



***İN VİTRO* ALZHEİMER MODELİNDE FARKLI SESKİTERPENLERİN
NÖRON KORUYUCU ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Mehmet Enes ARSLAN

Ağustos 2017

ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**İN VİTRO ALZHEİMER MODELİNDE FARKLI
SESKİTERPENLERİN NÖRON KORUYUCU ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Mehmet Enes ARSLAN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Ağustos, 2017

Her hakkı saklıdır

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ ONAY FORMU

**İN VİTRO ALZHEİMER MODELİNDE FARKLI SESKİTERPENLERİN NÖRON KORUYUCU
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ danışmanlığında, Mehmet Enes ARSLAN tarafından hazırlanan bu çalışma 25/08/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN	<i>İmza</i>	:
Danışman Üye	: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ	<i>İmza</i>	:
Üye	: Doç. Dr. Hakan AŞKIN	<i>İmza</i>	:
Üye	: Doç. Dr. Lokman UZUN	<i>İmza</i>	:
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Elanur AYDIN KARATAŞ	<i>İmza</i>	:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ
Enstitü Müdürü

ÖZET

DOKTORA TEZİ

***İN VİTRO* ALZHEİMER MODELİNDE FARKLI SESKİTERPENLERİN NÖRON KORUYUCU ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Mehmet Enes ARSLAN
Erzurum Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Alzheimer hastalığı (AH) genel anlamda zihinsel hastalıkların %60'ını kapsamaktadır ve en önemli nörodejeneratif hastalıklardan biridir. Bu çalışmamızda, insan nöroblastom hücre hattı (SH-SY5Y) retinoik asit uygulanarak nöron benzeri hücrelere dönüştürülmüştür. Dönüştürülen hücrelerde Alzheimer ortamını oluşturmak için geniş doz aralıklarında β -amiloid 1-42 proteini (0-200 μ M) 24/48 saat uygulanmış ve IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Ardından, dört farklı seskiterpen (farnesen, gayzulen, östrisin, lökomisin) β -amiloid uygulanmış hücre ortamına geniş dozlarda (0-100 μ g/ml) uygulanarak oluşturulan toksisiteye karşı nöron koruyucu etkisi incelenmiştir. *In vitro* alzheimer modelinde hücre canlılık oranlarının tespiti için 3- (4,5-dimetil-tiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) ve laktat dehidrogenaz (LDH) salınım testleri yapılmıştır. Ardından hücrelerde toksisitenin yol açtığı ölüm türünü belirlemek için Annexin-V/PI incelemesi flov sitometri yöntemi kullanılmıştır. Hücrelerde apoptoz ve çekirdek integritisi, Hoechst 33258 floresan boyama metodu kullanılarak mikroskop altında incelenmiştir. Son olarak, seskiterpenlerin asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi, toplam antioksidan kapasite (TAK) ve toplam oksidatif durum (TOD) seviyeleri üzerine olan etkileri belirlenmiştir. Sonuçlara göre, farklı seskiterpen konsantrasyonlarının β -amiloide karşı koruyucu etkisi hücre canlılık testleriyle gösterilmiş ve seskiterpenlerin hücrelerde gerçekleşen nekroz ölümlerinde önemli ölçüde düşüşe neden olduğu flov sitometri sonuçlarıyla belirlenmiştir. Bunun dışında seskiterpen uygulamalarının AChE aktivitesinde ve TOD seviyesinde azalmaya, ve TAK seviyesinde artışa neden olduğu gözlenmiştir. Bulgularımız, anti-alzheimer potansiyellerine göre test edilen seskiterpen etkinliklerinin gayzulen>östrisin>farnesen>lökomisin şeklinde sıralandığını ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, Seskiterpen, Toplam antioksidan kapasite, Nekroz, Asetilkolinesteraz aktivitesi, Sitotoksosite, Nöroprotektif etki

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

***IN VITRO* EVALUATION OF NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF DIFFERENT SESQUITERPENES AGAINST ALZHEIMER MODEL**

Mehmet Enes ARSLAN
Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics
Supervisor: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Alzheimer's disease (AD) generally covers 60% of mental disorders and is one of the most important neurodegenerative diseases. In our study, the human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) was transformed into neuron-like cells by applying retinoic acid. In the transformed cells, β -amyloid 1-42 protein (0-200 μ M) was applied for 24/48 hours at wide dose intervals to establish the Alzheimer's environment and IC_{50} values were determined. Next, neuroprotective effect against toxicity generated by administration of four different sesquiterpenes (guaiazulene, eustricine, farnesene, leucomicine) in large doses (0-100 μ g/ml) to β -amyloid administered cell medium was examined for 24 and 48 hours. 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and lactate dehydrogenase (LDH) release tests were performed to determine cell viability rates in the *in vitro* alzheimer model. Subsequently, the Annexin-V/PI study flow cytometry method was used to determine the type of death caused by toxicity in the cells. Apoptosis and nucleus integritis in the cells were examined under the microscope using the Hoechst 33258 fluorescence staining method. furthermore, sesquiterpenes effect on acetylcholinesterase (AChE) activity, Toplam antioxidant capacity (TAC) and Toplam oxidative status (TOS) levels were determined. According to the results, the protective effect of different sesquiterpenes concentrations against β -amyloid for 24 hours and 48 hours was shown by cell viability tests and the result of flow cytometry revealed that sesquiterpenes cause significant decrease in necrosis deaths in cells. It was further analyzed that the AChE activity, the TOS level and the TAC level decreased after sesquiterpene application. Our findings show that the sesquiterpenoid activities tested against anti-alzheimer potentials are ranked as guaiazulene>eustricine>farnesene>leucomicine.

Keywords: Alzheimer's disease, Sesquiterpene, Toplam antioxidant capacity, Necrosis, Acetylcholinesterase activity, Cytotoxicity, Neuroprotective effect

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması Erzurum Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarlarında yapılmıştır. Tez çalışması süresince desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez çalışmamda bana yardımcı olan çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Özlem ÖZDEMİR, Arş. Gör. Ayşenur YAZICI, Arş. Gör. Necmiye KACI, Arş. Gör. Ebru ÖZTAŞ ve Recep KÜÇÜKDOĞRU'ya teşekkürler ederim.

