanma riskini artıran bilinen bazı risk faktörleri vardır. Dünya çapında yaklaşık 50 milyon insan demans hastasıdır ve yaşlanan nüfus nedeniyle hasta sayısının 2050 yılına kadar üç katına çıkması beklenmektedir, bu da engellilik riskini, hastalık yükünü ve sağlık bakım maliyetlerini artıracaktır (Patterson, 2018). Üstelik mevcut terapötik stratejiler yalnızca semptomları iyileştirmektedir ve AH için etkili bir tedavi yoktur. Ancak AH'nin uzun bir prodromal dönemi vardır ve bu dönemde erken korunma, AH'nin ilerlemesini yavaşlatmak açısından özellikle önemli görünmektedir. Bu nedenle, bilişi güçlü bir şekilde etkileyen risk ve koruyucu faktörleri belirlemek için yeni çalışmalar önem arz etmektedir.

Nöroinflamasyon, mikroglia ve astrositlerin aktivasyonunu, pro-inflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin üretimini ve sinaptik fonksiyonun ve nöronal sağkalımın bozulması Alzheimer hastalığının önemli bir özelliğidir (Thakur ve ark., 2023). Nöroinflamasyon, inflamatuvar cevap türüne, süresine ve yoğunluğuna bağlı olarak sinir sistemi üzerinde zararlı etkilere sahip olabilir ve Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi majör nörodejeneratif hastalıklar için iyi bilinen bir biyobelirteçtir (Shabab ve ark., 2017). AH'de nöroinflamasyon esas olarak merkezi sinir sisteminin yerleşik bağışıklık hücreleri olan mikroglia ve astrositlerin aktivasyonundan kaynaklanmaktadır. Aktive edildikten sonra bu hücreler, nöronal fonksiyon ve hayatta kalma üzerinde faydalı veya zararlı etkileri olabilen çeşitli sitokinler, kemokinler, reaktif oksijen türleri, nitrik oksit ve prostaglandinler salgılar(Thakur ve ark., 2023). Sitokinler/kemokinler, fosfolipaz A2 ve COX'u uyararak, AA ve DHA'nın membran gliserofosfolipidlerinden salınmasını

kolaylaştırır; buradaki fosfolipitler, proinflatuar eikosanoidler (prostaglandinler, lökotrienler ve tromboksanlar) üretmek üzere oksitlenir.

Birçok çalışma AH'de AA metabolizmasının değiştiğini göstermiştir. Örneğin Alzheimer hastalarının beyinde ve beyin omurilik sıvısında yüksek COX-2 ve PG seviyeleri bulunmuştur. COX-2, yalnızca nöronlarda değil aynı zamanda aktiveleştirilmiş mikrogliya ve astrositlerde de eksprese edilen, uyarılabilir bir enzimdir. COX-2, AA'nın PGE₂, PGD₂, PGF_{2a}, PGI₂ ve tromboksan A₂ (TXA₂) gibi PG'lere dönüşümünü katalize eder. PG'ler spesifik reseptörler üzerinde etkili oldukları için nöroinflamasyon üzerinde farklı etkilere sahiptirler. PGE₂ dört reseptör alt tipine bağlanabilir: EP1-EP4. EP2 ve EP4 reseptörleri Gs proteinlerine bağlanır ve anti-inflatuar ve nöroprotektif etkilere sahip olabilen siklik adenosin monofosfat (cAMP) seviyelerini artırır. EP1 ve EP3 reseptörleri Gq veya Gi proteinlerine bağlanır ve cAMP seviyelerini azaltır veya hücre içi kalsiyum seviyelerini artırır. Bu, proinflatuar ve nörotoksik etkilere yol açabilir (Kouba ve ark., 2023). Bu nedenle, farklı PG'ler ve bunların reseptörleri arasındaki denge, AH'deki nöroinflamasyonun sonucunu belirleyebilir.

İntraserebroventriküler STZ ile oluşturulmuş Alzheimer modelinde öğrenme ve bellek fonksiyonlarında belirgin bozulma olduğu ve bu bozulmaya oksidatif hasarın eşlik ettiği gösterilmiştir. Yaptığımız çalışmada in siliko olarak belirlenen arachidonic asit türevlerinin hem kognitif fonksiyon testlerinde hem de oksidatif hasarda azalmaya neden olarak bozulmuş fonksiyonları düzeltebileceği bu çalışmada gösterilmiştir.

Moleküler kenetlenme çalışmaları, bir bileşiğin çalışılan biyolojik makromoleküller ile yaptığı olası etkileşimleri görmemize yardımcı olarak ilgili mekanizmanın açıklanmasına ışık tutabilmektedir (Ece, 2020) (Orujova ve ark., 2023).

Moleküler kenetleme sonuçlarına baktığımızda 5-LOX enzimine karşı seçerek sentezlediğimiz tüm bileşiklerin doğal ligand olan arachidonic asit'ten daha iyi bağlandığı

gözlenmiştir (Tablo 4.1). Moleküler kenetlemede kullanılan skorlama algoritmalarının yanıtılabileceği de gözönünde bulundurulduğunda bileşiklerin ilgili bağlanma bölgelerindeki amino asitlerle yaptıkları etkileşimler de tek tek incelenmiştir.

İki boyutlu ligand etkileşim diyagramları incelendiğinde, arachidonic asidin 5-LOX'un bağlanma bölgesiyle büyük oranda hidrofobik etkileşimlerle bağlandığı (Şekil 4.1), A1 bileşiğinin ise VAL671, ALA672 ve ASN554 aminoasit kalıntılarıyla hidrojen bağları yaptığı görülmektedir (Şekil 4.2). AA19 bileşiği, ASN554, VAL671 ve GLU614 amino asitleriyle yaptığı hidrojen bağlarının yanında PHE610 amino asit kalıntısı ile katyon- π etkileşimi yaptığı göze çarpmaktadır. Diğer taraftan Arachidonic asidin türevlerinden biri olan A2, ALA06 ile yaptığı bir hidrojen bağının dışında, ASN554 ile iki hidrojen bağı yapmış, PHE610 ile de π - π etkileşimi yapmaktadır. Hidrofobik etkileşimlerin yanına bileşiklerde gözlenen bu ek moleküller arası etkileşimlerin, 5-LOX ile daha iyi kenetlenebileceği, dolayısıyla daha aktif olabileceği öngörülmüştür.