Mehmet Enes ARSLAN

Haziran 2017

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİL DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Bitkiler ve insan sağlığı	1
1.1.2. Terpenler.....	1
1.2. Seskiterpen Laktonlar.....	3
1.2.1. Seskiterpen Laktonlarının Biyolojik Aktiviteleri.....	6
1.2.1.1. Anti-kanser aktivitesi.....	6
1.2.1.2. Antienflamatuar aktivite.....	10
1.2.1.3. Antimalaryal aktivite.....	12
1.2.1.3.1. Artemisinin ve türevleri.....	12
1.2.1.3.2. Muhtelif antimalaryal ilaçlar.....	13
1.2.1.4. Antiviral aktivite.....	14
1.2.1.5. Antibakteriyel aktivite.....	16
1.2.1.6. Antifungal aktivite.....	20
1.2.2. Seskiterpen laktonlarının yapısal aktivite ilişkileri (SAR).....	22
1.3. Alzheimer hastalığı.....	23
1.3.1. Teşhis kriterleri.....	24

1.3.2. Yaygınlık oranları.....	24
1.3.3. AH'nın genetik epidemiyolojisi.....	25
1.3.4. Genom çapında ilişkilendirme çalışmalarından elde edilen bulgular	26
1.3.5. Genetik Olmayan Riskler ve Koruyucu Faktörler.....	30
1.3.5.1. Serebrovasküler hastalık.....	30
1.3.5.2. Kan basıncı.....	31
1.3.5.3. Tip 2 diyabet.....	31
1.3.5.4. Vücut ağırlığı.....	32
1.3.5.5. Plazma lipid seviyeleri.....	33
1.3.5.6. Metabolik sendrom.....	33
1.3.5.7. Sigara tüketimi.....	33
1.3.5.8. Travmatik beyin hasarı.....	34
1.3.6. Genetik olmayan koruyucu faktörler.....	34
1.3.6.1. Diyet.....	34
1.3.6.2. Fiziksel aktivite.....	35
1.3.6.3. Zihinsel aktiviteler.....	36
1.3.7. Biyobelirteçler.....	36
1.3.7.1. Plazma biyolojik belirteçleri.....	36
1.3.7.2. Beyin omurilik sıvısı (BOS) biyobelirteçleri.....	37
1.3.7.3. Biyolojik belirteçleri görüntüleme.....	37
1.3.7.3.1. Yapısal MR.....	37
1.3.7.3.2. Fonksiyonel MR.....	38

1.3.7.3.3. Pozitron emisyon tomografisi (PET) ve tek foton emisyon hesaplamalı tomografi (SPECT).....	39
1.4. Alzheimer hastalığı çalışmalarında kullanılan <i>in vitro</i> modeller.....	41
1.4.1. Kullanılan modeller.....	43
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	46
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	51
3.1. Materyaller.....	51
3.2. Yöntem.....	52
3.2.1 SHSY5Y'den Olgun Nöron Dönüşümü.....	52
3.2.2. Hücre Canlılığının Ölçülmesi ve MTT Analizi.....	53
3.2.3. LDH Analizi.....	53
3.2.4. Apoptoz-Nekroz testi.....	54
3.2.5. Hoechst 33258 floresan boyama ile Apoptoz analizi.....	54
3.2.6. Asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesinin belirlenmesi.....	54
3.2.7. Toplam antioksidan kapasite (TAK) ve toplam oksidatif durum (TOD) analizi.....	54
3.2.8. İstatistiksel analiz.....	55
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	56
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	78
KAYNAKLAR.....	81
ÖZGEÇMİŞ.....	102

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Seskiterpenlerin laktonlarının temel iskeletleri.....	5
1.2. Yapısal olarak farklı seskiterpen laktonları	6
1.3. Yapısal olarak farklı seskiterpen laktonları (Devamı).....	7
1.4. Artemisininin yapısı ve analogları.....	12
1.5. Bazı sıtma önleyiciler seskiterpen laktonların yapıları	14
1.6. Antiviral seskiterpen laktonlar	16
1.7. Antibakteriyel seskiterpen laktonları.....	18
1.8. Antibakteriyel seskiterpen laktonları (Devamı).....	18
1.9. Antibakteriyel seskiterpen laktonları (Devamı).....	19
1.10. Antibakteriyel seskiterpen laktonları (Devamı).....	20
1.11. Seskiterpen laktonlarının anti fungal aktivitesi.....	21
1.12. Seskiterpen laktonlarının anti fungal aktivitesi (Devamı).....	21
1.13. Seskiterpen laktonların genel yapısı.....	23
1.14. a-Demans yaygınlığı (%), b- İnsidans oranları (nüfustaki her 1000 kişi için).....	25
4.1. Farklılaşmamış ve farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik yapıları. a- RA içermeyen hücre kültürü, b- 10 mM RA uygulanmış hücre kültürü (5 gün).....	56
4.2. 24 saat süresince β -Amiloid uygulamasına karşı (3.125-200 μ M) hücre canlılığı testleri.....	57
4.3. 48 saat süresince β -Amiloid uygulamasına karşı (3.125-200 μ M) hücre canlılığı testleri.....	58
4.4. Memantin'in farklı konsantrasyonunun 48 saat süresince β -amiloid uygulamasına karşı nöroprotektif etkisi.	58
4.5. 24 saat süresince farnesen'in β -Amiloid uygulamasına karşı farklı konsantrasyonlarının nöroprotektif etkisi.	59
4.6. 48 saat süresince farnesen'in β -Amiloid uygulamasına karşı farklı konsantrasyonlarının nöroprotektif etkisi.	60
4.7. Hücre ölüm türünü araştırmak için Annexin-V / PI flov sitometrisi (CyFlow® Cube 6, Sysmex, Almanya) analizi	61

4.8. Hoechst 33258 florasın boyama tekniği kromozom bütünlüğü analizi.....	62
4.9. 24 saat süresince gayzulen'in β -Amiloid uygulamasına karşı farklı konsantrasyonlarının nöroprotektif etkisi.	64
4.10. 48 saat süresince gayzulen'in β -Amiloid uygulamasına karşı farklı konsantrasyonlarının nöroprotektif etkisi.	64
4.11. Hücre ölüm türünü araştırmak için Annexin-V/PI flov sitometrisi (CyFlow® Cube 6, Sysmex, Almanya) analizi	66
4.12. Hoechst 33258 florasın boyama tekniği kromozom bütünlüğü analizi.....	67
4.13. 24 saat süresince östrisin'in β -Amiloid uygulamasına karşı farklı konsantrasyonlarının nöroprotektif etkisi.	69
4.14. 48 saat süresince östrisin'in β -Amiloid uygulamasına karşı farklı konsantrasyonlarının nöroprotektif etkisi.	69
4.15. Hücre ölüm türünü araştırmak için Annexin-V/PI flov sitometrisi (CyFlow® Cube 6, Sysmex, Almanya) analizi	71
4.16. Hoechst 33258 florasın boyama tekniği kromozom bütünlüğü analizi	72
4.17. 24 saat süresince Lökomisin'in β -Amiloid uygulamasına karşı farklı konsantrasyonlarının nöroprotektif etkisi	74
4.18. 48 saat süresince Lökomisin'in β -Amiloid uygulamasına karşı farklı konsantrasyonlarının nöroprotektif etkisi.	74
4.19. Hücre ölüm türünü araştırmak için Annexin-V / PI flov sitometrisi (CyFlow® Cube 6, Sysmex, Almanya) analizi	75
4.20.Hoechst 33258 florasın boyama tekniği kromozom bütünlüğü analizi	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Terpenlerin sınıflandırılması	2
3.1. Araştırmada Kullanılan Kit ve Kimyasal Listesi	51
3.2. Araştırmada Kullanılan Cihaz Listesi.....	52
4.1. Farnesenin 24 ve 48 saat süresince <i>in vitro</i> uygulanmasından sonra Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK) ve Toplam Oksidatif Stres (TOD) seviyeleri.....	63
4.2. 24 ve 48 saat süresince farnesen uygulama sonrasında asetilkolinesteraz aktivitesi (μ /ml).....	63
4.3. Gayzulenin 24 ve 48 saat süresince <i>in vitro</i> uygulanmasından sonra Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK) ve Toplam Oksidatif Stres (TOD) seviyeleri.....	68
4.4. 24 ve 48 saat süresince gayzulen uygulama sonrasında asetilkolinesteraz aktivitesi (μ /ml).....	68
4.5. Östrisin 24 ve 48 saat süresince <i>in vitro</i> uygulanmasından sonra Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK) ve Toplam Oksidatif Stres (TOD) seviyeleri.....	73
4.6. 24 ve 48 saat süresince östrisin uygulama sonrasında asetilkolinesteraz aktivitesi (μ /ml).....	73
4.7. Lökominin 24 ve 48 saat süresince <i>in vitro</i> uygulanmasından sonra Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK) ve Toplam Oksidatif Stres (TOD) seviyeleri.....	77
4.8. 24 ve 48 saat süresince Lökomin uygulama sonrasında asetilkolinesteraz aktivitesi (μ /ml).....	77