COX-2 enzimine gelince, COX-2 ile kompleks halinde olan celecoxib doğal ligandının çoğunlukla sülfonamid bölgesi üzerinden hidrojen bağları yaptığı, pirazol halkası üzerinden de π - π etkileşimi yaptığı görülmüştür (Şekil 4.3). Hidrofobik bölgeleri çok olan araşidonik asit'ten yola çıkıp elde edilen A6 bileşiğimiz de hidrofobik bölgelerinin çok olması nedeniyle çoğunlukla hidrofobik etkileşimlerle COX-2'ye kenetlendiği hesaplanmıştır (Şekil 4.4). A2 bileşiğinde ise hidrofobik etkileşimlerin yanında amit ucundaki azot ile SER339 amino asidi ile hidrojen bağı yaptığı görülmektedir (Şekil 4.4). Son olarak AA19 bileşiğinde HIS80 ile katron - π etkileşimi, TYR79 ve PRO500 ile hidrojen bağları ile COX-2'nin bağlanma bölgesiyle etkileşimde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4).

Araşidonik asidin yaptığımız in siliko çalışmaları sonucunda belirlenen COX-2 ve 5-LOX enzimleri üzerinde etkili bulunan A1-A7 moleküllerinin sentezlenmesine karar

verilmiştir. Moleküller amidasyon reaksiyon mekanizmasına göre çözücü kullanmadan yeşil sentez ile sentezlenmiştir. Bu maddelerin kimyasal yapıları $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve QTOF-MS ile doğrulanmıştır. (Tablo 4.3, Tablo 4.4, Tablo 4.5.)

Hücre kültüründe Alzheimer modeli oluşturmak için 96 kuyucuklu plakalara ekilen SH-SY5Y hücreleri RA ile muamele edilerek nöron benzeri hücrelere dönüştürülmüştür. Dönüşümünü tamamlayan 96 kuyucuklu plakadaki hücrelere sentezlenen moleküllerden 0.1, 1, 10 ve 100 μM konsantrasyonlarda verilerek inkübatörde (37 °C ve %5 CO_2) 24 saat bekletilmiştir. 24 saatin sonunda hücrelere MTT solüsyonu verilerek MTT testi ile bütün grupların canlılık oranları belirlenmiştir (Şekil 4.5). MTT sonuçlarında bakıldığında bütün moleküllerin Alzheimer toksisitesine karşı bir iyileştirici etkileri gözlemlenmiştir. Bu etki genelde düşük dozlarda daha iyi görülmüş ve en yüksek olan dozlarda ise toksik etki belirlenmiştir. Bütün sonuçlar incelendiğinde ise A1 ve A2 molekülleri diğerlerine kıyasla yapmış olduğumuz *in vitro* Alzheimer modelinde en etkili moleküller olarak belirlenmiştir. Çalışmalarımız etkili bulunan bu iki molekül ile devam ettirilmiştir.

TOS sonuçlarına göre A1-100 μM ve A2-100 μM 'lık konsantrasyonlarda total oksidan seviyelerin arttığı, A1-10 μM 'da ile TOS aktivitesinin ileri derecede düştüğü görülmüştür (Şekil 4.6). Bu sonuçlar MTT ile yapılan canlılık test sonuçlarımızla da örtüşmektedir (Şekil 4.5). MTT testinde A1-100 ve A2-100 μM 'lık konsantrasyonlar hücre canlılık oranlarını artıramamıştır. En etkili bulunan A-1 ve A-2 moleküllerinin dahi en yüksek dozları toksik bulunmuştur. Bu durum hem MTT testlerinde hem de oksidan parametre testlerinde ortaya çıkmıştır. TAS sonuçlarına göre en etkili dozlar A1 için 0.1 ve 1 μM , A2 için 0,1 μM 'lık konsantrasyonlar olarak bulunmuştur (Şekil 4.7). TAS sonuçları MTT sonuçlarıyla uyumludur.

SOD, anyonik ROS ve süperoksit radikallerine karşı en önemli antioksidan savunma sistemidir. SOD, bir süperoksit radikalini O_2 'ye oksitler ve diğer süperoksit radikalini daha az reaktif bir molekül olan hidrojen peroksit (H_2O_2) indirgenmesini katalize eder (Aslankoç ve ark., 2019). Çalışmamızda SOD aktiviteleri, A1-1 μM 'da, A2-0.1, 1 ve 10 μM 'da yüksek bulunmuştur. Canlılık oranları TAS ve TOS aktiviteleriyle bazı çalışmalarda birebir örtüşebilir fakat ölümün tek sebebi oksidan aktivite artışları olmadığından korelasyon görülse de doz bağlamında birebir örtüşme olmayabilir.

Paganelli ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda TNF- α düzeylerinin önemli derecede yükselmesinin hastalığın ilerlemesi ile ilişkili olduğu ve Chang ve arkadaşlarının Alzheimer hastası transjenik farelerin beyin dokularında TNF- α seviyelerinin yüksek olduklarını buldular (Paganelli ve ark., 2002) (Chang ve ark., 2017). TNF- α , Alzheimer kontrole göre yapılan istatistiklerde A1 0.1, 1 ve 10 ve A2 0.1 konsantrasyonlarda anlamlı bir düşüş göstermiştir (Şekil 4.9). Bu da in vitro Alzheimer modelinde TNF- α 'nın önemli bir parametre olduğunu göstermiştir. MTT testi sonrası seçmiş olduğumuz A1, A2 maddeleri TNF- α 'yı azaltarak etkisini göstermesi önemli bir bulgudur. Dolayısı ile Alzheimer'ın TNF- α ile ilgili komponenti seçtiğimiz ilaçlarla normal seviyelere gelmektedir (Şekil 4.9).

STZ modelleme, diyabetojenik ajan streptozotosini deney hayvanlarının beyne yerleştirerek nörodejenerasyonu ve bilişsel bozukluğu tetikleyen bir yöntemdir. STZ, beyinde beta-amiloid ve fosfo-tau düzeylerinde artış, alfa-sekretaz aktivitesinde azalma, uzaysal ve uzaysal olmayan hafızada bozulma gibi sporadik Alzheimer hastalığının bazı yönlerine benzeyen bir insüline dirençli duruma neden olur (Gáspár ve ark., 2021).

Icv STZ modeli mevcut modeller arasında en iyi klinik ve patolojik modeldir çünkü A β plak birikimini indükler, tau hiperfosforilasyonundan sonra NFY patolojisini indükler ve nöroinflamasyonun oluşmasına sebep olur (Zhu, 2022). Icv STZ enjeksiyonu

ile oluşturulan AH modelinin temeli hastalarının beyinlerindeki oksijen ve glikoz tüketiminin azalmasına dayanmaktadır. Bu gözlemlere dayanarak, hastalığın temel biyokimyasal parametrelerindeki alevlenmenin, beyindeki insülin reseptör sinyallemedeki değişiklikler yoluyla glikoz metabolizmasıyla ilişkili olduğu varsayılmıştır (Hoyer ve ark., 1994; Hoyer ve ark., 1993). Bu çalışmada icv olarak bilateral 1.5 mg/kg iki doza bölünmüş her sıçana 3 mg/kg STZ uygulanmıştır (Kraska ve ark., 2012). Yaptığımız davranış testlerini kullanarak STZ grubunda kontrol grubuna kıyasla öğrenme ve hafızanın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığını bulduk. Bu da in vivo Alzheimer modelinin sıçanlarda oluştuğunu göstermiştir.

Alzheimer hastalarında artan IL-6 sitokin üretimi, bu hastalarda anormal hücrel bağışıklığa işaret ettiği ve IL-6'nın Alzheimer hastalığının patogenezinde rol oynadığı çalışmalarda belirlenmiştir (Cojocaru ve ark., 2011). IL-6 test sonuçlarımızda bu çalışmayla paralel bir sonuç vermiştir. IL-6, ALZ kontrol grubunda yükselirken tedavi gruplarında düşüş gözlenmiştir. Bu sonuç tedavide kullandığımız A1 ve A2 maddelerinin Alzheimer hastalığı üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

AH beyinlerinde, özellikle A β ve nörofibriler yumakların yüksek olduğu bölgelerde COX-1 ve COX-2 seviyelerinde artış tespit edilmiştir (Kouba ve ark., 2023) COX-2 ekspresyonu ayrıca kültürlenmiş nöronlarda ve glial hücrelerde A β tarafından indüklenir ve COX-2 inhibitörleri A β üretimini ve nörotoksiteyi azaltabilir (Kouba ve ark., 2023).

Beyindeki COX-2 ekspresyonunun birincil bölgesinin nöronlar olduğuna dair kanıtlar, COX-2'nin Alzheimer'daki nöronal hassasiyeti doğrudan etkileyebileceği ihtimalini arttırmaktadır. Aslında COX-2'nin seçici inhibisyonu, eksitotoksin kaynaklı nöbetler ve fokal ve global iskemi dahil olmak üzere çeşitli nörodejenerasyon modellerinde nöron kaybını iyileştirir (Kumar ve ark., 2020). Bizim çalışmamızda da

COX-2 üzerindeki etkilerin uyarıcı mı yoksa inhibe edici mi olduğu incelenmiştir. PGE2 düzeylerine çalışmada bakılmış bu etkinin seçilmiş A1 ve A2’de tüm dozlarda inhibisyon yönünde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.30).

AH’de rol oynayan diğer bir AA metabolik yolu, lökotrienler ve hidroksiikosatetraenoik asitler üreten LOX yoludur. LOX enzimleri nöronlarda ve glial hücrelerde eksprese edilir ve aktiviteleri A β ve inflamatuvar sitokinler tarafından düzenlenebilir. 5-LOX yolu yoluyla üretilir ve anti-inflamatuvar etkilerin yanı sıra inflamasyonun çözülmesine katkıda bulunur (Esposito ve ark., 2008; Kumar ve ark., 2020). LOX ürünleri nöronlarda oksidatif stresi, inflamasyonu ve apoptozu indükleyebilir, ayrıca sinaptik plastisiteyi ve nörotransmisyonu düzenleyebilir. Çeşitli çalışmalar, LOX inhibitörlerinin AH’li hayvan modellerinde Amiloid beta kaynaklı nöroinflamasyonu ve nörodejenerasyonu azaltabildiğini göstermiştir (Esposito ve ark., 2008). Ayrıca DHA ve onun lipid medyatörleri, NF- κ B’yi bloke ederek, eikosanoid üretimini inhibe ederek, sitokin sekresyonunu önleyerek ve lökosit trafiğini düzenleyerek nöroinflamatuvar yanıtları inhibe ettiği düşünülmektedir. Mevcut çalışma AA türevlerinin COX ve LOX yolunu hedef alan uygun tedavi seçeneklerinin geliştirilmesini kolaylaştırmak için yapılmaktadır.

LXA4, 5-LOX yolu metabolitidir (Singh ve ark., 2017). Bannion ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, ölüm sonrası AH’li beyin, korteks ve hipokampustaki sağlıklı kontrol beyinleriyle karşılaştırıldığında daha yüksek 5-LOX protein seviyeleri gösterilmiştir. AH hastalarında normal kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yukarı regüle edilmiş serum 5-LOX seviyeleri bulunmuştur (O’Banion, 1999).

Sunulan çalışmamızda STZ ile oluşturulmuş AH modelinde, STZ’nin nöronal kayba neden olduğu dejeneratif değişimler literatürdeki çalışmalarda da bildirilmiştir (Rasheed ve ark., 2018; Sirwi ve ark., 2021) Bununla uyumlu olarak bizim çalışmamızda

da dejeneratif değişimler ön plandaydı. Histopatolojik bulgularımıza göre hipokampusun CA1/CA2 kısmındaki dejeneratif nöronların en fazla ALZ grubunda olduğu belirlenmiştir. Kombine gruplardan MEM, A-1D, A-2D ve A-2Y gruplarında orta düzeyde, A-1Y grubunda ise hafif düzeyde dejeneratif nöronların olduğu tespit edilmiştir. Burda mevcut Alzheimer tedavisinde kullanılan memantinin oluşturduğu faydalı etki FA-1'in yüksek dozunda *in vivo* çalışmada aşıldığı gösterilmiştir (Tablo 4.6, Şekil 4.32). CA3 kısmında ise dejeneratif nöronların CA1/CA2'ye benzer şekilde en fazla ALZ grubunda olduğu tespit edilmiştir. Diğer uygulama gruplarından MEM ile A-2D'de dejeneratif nöronlar orta düzeyde, A-1D, A-1Y ile A-2Y'de ise hafif düzeyde bulunmuştur. Bu durum kullanılan ilaç kombinasyonlarından A-1D, A-1Y ile A-2Y'nin AH'a karşı memantine göre daha etkili olduğunu düşündürmektedir.

Sıçanlarda AH'de hippocampusta Aβ birikimlerinin olduğu bildirilmiştir (10.1016/j.intimp.2014.01.018, 10.22038/IJBMS.2017.8669). Sunulan çalışmada da AH ile birlikte Aβ birikimlerinin olduğu tespit edilmiş ve immunohistokimyasal/in situ hibridizasyon yöntemle yapılan boyamalarda, Aβ ekspresyon düzeylerinin A-1D ile A-2D grubunda Memantin grubu ile aynı seviyede olduğu tespit edilmesine karşın, özellikle A-1Y ile A-2Y gruplarında Aβ ekspresyon seviyesinin Memantin grubuna göre daha az olduğu belirlenmiştir. Tau yönünden yapılan boyamalarda da benzer şekilde en etkili grupların A-1Y ile A-2Y olduğu gözlenmiştir. Çünkü STZ ile birlikte Tau'nun seviyesinin arttığı diğer çalışmalarda da tespit edilmiştir (Osmanovic Barilar ve ark., 2015; Shalaby ve ark., 2019). Sunulan çalışmada A-1Y ile A-2Y gruplarında hem Tau seviyesinin hem de yukarıda belirtildiği gibi Aβ seviyesinin, STZ grubuna göre düşmesi bu ilaçların AH karşı etkili olduğunu göstermektedir.