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde Konsantrasyon
°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre

Açıklama

Kısaltmalar

AD	Alzheimer hastalığı
SL	Seskiterpen Laktonlar
ROS	Reaktif oksijen türülerini
EOAD	Erken başlangıçlı Alzheimer
LOAD	Geç başlangıçlı Alzheimer
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrasodium
bromide	
LDH	Laktat Dehidrogenaz
TAK	Toplam Antioksidan Kapasite
TOD	Toplam Oksidatif Stress
DNA	Deoksiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
HBV	Hepatit B Virüsü
MIC	Minimum İnhibe edici Konsantrasyon
GSH	Glutasyon
Beta Amiloid	βA
BBB	Kan Beyin Bariyeri
NFT	Nörofiriler Yumak
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi

1. GİRİŞ

1.1. Bitkiler ve insan sağlığı

İnsanlar yüzyıllar süresince şifalı bitkiler kullanmışlardır. Bitki ürünleri, gıdaların veya bitkisel ilaçların bir parçası olarak, tarih süresince hastalıkları tedavi etmek ve önlemek için başarılı bir şekilde uygulanmışlardır. Tıbbi bitkilerle ilgili yazılı kayıtlar Sümerlerce 5000 yıl öncesine kadar dayanmaktadır (Osborne and Beerling 2006). Bitkiler ve insan sağlığı arasındaki güçlü tarihi bağ, Friedrich Bayer ve Co.'nun sentetik asetil salisilik asit (aspirin) dünyaya tanıttığı 1897'de güçlenmeye başlamıştır. Aspirin, söğüt ağacının aktif bir bileşığı olan salisilik asidin daha güvenli bir sentetik analogudur ve insanlar tarafından, ağrı ve ateşe karşı çare olarak keşfedilmiştir (Pierpoint 1994).

Yirminci yüzyıl, sentetik kimya ilaç endüstrisi için bir zafer dönemi haline gelmiştir. Doğal ürünlerle hiçbir bağlantısı olmayan sentetik moleküller yerine bitki ekstraktlar ilaç sektöründe yerini almıştır. İlaç endüstrisinin göze çarpan yükseliş, hastalıkların tedavisi ve önlenmesi üzerinde sayısız çalışma yapılmış, sayısız yaşam kurtarmış ve yirminci yüzyılın olağanüstü başarılarından biri haline gelmiştir. Bununla birlikte, modern ilaçların yararları öncelikle gelişmiş ülkelerde hissedilmiştir ve gelişmekte olan ülkeler, etnobotanik tedavileri birincil ilaç olarak kullanmaya devam etmektedir. Dünya nüfusunun yaklaşık %75'i gelişmiş ülkelerde kullanılan modern sağlık ürünlerine erişememektedir. İnsan ilaçlarının halen fitokimyasallar içerdiğini göz ardı etmek kolay değildir ki piyasanın yaklaşık % 50'sini bitkisel içerikli ilaçlar oluşturmaktadır ve bu bitkisel içeriklerin en önemlilerinden biri de terpenoid moleküllerdir (Mohammadinejad vd. 2015).

1.1.2. Terpenler

Terpenoidler, kozalaklıların karakteristik yapısının temel kaynaklarından birisidir ve tetiklenebilir savunma mekanizmasında rol alan önemli kimyasallardandır. Terpen oluşumu, birikimi ve konifer iğnelerinden salınımının biyokimyasal düzenlemesi terpen depolama yapılarına fiziksel hasar vermeden savunma yanıtlarını indüklemek için metil jasmonat (MeJA) kullanan Norveç ladin fidelerinde belirlenmiştir. MeJA tedavisi, terpen bileşiminde değişiklik yapılmaksızın, iğnelerde monoterpen ve seskiterpen birikiminde iki kat artışa neden olduğu ve MeJA tedavisinden sonra ahşap dokuda

gözlenen monoterpen ve diterpenlerde önemli ölçüde artış meydana geldiği gözlenmiştir (Martin vd. 2003).

Terpenler, yaşamın tüm canlı formları arasında tespit edilen 30.000'in üzerinde tanımlanmış bileşik içeren, yapısal olarak geniş çeşitlilik gösteren ve yaygın olarak bulunan doğal bir üründür. Terpenlerin çoğunluğu, birincil metabolizma ve ekolojik etkileşimleriyle geniş bir etki yelpazesine sahip bitkilerden izole edilmiştir. Birçok terpen esans yağları, karotenoid pigmentler ve doğal kauçuk da dahil olmak üzere ekonomik açıdan önemlidir. Terpenler, dallı C_5 izoprenoit birimlerinin tekrarlı olarak birleştirilmesi ile oluşturulur ve tarihsel olarak en küçük kabul edilen ve monoterpen olarak adlandırılan C_{10} ailesinde boyutuna göre kategorize edilir. Teropen bileşiklerinin isimlendirmesi, sesquiterpenes (C_{15}), diterpenler (C_{20}), sesterterpenes (C_{25}), triterpenes (C_{30}), tetraterpenes (C_{40}) ve politerpenler ($> C_{40}$) olarak belirlenmiştir (Tablo 1.1.). 1960'larda doğal bir ürün olarak keşfedilen izopren, bu nedenle hemiterpene (C_5) kabul edilmiştir. Meroterpenler, terpen olmayan bir parçaya bağlı terpen kökenli bir birimden oluşmuştur, örnek olarak klorofil, plastokinon, bazı indol alkaloidleri ve prenilasyon proteinleri incelenmiştir (Davis vd. 2000).