AH ile AChE arasında sistematik bir ilişki vardır. Kolinerjik sistem eksikliği, kolin asetiltransferaz (ChAT) miktarının azalmasını içerir, bu da asetilkolin (ACh) miktarının

azalmasına neden olur ve ters bir etki olarak AChE artar. STZ ile yapılan AH modeli ile ilgili çalışmalarda hippocampus'ta AChE seviyesinin kontrol grubuna göre arttığı gösterilmiştir (Agrawal ve ark., 2009; Costa ve ark., 2016; Sorial & El Sayed, 2017) Sunulan çalışmada da AChE seviyesi en fazla ALZ kontrol ve A-1D grubunda tespit edilmiştir. MEM ve A-1Y gruplarında orta seviyede iken, A-1Y ve A-2Y gruplarında hafif seviyede bulunmuş olması yeni ilaç sentezlerinden özellikle bunların etkili olduğunu düşündürmektedir.

İmmunohistokimyasal ve in situ hibridizasyon yöntemle yapılan boyamalarda gruplardaki A β , Tau ve AChE ekspresyon düzeyleri incelendiğinde yeni ilaç sentezlerinin uygulandığı A-1D, A-1Y, A-2D ve A-2Y gruplarda olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Belirtilen bu gruplar kendi içlerinde incelendiğinde ise yeni ilaç sentezlerinin özellikle A-1Y ve A-2Y gruplarında etkili olduğu tespit edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada araşidonik asidin Alzheimer tedavisinde önemli olduğuyula ilgili veriler bulunmaktadır. Biz de yapmış olduğumuz kapsamlı in siliko çalışmalar ile araşidonik asidin Alzheimer ile en fazla ilişkili komponentleri olan 5-LOX ve COX-2 enzimleri üzerinde etkili türevleri tespit edilmiştir. Bu türevler hücre canlılık testlerinde denenmiş bu maddelerden en etkili 2 ürün ile *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar sürdürülmüştür. Bu maddelerin de faydalı etkileri ve etki mekanizmaları bu çalışma ile ortaya konmaya çalışılmıştır. Bulunan önemli sonuçların değere dönüşebilmesi için daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Agrawal, R., Tyagi, E., Shukla, R., & Nath, C. 2009. A study of brain insulin receptors, AChE activity and oxidative stress in rat model of ICV STZ induced dementia. *Neuropharmacology*, 56(4), 779-787.
- Ajith, T. A. 2018. A Recent Update on the Effects of Omega-3 Fatty Acids in Alzheimer's Disease. *Curr Clin Pharmacol*, 13(4), 252-260.
- Alexander, A. G., Marfil, V., & Li, C. 2014. Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Frontiers in genetics*, 5, 279.
- Allain, P., Etcharry-Bouyx, F., & Verny, C. 2013. Executive functions in clinical and preclinical Alzheimer's disease. *Revue neurologique*, 169(10), 695-708.
- Armstrong, R. A. 2019. Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia neuropathologica*, 57(2), 87-105.
- Askin, S., Tahtacı, H., Türkeş, C., Demir, Y., Ece, A., Çiftçi, G. A., & Beydemir, Ş. 2021. Design, synthesis, characterization, in vitro and in silico evaluation of novel imidazo [2, 1-b][1, 3, 4] thiadiazoles as highly potent acetylcholinesterase and non-classical carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 113, 105009.
- Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Savran, E., & Yılmaz, B. 2019. The role of antioxidant enzymes in oxidative stress-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). *Med J SDU*, 26(3), 362-369.
- Babur E, T. B., Yıldız N, Batakçı M, Süer C, Dursun N. . 2017. Gender-Dependent Differences On Spatial Learning Performance in Hypothyroid Rats. In (Vol. 26, pp. 233-239): Journal of Health Sciences.

- Barnes, J., Dickerson, B. C., Frost, C., Jiskoot, L. C., Wolk, D., & van der Flier, W. M. 2015. Alzheimer's disease first symptoms are age dependent: evidence from the NACC dataset. *Alzheimer's & dementia*, 11(11), 1349-1357.
- Benedikz, E., Kloskowska, E., & Winblad, B. 2009. The rat as an animal model of Alzheimer's disease. *Journal of cellular and molecular medicine*, 13(6), 1034-1042.
- Bhatt, S., Puli, L., & Patil, C. R. 2021. Role of reactive oxygen species in the progression of Alzheimer's disease. *Drug Discovery Today*, 26(3), 794-803.
- Bondareff, W., Mountjoy, C., Roth, M., & Hauser, D. 1989. Neurofibrillary degeneration and neuronal loss in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 10(6), 709-715.
- Bouleau, S., & Tricoire, H. 2015. Drosophila models of Alzheimer's disease: advances, limits, and perspectives. *Journal of Alzheimer's Disease*, 45(4), 1015-1038.
- Burns, J. L., Nakamura, M. T., & Ma, D. W. 2018. Differentiating the biological effects of linoleic acid from arachidonic acid in health and disease. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 135, 1-4.
- C Wu, L. Y., Y Li, YAN Dong, B Yang, LD Tucker, X Zong, Q Zhang. 2020. Effects of exercise training on anxious–depressive-like behavior in Alzheimer rat. *Medicine and science in sports and exercise*, 52(7), 1456.
- Chang, R., Yee, K.-L., & Sumbria, R. K. 2017. Tumor necrosis factor α inhibition for Alzheimer's disease. *Journal of central nervous system disease*, 9, 1179573517709278.
- Chang, Y., Kim, J., Park, H., Choi, H., & Kim, J. 2020. Modelling neurodegenerative diseases with 3D brain organoids. *Biological Reviews*, 95(5), 1497-1509.
- Chen, Y., & Yu, Y. 2023. Tau and neuroinflammation in Alzheimer's disease: interplay mechanisms and clinical translation. *Journal of Neuroinflammation*, 20(1), 1-21.

- Cojocaru, I. M., Cojocaru, M., Miu, G., & Sapira, V. 2011. Study of interleukin-6 production in Alzheimer's disease. *Rom J Intern Med*, 49(1), 55-58.
- Colombo, J., Jill Shaddy, D., Kerling, E. H., Gustafson, K. M., & Carlson, S. E. 2017. Docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (ARA) balance in developmental outcomes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 121, 52-56.
- Combrinck, M., Williams, J., De Berardinis, M. A., Warden, D., Puopolo, M., Smith, A. D., & Minghetti, L. 2006. Levels of CSF prostaglandin E2, cognitive decline, and survival in Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 77(1), 85-88.
- Costa, M., Bernardi, J., Fiuza, T., Costa, L., Brandão, R., & Pereira, M. E. 2016. N-acetylcysteine protects memory decline induced by streptozotocin in mice. *Chemico-biological interactions*, 253, 10-17.
- Cottin, S., Sanders, T., & Hall, W. 2011. The differential effects of EPA and DHA on cardiovascular risk factors. *Proceedings of the Nutrition Society*, 70(2), 215-231.
- Croft, C. L., & Noble, W. 2018. Preparation of organotypic brain slice cultures for the study of Alzheimer's disease. *F1000Research*, 7.
- Dá Mesquita, S., Ferreira, A. C., Sousa, J. C., Correia-Neves, M., Sousa, N., & Marques, F. 2016. Insights on the pathophysiology of Alzheimer's disease: The crosstalk between amyloid pathology, neuroinflammation and the peripheral immune system. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 68, 547-562.
- de la Monte, S. M., & Tong, M. 2014. Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease. *Biochemical pharmacology*, 88(4), 548-559.
- Delacourte, A., & Defossez, A. 1986. Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *Journal of the neurological sciences*, 76(2-3), 173-186.

- Ece, A. 2020. Towards more effective acetylcholinesterase inhibitors: a comprehensive modelling study based on human acetylcholinesterase protein–drug complex. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38(2), 565-572.
- Elder, G. A., Gama Sosa, M. A., & De Gasperi, R. 2010. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*, 77(1), 69-81.
- Esposito, G., Giovacchini, G., Liow, J.-S., Bhattacharjee, A. K., Greenstein, D., Schapiro, M., Hallett, M., Herscovitch, P., Eckelman, W. C., & Carson, R. E. 2008. Imaging neuroinflammation in Alzheimer's disease with radiolabeled arachidonic acid and PET. *Journal of Nuclear Medicine*, 49(9), 1414-1421.
- Esquerda-Canals, G., Montoliu-Gaya, L., Güell-Bosch, J., & Villegas, S. 2017. Mouse Models of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 57(4), 1171-1183.
- Fan, J., Fu, A., & Zhang, L. 2019. Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*, 7, 83-89.
- Ferris, S. H., & Farlow, M. 2013. Language impairment in Alzheimer's disease and benefits of acetylcholinesterase inhibitors. *Clinical interventions in aging*, 1007-1014.
- Fleischman, D. A., & Gabrieli, J. 1999. Long-term memory in Alzheimer's disease. *Current opinion in neurobiology*, 9(2), 240-244.
- Flood, D. G., Lin, Y.-G., Lang, D. M., Trusko, S. P., Hirsch, J. D., Savage, M. J., Scott, R. W., & Howland, D. S. 2009. A transgenic rat model of Alzheimer's disease with extracellular A β deposition. *Neurobiology of aging*, 30(7), 1078-1090.
- Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., ... & Mainz, D. T. (2006). Extra precision glide: Docking and scoring

- incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein– ligand complexes. *Journal of medicinal chemistry*, 49(21), 6177-6196.
- Gallagher, M., & Koh, M. T. 2011. Episodic memory on the path to Alzheimer's disease. *Current opinion in neurobiology*, 21(6), 929-934.
- Gáspár, A., Hutka, B., Ernyey, A. J., Tajti, B. T., Varga, B. T., Zádori, Z. S., & Gyertyán, I. 2021. Intracerebroventricularly injected streptozotocin exerts subtle effects on the cognitive performance of long-evans rats. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 662173.
- Glenner, G. G., & Wong, C. W. 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 120(3), 885-890.
- Gómez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J. H., Petersen, R. C., Parisi, J. E., & Hyman, B. T. 1997. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 41(1), 17-24.
- Gorica, E., & Calderone, V. 2022. Arachidonic acid derivatives and neuroinflammation. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 21(2), 118-129.
- Guerreiro, R., & Bras, J. 2015. The age factor in Alzheimer's disease. *Genome medicine*, 7(1), 1-3.
- H., Y. 2010. Erkek Sıçanlarda Bitkisel Yağ Sınırlı Erişimle Oluşturulan “Binge Eating” Modelinin Kompulsif Davranış Ortaya Çıkarma Potansiyelinin Misket Gömme Testiyle İncelenmesi.

- Hadders-Algra, M. 2008. Prenatal long-chain polyunsaturated fatty acid status: the importance of a balanced intake of docosahexaenoic acid and arachidonic acid. *J Perinat Med*, 36(2), 101-109.
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *science*, 297(5580), 353-356.
- Hemonnot, A.-L., Hua, J., Ulmann, L., & Hirbec, H. 2019. Microglia in Alzheimer disease: well-known targets and new opportunities. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11, 233.
- Hoyer, S., Müller, D., & Plaschke, K. 1994. Desensitization of brain insulin receptor Effect on glucose/energy and related metabolism. In *Cell and Animal Models in Aging and Dementia Research* (pp. 259-268). Springer.
- Hoyer, S., Prem, L., Sorbi, S., & Amaducci, L. 1993. Stimulation of glycolytic key enzymes in cerebral cortex by insulin. *Neuroreport*, 4(7), 991-993.
- Hussein, J. S. 2013. Cell membrane fatty acids and health. *Int J Pharm Pharm Sci*, 5(3), 38-46.
- Hyman, B. T., Phelps, C. H., Beach, T. G., Bigio, E. H., Cairns, N. J., Carrillo, M. C., Dickson, D. W., Duyckaerts, C., Frosch, M. P., & Masliah, E. 2012. National Institute on Aging–Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia*, 8(1), 1-13.
- Iqbal, K., Alonso, A. d. C., Chen, S., Chohan, M. O., El-Akkad, E., Gong, C.-X., Khatoon, S., Li, B., Liu, F., & Rahman, A. 2005. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1739(2-3), 198-210.