Tablo 1.1: Terpenlerin sınıflandırılması

Terpenler	İzopren Birimleri	Karbon Atomları
Hemiterpenler	1	5
Monoterpenler	2	10
Seskiterpenler	3	15
Diterpenler	4	20
Sesterpenler	5	25
Triterpenler	6	30
Karotenoidler	8	40
Kauçuk	>100	>500

Terpen ailesinin bir üyesi olan seskiterpenler biyolojik aktiviteleri ve insan hastalıkları üzerindeki etkileri nedeniyle büyük önem teşkil etmiştir. Literatür taramamalarından seskiterpenler üzerine ilaç kimyası alanında çok fazla çalışma bulunmadığı görülmüştür. Yapılan çalışmalar incelendiğinde ise seskiterpenlerin çalışmalarda önemli oranda biyolojik etki gösterdiği belirlenmiştir. Seskiterpenoidler ve özellikle Asteraceae seskiterpen laktonları, dengeli bir diyetin parçası olarak ve kardiyovasküler hastalıkların ve kanserin tedavisi için tedavi edici potansiyellerinden dolayı farmasötik madde olarak insan sağlığında önemli roller oynayabilmiştir. Farklı araştırmalar, seskiterpen laktonlarının kendilerini üreten bitkilerde endojen olarak görev aldığı ve bu bitkilerin hayvan ve insan tüketicileri arasında etkileşimde bulunduğu mekanizmaları araştırılmıştır. İnsanlarda potansiyel olarak seskiterpen kullanarak inflamasyon ve tümörigenezin azaltılması için çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Halk ilaçlarının araştırmaları, diyare, yanıklar, influenza ve sinirsel bozukluklar gibi birçok rahatsızlığın tedavisinde, seskiterpen laktonları etkin madde olarak kullanılmıştır. Seskiterpenlerin anti-inflamatuar özelliklerine ek olarak, tümör hücrelerinin ilaç tedavilerinde de etkili olduğu rapor edilmiştir (Chadwick vd. 2013).

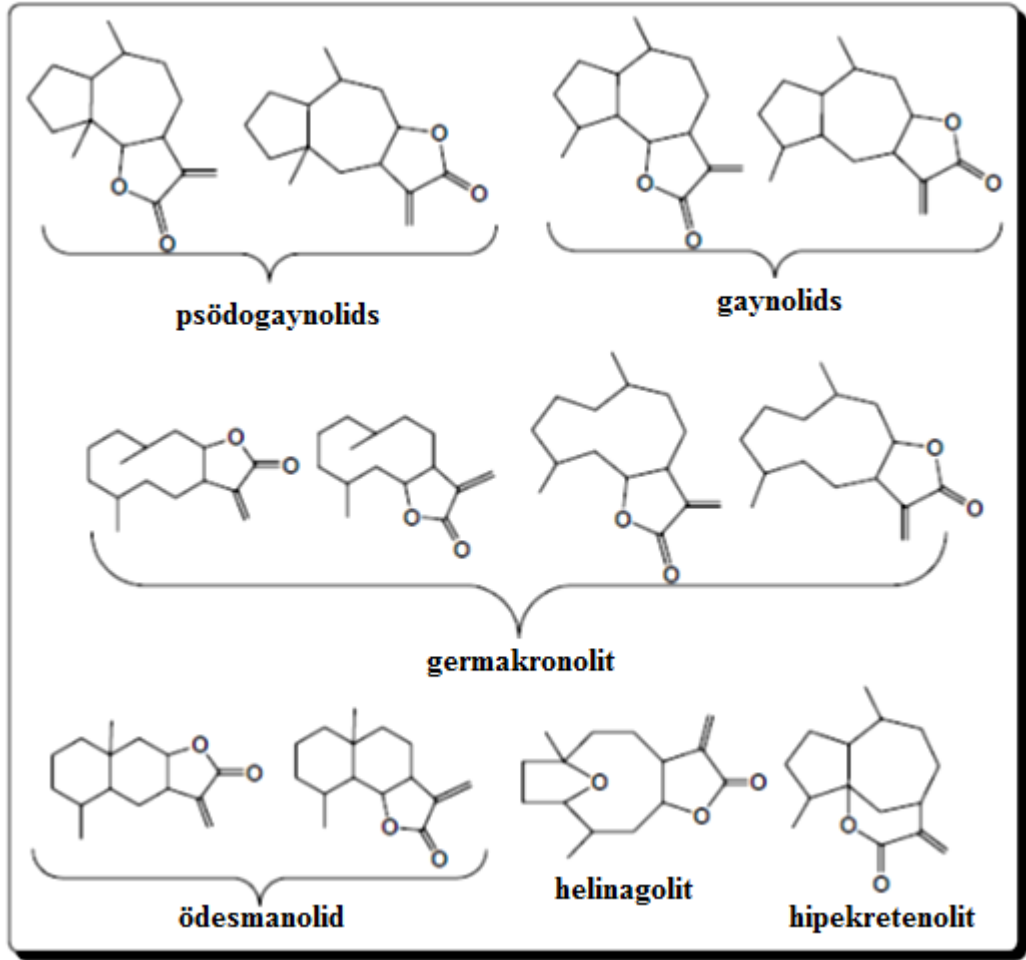
1.2. Seskiterpen Laktonlar

Seskiterpen laktonlar (SL), Acanthaceae, Anacardiaceae, Apiaceae, Euphorbiaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Rutaceae, Winteraceae ve Hepatideae gibi çeşitli bitki familyalarında tanımlanan, biyolojik olarak aktif bitki kimyasallarının geniş çeşite sahip bir grubudur (Robles vd. 1995). Bununla birlikte, en büyük sayı Compositee (Asteraceae) ailesinde 3000'den fazla farklı yapıya rastlanmaktadır (Modzelewska vd. 2005). Seskiterpen laktonlar, doğal olarak bulunan çeşitli bitki terpenoidlerinin bir sınıfıdır ve bunlar doğal ürünlerin çeşitliliğini ve eşsiz sınıfını temsil eder. Üç izopren ünitesinin kafa-kuyruk kondenzasyonundan ve ardından siklizasyondan üretmek için oksidatif dönüştürmeden oluşturulmuş uçucu yağların önemli bileşenleridir. Bu ikincil bileşikler, öncelikle karbosiklik iskeletlerinin pseudoguainolides, guaianalides, germanokranolides, eudesmanolides, helyangolides ve hptocretenolides gibi temelinde sınıflandırılmıştır (Şekil 1).

"Olit" son-ekinin lakton işlevine atıfta bulunduğu ve on üyeli karbosiklik seskiterpen, germakron ile ilişkili bulunan bir almanakranorid olan kostunolit'ye dayanmaktadır.

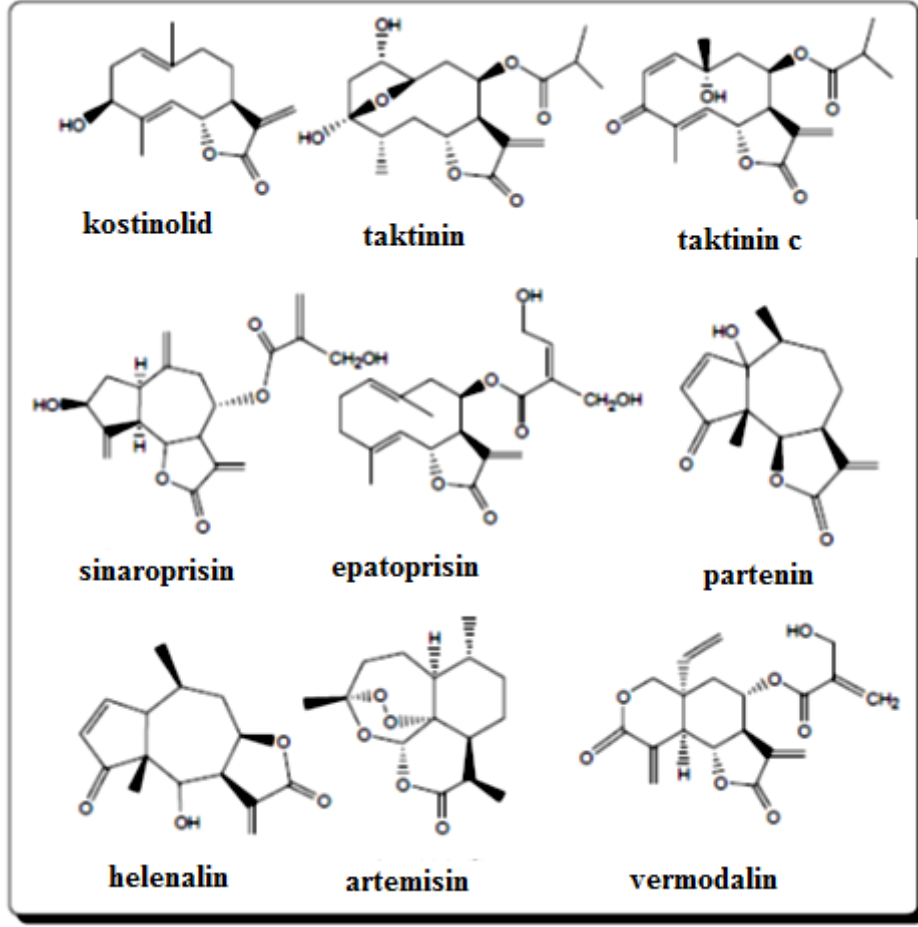
Bununla birlikte, SL'ler çeşitli farklı iskelet düzenlemelerini sergilemektedir. Tek bir bitki türü genelde yapraklarda ve çiçek başlarında yoğunlaşmış bir iskelet tipi SL üretmektedir. Kuru ağırlık başına SL'lerin yüzdesi %0.01-%8 arasında değişebilmektedir. SL'leri içeren bitkiler tarafından beslenen zirai hayvan kayıpları bilinmektedir. Aslında, geniş bir biyolojik aktivite sergiledikleri gösterilmektedir.

SL'lerin önemli bir olağan özelliği, bir çok durumda, bir α -metilen grubu içeren bir γ -lakton halkasının (C-6 ya da C-8'e karşı kapalı) varlığıdır. Diğer modifikasyonlar arasında, hidroksillerin veya esterlenmiş hidroksillerin ve epoksit halkasının bir araya getirilmesi yaygın bir yöntemdir. Glikozid formunda birkaç SL oluşur ve bazıları halojen veya sülfür atomları içermektedir. SL'lerin çoğunluğu sitotoksik etki (*in vitro* KB ve P388 lösemi hücre hattı) ve *in vivo* P388 lösemisine karşı farklı biyolojik aktiviteler gösterdiği analiz edilmiştir. Yapı aktivitesi ilişkileri çalışmalarında, çeşitli sitotoksik SL'lerin protein içindeki sistein kalıntıları gibi tiyollerle Michael tipi hızlı ilave reaksiyonu gösterdiği belirlenmiştir. Bu reaksiyonlara kimyasal olarak SL'lerde bulunan α , β -doymamış karbonil sistemi aracılığı ile sağlanmıştır. Bu çalışmalar, SL'lerin hücre bölünmesini kontrol eden, çeşitli hücre fonksiyonlarını inhibe eden, büyüme düzenleyici biyolojik makromoleküllerin seçici alkilasyonunu sağlayan böylece hücrenin apoptoza yönlendirilmesini sağlayarak tümör büyümesini inhibe ettiği görüşünü desteklemiştir (Rasul vd. 2012).



Şekil 1.1: Seskiterpenlerin laktonlarının temel iskeletleri.

Bireysel SL'ler arasındaki aktivitedeki farklılıklar, farklı sayıda alkile edici yapı elemanlarıyla açıklanabilmektedir. Bununla birlikte, lipofiliklik, moleküler geometri, kimyasal çevre veya hedef sülfhidril gibi diğer faktörler, seskitpenler laktonlarının aktivitesini de etkileyebilmektedir. Yapısal olarak farklı seskiterpen laktonlarından bazıları Şekil 2 ve 3'te gösterilmektedir.

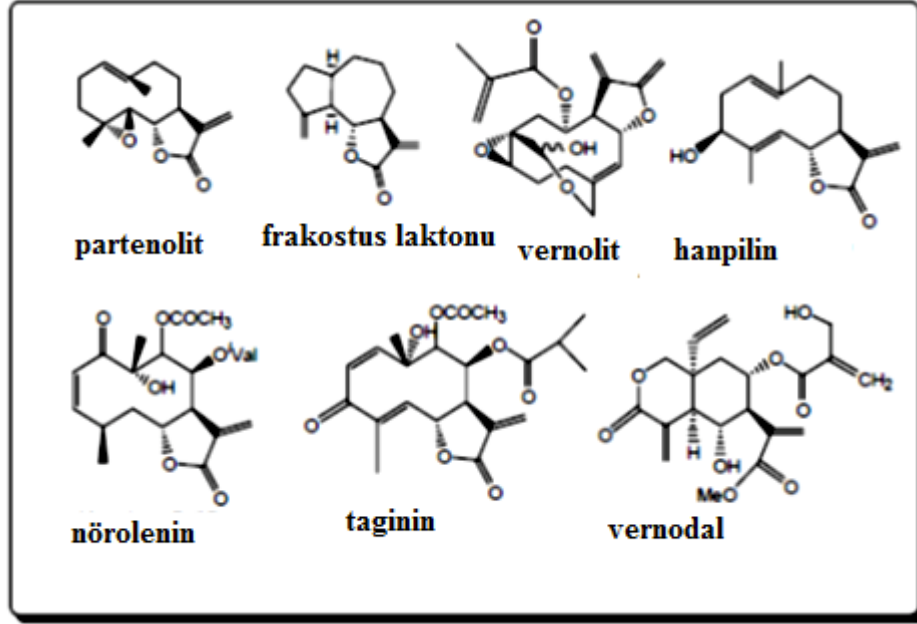


Şekil 1.2: Yapısal olarak farklı seskiterpen laktonları

1.2.1. Seskiterpen Laktonlarının Biyolojik Aktiviteleri

1.2.1.1. Anti-kanser aktivite

Son yıllarda dünyadaki pek çok araştırmacı, seskiterpen laktonlarının potansiyel bir anti kanser aktivitesine sahip olduğunu bildirmiştir. Bu sınıfın önemli bileşiklerine ait antikanser aktivite bulguları aşağıda detaylandırılmıştır.