- Jang, Y., Kim, M., & Hwang, S. W. 2020. Molecular mechanisms underlying the actions of arachidonic acid-derived prostaglandins on peripheral nociception. *Journal of Neuroinflammation*, 17, 1-27.
- KAŞIKÇI, E., Murat YALÇIN. 2022. Effect of Intravenously Injected Arachidonic Acid on Electrocardiography in Rats. *Journal of Research in Veterinary Medicine*, 41(2), 62-66.
- Katsumoto, A., Takeuchi, H., Takahashi, K., & Tanaka, F. 2018. Microglia in Alzheimer's disease: risk factors and inflammation. *Frontiers in Neurology*, 9, 978.
- Kelleher III, R. J., & Shen, J. 2017. Presenilin-1 mutations and Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(4), 629-631.
- Kolarova, M., García-Sierra, F., Bartos, A., Ricny, J., & Ripova, D. 2012. Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *International journal of Alzheimer's disease*, 2012.
- Korbecki, J., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., & Chlubek, D. 2014. Cyclooxygenase pathways. *Acta Biochimica Polonica*, 61(4).
- KoSIK, K. S., Joachim, C. L., & Selkoe, D. J. 1986. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(11), 4044-4048.
- Kouba, B. R., Camargo, A., & Rodrigues, A. L. S. 2023. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: potential beneficial effects of vitamin D. *Metabolic Brain Disease*, 38(3), 819-829.
- Kraska, A., Santin, M. D., Dorieux, O., Joseph-Mathurin, N., Bourrin, E., Petit, F., Jan, C., Chaigneau, M., Hantraye, P., & Lestage, P. 2012. In vivo cross-sectional characterization of cerebral alterations induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin.

- Kumar, A., Behl, T., Jamwal, S., Kaur, I., Sood, A., & Kumar, P. 2020. Exploring the molecular approach of COX and LOX in Alzheimer's and Parkinson's disorder. *Molecular Biology Reports*, 47, 9895-9912.
- Lanigan, R. M., & Sheppard, T. D. 2013. Recent developments in amide synthesis: Direct amidation of carboxylic acids and transamidation reactions. *European Journal of Organic Chemistry*, 2013(33), 7453-7465.
- Laskowski, R. A., & Swindells, M. B. (2011). LigPlot+: multiple ligand–protein interaction diagrams for drug discovery.
- Lauritzen, L., Fewtrell, M., & Agostoni, C. 2015. Dietary arachidonic acid in perinatal nutrition: a commentary. *Pediatr Res*, 77(1-2), 263-269.
- Li, X.-L., Hu, N., Tan, M.-S., Yu, J.-T., & Tan, L. 2014. Behavioral and psychological symptoms in Alzheimer's disease. *BioMed research international*, 2014.
- Li, Y., & Gu, B. J. 2023. Non-human Primate Models of Alzheimer's Disease. *Journal of Exploratory Research in Pharmacology*(000), 0-0.
- Li, Y., Li, D., Zhao, P., Nandakumar, K., Wang, L., & Song, Y. 2020. Microfluidics-based systems in diagnosis of Alzheimer's disease and biomimetic modeling. *Micromachines*, 11(9), 787.
- LigPrep. In (Version 2022-2) Schrödinger, L., New york. <https://www.schrodinger.com/>.
- Lill, M. A., & Danielson, M. L. (2011). Computer-aided drug design platform using PyMOL. *Journal of computer-aided molecular design*, 25, 13-19.
- Lopez, O. L., & Kuller, L. H. 2019. Epidemiology of aging and associated cognitive disorders: Prevalence and incidence of Alzheimer's disease and other dementias. *Handbook of clinical neurology*, 167, 139-148.

- Lukauskis, D., Samways, M. L., Aureli, S., Cossins, B. P., Taylor, R. D., & Gervasio, F. L. 2022. Open Binding Pose Metadynamics: An Effective Approach for the Ranking of Protein-Ligand Binding Poses. *J Chem Inf Model*, 62(23), 6209-6216.
- Macalino, S. J. Y., Basith, S., Clavio, N. A. B., Chang, H., Kang, S., & Choi, S. (2018). Evolution of in silico strategies for protein-protein interaction drug discovery. *Molecules*, 23(8), 1963.
- Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., & Sherman, W. (2013). Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of computer-aided molecular design*, 27, 221-234.
- Martin, S. A., Brash, A. R., & Murphy, R. C. 2016. The discovery and early structural studies of arachidonic acid. *J Lipid Res*, 57(7), 1126-1132.
- McGuinness, B., Barrett, S., Craig, D., Lawson, J., & Passmore, A. 2010. Executive functioning in Alzheimer's disease and vascular dementia. *International Journal of Geriatric Psychiatry: A journal of the psychiatry of late life and allied sciences*, 25(6), 562-568.
- Méto, T. X., Bonnamour, J., Reidon, T., Duprez, A., Sarpoulet, J., Martinez, J., & Lamaty, F. 2015. Comprehensive Study of the Organic-Solvent-Free CDI-Mediated Acylation of Various Nucleophiles by Mechanochemistry. *Chemistry—A European Journal*, 21(36), 12787-12796.
- Mielke, M. M., Vemuri, P., & Rocca, W. A. 2014. Clinical epidemiology of Alzheimer's disease: assessing sex and gender differences. *Clinical epidemiology*, 37-48.
- Monterey, M. D., Wei, H., Wu, X., & Wu, J. Q. 2021. The many faces of astrocytes in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neurology*, 12, 619626.
- Morales, I., Guzmán-Martínez, L., Cerda-Troncoso, C., Farías, G. A., & Maccioni, R. B. 2014. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational

- framework for the search of novel therapeutic approaches. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 112.
- Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. 2008. Molecular docking. *Molecular modeling of proteins*, 365-382.
- Multhaup, G., Ruppert, T., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Masters, C. L., & Beyreuther, K. 1997. Reactive oxygen species and Alzheimer's disease. *Biochemical pharmacology*, 54(5), 533-539.
- Myers, A., & McGonigle, P. 2019. Overview of transgenic mouse models for Alzheimer's disease. *Current protocols in neuroscience*, 89(1), e81.
- Nilsberth, C., Westlind-Danielsson, A., Eckman, C. B., Condron, M. M., Axelman, K., Forsell, C., Stenh, C., Luthman, J., Teplow, D. B., & Younkin, S. G. 2001. The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A β protofibril formation. *Nature neuroscience*, 4(9), 887-893.
- Norberg, J., Poulsen, F. R., Blaabjerg, M., Kristensen, B. W., Bonde, C., Montero, M., Meyer, M., Gramsbergen, J. B., & Zimmer, J. 2005. Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders*, 4(4), 435-452.
- NUKINA, N., & IHARA, Y. 1986. One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *The Journal of Biochemistry*, 99(5), 1541-1544.
- O'Banion, M. K. 1999. COX-2 and Alzheimer's disease: potential roles in inflammation and neurodegeneration. *Expert opinion on investigational drugs*, 8(10), 1521-1536.
- Orujova, T., Ece, A., Akalın Çiftçi, G., Özdemir, A., & Altıntop, M. D. 2023. A new series of thiazole-hydrazone hybrids for Akt-targeted therapy of non-small cell lung cancer. *Drug Development Research*, 84(2), 185-199.