Şekil 1.3: Yapısal olarak farklı seskiterpen laktonlar.

1.2.1.1.1. Kostunolit

Kostunolit (Şekil 1.2), geleneksel Çin tıbbında şifalı bir bitki olan *Saussurea lappa* köklerinin ham özütünün aktif bir bileşenidir (Rasul vd. 2012). Kostunolit'in antikanser özelliği, ilk olarak, azoksimetan tarafından indüklenen bir sıçan bağırsak karsinogenesis modelinde rapor edilmiş ve daha sonraki bir araştırmada DMBA kaynaklı hamster bukal kese karsinogenesis modeli kullanarak desteklenmiştir (Ohhini vd. 1997). Bu iki *in vivo* deneyin ardından, kostunolit'in antikanser aktivitesinden sorumlu mekanizmanın anlaşılması için kayda değer çabalar sarf edilmiştir. İlk olarak, kostunolit, kanser hücrelerinde çoklu yollarda, güçlü bir apoptotik uyarıcıdır. Costunolidin, hücre içi GSH'yi kolayca tükettiği ve hücrel redoks dengesini bozduğu bildirilmiştir (Park vd. 2002). Mitokondriyal disfonksiyona yol açan hücre içi reaktif oksijen türlerini (ROS) tetikleyerek: mitokondriyal zar potansiyeli kaybı, mitokondriyal membran geçişinin başlangıcı ve mitokondriyal pro-apoptotik proteinlerin salınımına neden olduğu bildirilmiştir (Cote vd. 2003). Kostunolit'nin apoptozu indükleyen aktivitesinin, kostunolit tedavisinin anti-apoptotik Bcl-2 protein ekspresyonunu azalttığı gözlemlerine dayanarak Bcl-2 ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir; buna karşın, Bcl-2

proteininin aşırı ekspresyonu, kostunolit bağılı apoptozu zayıflatmıştır (Wright vd. 2001). İkinci olarak kostunolit, güçlü anti-inflamatuar Fukuda, K., Akao hücrelerinin anjiyojenezini inhibe edebileceği ve kanser hücrelerinde nükleer mikrotübül mimarisini olumsuz etkileyebileceği rapor edilmiştir (Choi vd. 2002; Wiart 2012).

1.2.1.1.2. Partenolid

Partenolid (Şekil 1.3), yüzyıllarca ateş, migren ve artrit tedavisinde kullanılan geleneksel bir bitki olan feverfew (Tanacetum parthenium) 'un biyoaktivitesinden sorumlu ana SL olduğu bildirilmiştir (Barceloux 2008). Partenolid'in iyi araştırılmış bir biyoaktivitesi, esasen NF-kB aktivasyonu üzerindeki güçlü inhibisyon etkisiyle elde edilen güçlü anti-inflamatuar etkisi gösterilmiştir. Partenolid'in NF-kB sinyal yolu süresince birçok basamak üzerinde etkili olduğu rapor edilmiştir (Ghisalberti 2002). NF-KB'yi baskılayarak, partenolid interlökinler ve prostaglandinler gibi bir grup NF-kB'yi düzenleyen pro-inflamatuar sitokinleri inhibe etmiştir (Duah vd. 2017). Partenolid'in anti kanser aktivitesi, bir dizi laboratuarda takip edilmiştir. Karsinogenezin farklı evrelerinde moleküler seviyelerde partenolid'nin etki mekanizmasını araştırmak için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Veriler farklı tümör hücresi sistemleri kullanılarak elde edilmiştir. Partenolid, kromozomal translokasyonları taşıyan hücreler de dahil olmak üzere pre-B akut lenfoblastik lösemi çizgilerinde apoptozu indüklediği görülmüştür (Lee vd. 2014). Partenolid, nükleer DNA'nın kaybı, hücre zarı fosfatidilserinin dışa vurumu ve mitokondriyal membranların 5-100 uM arasında değişen konsantrasyonlardaki depolarizasyonu ile ayırd edilen hızlı apoptotik hücre ölümüne yol açmıştır. Kronik lenfositik lösemili hastalardan izole edilen hücreler üzerine partenolid'nin *in vitro* etkilerini araştırılmıştır. Seskiterpen lakton'a kısa bir süre maruz kalma (1-3 saat), kaspaz aktivasyonunu ve hücre ölümünü uyarmaya yettiğini göstermiştir. Hücre öldürme mekanizması, partenolid ile indüklenen ROS oluşumu yoluyla proapoptotik bir Bax konformasyonel değişikliğine, mitokondriyal sitokrom C salımına ve kaspaz aktivasyonuna neden olmuştur. Diğer çalışmalar parthenolid ile tedavi edilen apoptozun ROS üretimi ile iyi koreli olduğunu göstermiştir. Partenolid, dört multipl myeloma hücre dizisinde apoptozu kuvvetli bir şekilde uyarmıştır, buna rağmen seskiterpen laktona duyarlılıkta önemli farklılıkları bildirilmiştir. Partenolid duyarlı KMM-1 ve MM1S, daha az hassas KMS-5 ve NCI-H929 hücrelerinden daha az

katalaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, multipl miyelom hücrelerinde partenolid bağlı apoptozun artmış ROS'a bağlı olduğunu ve intraselüler katalaz aktivitesinin, partenolid duyarlılığının belirleyici bir belirleyicisi olduğunu göstermiştir. Caspase-3 aktivitesinin arttırılması yoluyla aracılık edilen insan çoğul miyelom hücrelerinde partenolid'nin anti-proliferatif ve apoptozu indükleyici etkilerini de bildirilmiştir (Makiyi vd. 2009).

1.2.1.1.3. Helenalin

Helenalin (Şekil 1.2), sitotoksositeye ve anti-kanser aktivitesine sahip olduğu bildirilen Arnica türlerinden başka bir SL olduğu gösterilmiştir (Ha vd. 2003). önceki bulgular helenalinin nükleik asit ve protein sentezini inhibe etme yönündeki güçlü etkinliğini göstermiştir . Diğer antikanser SL'lere benzer şekilde, esas olarak etki mekanizması: (i) tiyol tükenmesi, (ii) NF-kB'nin inhibisyonu ve (iii) apoptozun indüksiyonu incelenmiştir (Lyss vd. 1997). Bu belirgin biyolojik aktiviteler helenalin'i bir başka potansiyel anti-kanser ajanı haline getirmiştir.

1.2.1.1.4. Artemisinin ve Türevleri

Araştırmacılar, kanser hücrelerinde yüksek demir birikimi göz önüne alındığında, habis hücelere karşı artemisinin (Şekil 1.3) biyolojik aktivitesi ile ilgilenmeye başlamış ve *in vitro* olarak çok sayıda kanser hücrelerine karşı artemisinin kullanılmıştır (Lai and Singh 1995). Artemisinin, kanser hücre hatlarına karşı seçici toksisitesini destekleyen kanser hücreleri tarafından paylaşılan bir takım özellikleri belirlenmiştir. Normal hücelere kıyasla transferrin reseptörleri yoluyla yüksek oranda demir akışlarına ek olarak, kanser hücreleri de özellikle oksijen radikallerine karşı hassas olduğu bildirilmiştir. Artemisinin demirli iyon varlığında sitotoksik olur. Demir akışı kanser hücrelerinde doğal olarak yüksek olduğu için artemisinin ve analogları *in vivo* olarak kanser hücrelerini seçici olarak öldürebildiği belirlenmiştir (King vd. 2016). Dahası, artan hücreiçi demir konsantrasyonlarına yol ačan koşullar sağlayarak kanser hücrelerindeki demir akışını arttırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, vücut bütün gerekli demir taşıma proteinlerini sağladığı için, sağlam *in vivo* sistemlerdeki holotransferrin'e ihtiyaç duymadıklarını bildirmişlerdir. Son yıllarda, potansiyel kanser önleyici ajanlar keşfetmek için, birçok araştırmacı çaba göstermiştir. Potansiyel anti kanser aktivitesi

gösteren moleküller ve klinik araştırmaların çeşitli safhalarında olan artemisinin dimerler, trimerler ve tetramerler sentezlenmiştir (Chaturvedi vd. 2010).

1.2.1.2. Antienflamatuar aktivite

Seskiterpenler laktonları, NF-kB yoluyla potansiyel bir anti-inflamatuar aktivite sergilemiştir. NF kB çoğu hastalık sürecinde merkezi bir rol oynadığından ve çeşitli insan kanserlerinin yanı sıra enflamatuar hastalıklarla ilgili birçok temel genin ekspresyonunu düzenleyebildiğinden, NF-kB'nin yeni kemopreventif ve kemoterapötik ajanların geliştirilmesi ile ilgili umut verici bir hedef olduğu rapor edilmiştir (Fukuda 2001).

1.2.1.2.1. Kostunolit

Kostunolit (şekil 1.3) *Magnolia grandiflora*, *Tanacetum parthenium* gibi çeşitli bitkilerde bulunan partenolid ile yakından ilişkili bir seskiterpen lakton analogudur. Koo ve ark. kostunolit'in doz bağımlı olarak endotoksin (LPS) ile uyarılan NF-kB aktivasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Bu deney sisteminde kostunolit da partenolid daha kuvvetli inhibitör aktivite göstermiştir. Ayrıntılı mekanizma çalışmaları, partenolid'ye benzer şekilde, kostunolit'nin de IκB-α ve IκB-β'nin bozunmasını önemli ölçüde inhibe ettiğini ortaya koymuştur. Ek olarak, kostunolit, IκB-α'nın fosforilasyonunu da engellemiştir. Bu birikimli sonuçlar, kostunolit'in, IκB'nin fosforilasyonunu önleyerek NF-kB aktivasyonunu inhibe ettiğini ve dolayısıyla kompleksi inaktif bir formda salıverdiğini göstermiştir (Bader vd. 2015).

1.2.1.2.2. Partenolid

Partenolid (şekil 1.3), halk hekimliğinde antiinflamatuar ve analjezik özellikleri nedeniyle çeşitli tıbbi bitkilerde bulunan bir seskiterpen laktonu olduğu bildirilmiştir. Çeşitli *in vitro* alışmalar, bu bileşiğin anti-enflamatuar etkisinin büyük bir bölümünün NF-kB yolağını inhibe etme kabiliyetiyle ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. *In vitro* alışmalar, seskiterpen lakton partenolid'nin oksijen radikallerinin oluşumuna müdahale etmediğini (Bader vd. 2015) kanıtlamıştır; buna karşın özellikle IKK'yi hedef alarak (Shin vd. 2004) NF-kB yolağının aktivasyonunu inhibe etmekte ve/veya IκB-α'nın bozunmasını önlediği gösterilmiştir. Dahası, partenolid'nin sıçanlarda endotoksik çok esnasında akciğere NF-κB DNA bağlanmasıyla ilgili inhibisyonu yoluyla yararlı etkiler

ortaya koyduğu bildirilmiştir (Sheehan vd. 2002). Partenolid'nin bu etkileri aynı zamanda, sıçan düz kas hücrelerinde endotoksin uyarımı sonrasında indüklenebilir nitrik oksit sentaz geni (Wong vd. 1999) ve immün uyarılmış insan solunum yolu epitel hücrelerinde IL-8 için gen gibi proinflamatuvar mediatör genlerin inhibisyonundan sorumlu olabileceği gösterilmiştir (John 2003). Buna ek olarak, partenolid'nin, IKK aktivasyonu ve I κ B α degradasyonunun selektif inhibisyonu ile sıçanlarda miyokard iskemisine ve reperfüzyon hasarına karşı koruma sağladığı da gösterilmiştir (Uchi vd. 2002).