- Oshima, H., Re, S., & Sugita, Y. 2020. Prediction of Protein-Ligand Binding Pose and Affinity Using the gREST+FEP Method. *J Chem Inf Model*, 60(11), 5382-5394.
- Osmanovic Barilar, J., Knezovic, A., Grünblatt, E., Riederer, P., & Salkovic-Petrisic, M. 2015. Nine-month follow-up of the insulin receptor signalling cascade in the brain of streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission*, 122, 565-576.
- Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszynski, J. 2017. Software for molecular docking: a review. *Biophysical reviews*, 9, 91-102.
- Paganelli, R., Di Iorio, A., Patricelli, L., Ripani, F., Sparvieri, E., Faricelli, R., Iarlori, C., Porreca, E., Di Gioacchino, M., & Abate, G. 2002. Proinflammatory cytokines in sera of elderly patients with dementia: levels in vascular injury are higher than those of mild-moderate Alzheimer's disease patients. *Experimental gerontology*, 37(2-3), 257-263.
- Patrick, R. P. 2019. Role of phosphatidylcholine-DHA in preventing APOE4-associated Alzheimer's disease. *Faseb j*, 33(2), 1554-1564.
- Patterson, C. 2018. World Alzheimer report 2018: the state of the art of dementia research: new frontiers. *Alzheimer's Disease International (ADI): London, UK*, 2(4), 14-20.
- Piccininni, M., Di Carlo, A., Baldereschi, M., Zaccara, G., & Inzitari, D. 2005. Behavioral and psychological symptoms in Alzheimer's disease: frequency and relationship with duration and severity of the disease. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 19(5-6), 276-281.
- Pinzi, L., & Rastelli, G. 2019. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *Int J Mol Sci*, 20(18).

- Plaza-Rosales, I., Brunetti, E., Montefusco-Siegmund, R., Madariaga, S., Hafelin, R., Ponce, D. P., Behrens, M. I., Maldonado, P. E., & Paula-Lima, A. 2023. Visual-spatial processing impairment in the occipital-frontal connectivity network at early stages of Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 15, 1097577.
- Podcasy, J. L., & Epperson, C. N. 2022. Considering sex and gender in Alzheimer disease and other dementias. *Dialogues in clinical neuroscience*.
- Poorani, R., Bhatt, A. N., Dwarakanath, B. S., & Das, U. N. 2016. COX-2, aspirin and metabolism of arachidonic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their physiological and clinical significance. *European Journal of Pharmacology*, 785, 116-132.
- Possin, K. L. 2010. Visual spatial cognition in neurodegenerative disease. *Neurocase*, 16(6), 466-487.
- Preman, P., Alfonso-Triguero, M., Alberdi, E., Verkhratsky, A., & Arranz, A. M. 2021. Astrocytes in Alzheimer's disease: pathological significance and molecular pathways. *Cells*, 10(3), 540.
- Price, D. L. 1986. New perspectives on Alzheimer's disease. *Annual review of neuroscience*, 9(1), 489-512.
- Quan, Y., Jiang, J., & Dingledine, R. 2013. EP2 receptor signaling pathways regulate classical activation of microglia. *J Biol Chem*, 288(13), 9293-9302.
- Raji, C. A., Lopez, O., Kuller, L., Carmichael, O., & Becker, J. 2009. Age, Alzheimer disease, and brain structure. *Neurology*, 73(22), 1899-1905.
- Rasheed, N. O. A., El Sayed, N. S., & El-Khatib, A. S. 2018. Targeting central $\beta 2$ receptors ameliorates streptozotocin-induced neuroinflammation via inhibition of

- glycogen synthase kinase3 pathway in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 86, 65-75.
- Sanchez-Mejia, R. O., & Mucke, L. 2010. Phospholipase A2 and arachidonic acid in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1801(8), 784-790.
- Sarlus, H., & Heneka, M. T. 2017. Microglia in Alzheimer's disease. *J Clin Invest*, 127(9), 3240-3249.
- Schrödinger. (2022b). Schrödinger. In (Version 2022-2) Schrödinger, L.
- Schuster, V. L., Chi, Y., & Lu, R. 2015. The prostaglandin transporter: Eicosanoid reuptake, control of signaling, and development of high-affinity inhibitors as drug candidates. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 126, 248.
- Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., & Mohan, G. 2017. Neuroinflammation pathways: a general review. *International Journal of Neuroscience*, 127(7), 624-633.
- Shalaby, M. A., Nounou, H. A., & Deif, M. M. 2019. The potential value of capsaicin in modulating cognitive functions in a rat model of streptozotocin-induced Alzheimer's disease. *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*, 55, 1-13.
- Shipley, M. M., Mangold, C. A., & Szpara, M. L. 2016. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *J Vis Exp*(108), 53193.
- Silva, M. V. F., Loures, C. d. M. G., Alves, L. C. V., de Souza, L. C., Borges, K. B. G., & Carvalho, M. d. G. 2019. Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *Journal of biomedical science*, 26, 1-11.
- Singh, A., Rahman, T., Bartiss, R., Arabshahi, A., Prasain, J., Barnes, S., Musteata, F. M., & Sellati, T. J. 2017. Lipoxin A4, a 5-lipoxygenase pathway metabolite,

- modulates immune response during acute respiratory tularemia. *Journal of Leucocyte Biology*, 101(2), 531-542.
- Singh, S., Baker, Q. B., & Singh, D. B. 2022. Molecular docking and molecular dynamics simulation. In *Bioinformatics* (pp. 291-304). Elsevier.
- Sirwi, A., El Sayed, N. S., Abdallah, H. M., Ibrahim, S. R., Mohamed, G. A., El-Halawany, A. M., Safo, M. K., & Abdel Rasheed, N. O. 2021. Umuhengerin neuroprotective effects in streptozotocin-induced Alzheimer's disease mouse model via targeting Nrf2 and NF-K β Signaling cascades. *Antioxidants*, 10(12), 2011.
- Slanzi, A., Iannoto, G., Rossi, B., Zenaro, E., & Constantin, G. 2020. In vitro Models of Neurodegenerative Diseases [Review]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8.
- Sorial, M. E., & El Sayed, N. S. E. D. 2017. Protective effect of valproic acid in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease mouse model: possible involvement of the cholinergic system. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 390, 581-593.
- Sulimov, V. B., Kutov, D. C., & Sulimov, A. V. 2019. Advances in Docking. *Curr Med Chem*, 26(42), 7555-7580.
- Tahami Monfared, A. A., Byrnes, M. J., White, L. A., & Zhang, Q. 2022. Alzheimer's disease: epidemiology and clinical progression. *Neurology and therapy*, 11(2), 553-569.
- Taler, V., & Phillips, N. A. 2008. Language performance in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a comparative review. *Journal of clinical and experimental neuropsychology*, 30(5), 501-556.

- Tapiero, H., Nguyen Ba, G., Couvreur, P., & Tew, K. D. 2002. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(5), 215-222.
- Taupin, P. 2010. A dual activity of ROS and oxidative stress on adult neurogenesis and Alzheimer's disease. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*, 10(1), 16-21.
- Thakur, S., Dhapola, R., Sarma, P., Medhi, B., & Reddy, D. H. 2023. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current progress in molecular signaling and therapeutics. *Inflammation*, 46(1), 1-17.
- Thal, D. R., Rüb, U., Orantes, M., & Braak, H. 2002. Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, 58(12), 1791-1800.
- Thomas, P., & Fenech, M. 2007. A review of genome mutation and Alzheimer's disease. *Mutagenesis*, 22(1), 15-33.
- Torres, P. H., Soderro, A. C., Jofily, P., & Silva-Jr, F. P. 2019. Key topics in molecular docking for drug design. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4574.
- Torres, P. H. M., Soderro, A. C. R., Jofily, P., & Silva-Jr, F. P. 2019. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. *Int J Mol Sci*, 20(18).
- Trinchese, F., Liu, S., Ninan, I., Puzzo, D., Jacob, J. P., & Arancio, O. 2004. Cell cultures from animal models of Alzheimer's disease as a tool for faster screening and testing of drug efficacy. *J Mol Neurosci*, 24(1), 15-21.

- Vaidyanathan, R., Kalthod, V. G., Ngo, D. P., Manley, J. M., & Lapekas, S. P. 2004. Amidations using N, N '-carbonyldiimidazole: Remarkable rate enhancement by carbon dioxide. *The Journal of Organic Chemistry*, 69(7), 2565-2568.
- Venkataraman, L., Fair, S. R., McElroy, C. A., Hester, M. E., & Fu, H. 2020. Modeling neurodegenerative diseases with cerebral organoids and other three-dimensional culture systems: Focus on Alzheimer's disease. *Stem Cell Reviews and Reports*, 1-22.
- von Schacky, C. 2021. Importance of EPA and DHA blood levels in brain structure and function. *Nutrients*, 13(4), 1074.
- Wang, A., Zhang, Y., Chu, H., Liao, C., Zhang, Z., & Li, G. 2020. Higher Accuracy Achieved for Protein-Ligand Binding Pose Prediction by Elastic Network Model-Based Ensemble Docking. *J Chem Inf Model*, 60(6), 2939-2950.
- Wang, T., Fu, X., Chen, Q., Patra, J. K., Wang, D., Wang, Z., & Gai, Z. 2019. Arachidonic Acid Metabolism and Kidney Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3683.
- West, M. J., Coleman, P. D., Flood, D. G., & Troncoso, J. C. 1994. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *The lancet*, 344(8925), 769-772.
- Winslow, B. T., Onysko, M. K., Stob, C. M., & Hazlewood, K. A. 2011. Treatment of Alzheimer disease. *American family physician*, 83(12), 1403-1412.
- Wood, J. G., Mirra, S. S., Pollock, N. J., & Binder, L. I. 1986. Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(11), 4040-4043.

- Woodman, E. K., Chaffey, J. G., Hopes, P. A., Hose, D. R., & Gilday, J. P. 2009. N, N'-Carbonyldiimidazole-mediated amide coupling: Significant rate enhancement achieved by acid catalysis with imidazole· HCl. *Organic Process Research & Development*, 13(1), 106-113.
- Wu, M., Wang, X., Duan, Q., & Lu, T. . 2007. Arachidonic acid can significantly prevent early insulin resistance induced by a high-fat diet. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 51(3), 270-276.
- Zamaria, N. 2004. Alteration of polyunsaturated fatty acid status and metabolism in health and disease. *Reproduction Nutrition Development*, 44(3), 273-282.
- Zhang, X.-X., Tian, Y., Wang, Z.-T., Ma, Y.-H., Tan, L., & Yu, J.-T. 2021. The epidemiology of Alzheimer's disease modifiable risk factors and prevention. *The journal of prevention of Alzheimer's disease*, 8, 313-321.
- Zhu, B. T. 2022. Pathogenic mechanism of autoimmune diabetes mellitus in humans: potential role of streptozotocin-induced selective autoimmunity against human islet β -cells. *Cells*, 11(3), 492.

EKLER

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU¹

Öğrencinin Adı ve Soyadı	Fatma YEŞİLYURT
Öğrencinin Numarası	
Ana Bilim Dalı	Tıbbi Farmakoloji
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Doktora

Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	% 7	% 15
II. Genel Bilgiler	% 3	% 35
III. Materyal ve Metod	% 19	% 35
IV. Bulgular	% 10	% 15
V. Tartışma	% 3	% 20

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

¹ Bu form bilgisayar ortamında doldurulmalı, çıktısı imzalanıp Tez Savunması Jüri Öneri Formu'yla birlikte Ana Bilim Dalı Başkanlığı aracılığıyla ÜBYS üzerinden Enstitüye iletilmelidir.

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Rektörlük

Sayı : E-75296309-050.01.04-2100173902
Konu : HADYEK Kararı.

30.06.2021

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 22.06.2021 tarihli ve E-42190979-000-2100159363 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 25.06.2021 tarihli ve 5 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 160 no'lu kararı ile sözkonusu tez çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmanın Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülmesine ve taahhütname hükümlerine göre çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYEK Sonuç Raporu"nun Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

TOPLANTI TARİHİ : 25.06.2021

TOPLANTI SAYISI : 5

KARAR NO 160: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Ahmet HACIMÜFTÜOĞLU'nun yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan "**Araşidonik Asit Türevlerinin Hücre Kültürü ve Sıçanlarda Oluşturulan Deneysel Alzheimer Modellerinde Etkilerinin Araştırılması ve Moleküler Modelleme**" isimli tez çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 22.06.2021 tarihli ve E-42190979-000-2100159363 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen tez çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, taahhütname hükümleri gereğince çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, mevcut oy birliği ile kabulüne; **(Yönetmeliğin 8.maddesinin 8/h bendi**

gereğince, Prof.Dr.Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU görüşmeye katılmadı ve oy kullanmadı).

Prof.Dr. Mustafa Sinan AKTAŞ
Başkan Vekili

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.