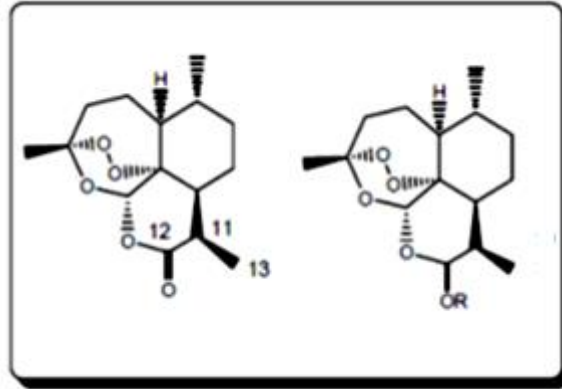
1.2.1.2.3. Helenalin

Farklı seskiterpen lakton türleri, benzer konsantrasyonlarda NF-kB aktivasyonunun inhibisyonunu gösterdiğinden, bu etki, partenolid ve kostunolit gibi bir exometilen grubu olan seskiterpen laktonların çoğunda karakteristik gibi gözükmemektedir. β -doymamış karbonil bileşiklerinin eksometilen grupları, NF-kB alt biriminin DNA bağlama alanındaki sistein kalıntılarının sülfhidril gruplarına Michael tipi ilave ederek reaksiyona girebilmektedir (Picman vd. 1979). Son zamanlarda, Lyu ve ark. β -doymamış karbonil grubu ve α -metilen- δ -lakton halkası olmak üzere iki fonksiyonel grup ihtiva eden bir seskiterpen lakton olan helenalinin (şekil 1.2), I κ B bozunmasını inhibe etmeden NF-kB'nin p65 altbiriminin direkt alkilasyonunu ortaya koymaktadır (Denk 2001). *In vitro* alışmalar helenalin'in NF-kB'nin p-65 alt birimini nükleer seviyede seçerek değiştirdiğini ve bu nedenle DNA bağlanmasını inhibe ettiğini göstermektedir. Ancak, kostunolit, bir takım fonksiyonel gruplarda helenalinden farklıdır ve I κ B'nin fosforilasyonunu inhibe ederek I κ B'nin bozunmasını engellemektedir. Bu nedenle, NF-kB inhibisyon modunu belirlemek için, egzometilen grubu dışındaki başka bir fonksiyonel grup ve seskiterpen lakton bileşiklerinin moleküler geometrisi önemli faktörler olarak görünmektedir. Bununla birlikte, partenolid epoksit grubu önemli olmayacaktır, çünkü partenolid hem NF kB aktivasyonunu hem de NO üretimini inhibe etmek için daha az etkili olduğu gösterilmektedir (Lyss vd. 1998).

1.2.1.3. Antimalaryal aktivite

1.2.1.3.1. Artemisinin ve türevleri

1972'de Çinli bir grup araştırmacı, geleneksel bir Çin şifalı bitkisi olan *Artemisia annua*'nın (Asteraceae antik zamanlardan beri ateş ve sıtmanın tedavisinde kullanılan bir bitkidir) heksan ekstraktından cadinene ait amorfen alt grubunun seskiterpen laktonu olan artemisinin (Şekil 1.4) yeni bir anti-sıtma ilacını izole edilmiştir. Artemisinin içeriğinde bir endoperoksit bağ içeren bir seskiterpen laktondur. Bu aşırı oksijenli seskiterpen lakton peroksit, diğer birçok anti-sıtma maddesinin aksine, nitrojen içeren heterosiklik halka sistemlerine sahip değildir ve belirgin ters etkileri olmayan sıtma suşlarına karşı klorokin, kinin gibi geleneksel antimalaryal ilaçlara üstün plazmasid ve kan şıdratürat ajanı olarak analiz edilmiştir (Chaturvedi vd. 2010).



Şekil 1.4: Artemisinin yapısı ve analogları

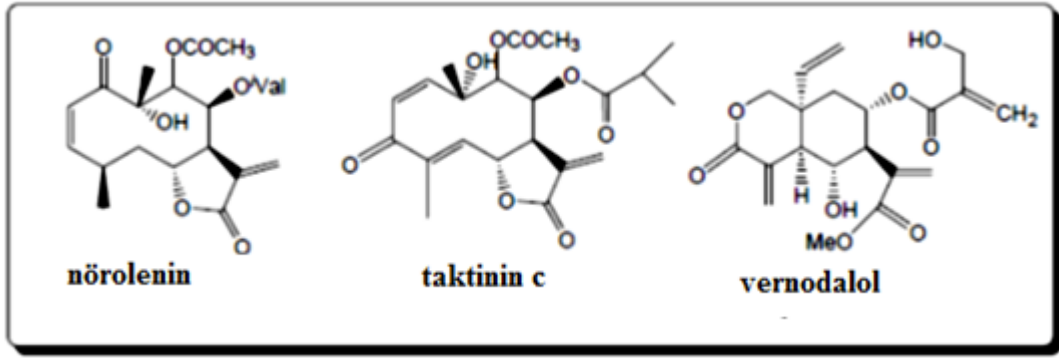
Artemisinin hem klorokine duyarlı hem de dirençli *P. falciparum* suşlarına karşı *in vitro* nanomolar konsantrasyonlarda aktiftir. Bununla birlikte, artemisinin pratik değerleri, (i) yağda veya suda zayıf çözünürlük; (ii) tedavi sonrasında yüksek oranda parazit geri kazanımı; (iii) kısa plazma yarı ömrü (3-5 saat) ve kötü oral aktivite göstermiştir. Bununla birlikte, son zamanlarda artemisinin kullanımı, ilacı seçme baskısı geri çekildiğinde ortadan kaybolan az bir direnç seviyesine gelmiştir. Bununla birlikte, endoperoksit bağlantılı artemisinin, büyük ölçekli türetme için hassas bir molekül

olduğu bildirilmiştir. Artemisinin 8'in karbonil grubunun sodyum borohidür kullanarak yüksek verimle dihidroartemisinin indirgenebileceği ve bunun da yağda çözünebilen artematı kapsayan bir dizi yarı sentetik birinci nesil analogunun hazırlanmasına yol açtığı rapor edilmiştir. Bu analoglar, klorokine dirençli *P. falciparum* suşlarına karşı etkili anti-sıtma ilaçları haline gelmiştir. Artemether, ciddi MDR sıtmasının tedavisi için önemli ilaç listelerine dahil edilmiştir. Bu ailenin Walter Reed Enstitüsü, artelinik asit olarak bilinen, hayvanlarda denenmekte olan stabil, suda çözünür bir türevi patent altına almıştır. Yaklaşık yirmi yıldır kullanılan antimiral maddeler içeren bu endoperoksitlerin önemli bir avantajı, ilaç direncinin bulunmaması olduğu belirtilmiştir. Artemisinin esas olarak endoperoksitin antimalaryal aktiviteyi etkilediği yapı-etkinlik ilişkisi (SAR) ile gerçekleştirilmiştir. Bu moleküllerin antimalaryal kuvvetini artırmak için, araştırmacılar son yıllarda artemisinin dimer, trimerler ve tetramerlerini sentezlemekle ilgilenmiştir. Birçoğu, artemisinin ve ilk nesil analoglarından daha umut verici antimalaryal aktivite göstermiştir (Chaturvedi vd. 2010).

1.2.1.3.2. Muhtelif antimalaryal ilaçlar

Neurolema lobata'dan seskiterpenes laktonlarının antimalaryal aktivitesi belgelenmiştir (Şekil 1.5) (François vd. 1996). Germakranolid, löbatin B'den ($IC_{50} = 16.51 \mu M$) daha güçlü olan nörolenin B ($IC_{50}=0.62 \mu M$) gibi laktonlar seskiterpendir. Germakranolidler arasında, çift bağın 2,3 konumundan (nörolenin B) 3,4 konuma (lobatin A) kayması, aktivitenin dramatik bir şekilde azalmasına yol açtığı ve yapısal gerekliliklerden birinin, A/ β -doymamış keto fonksiyonu olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, C-8'deki bir serbest hidroksil grubu antiplazmodal aktiviteyi artırırken, C-9'daki serbest bir hidroksil grubu aktiviteyi düşürmüştür. *Titonia diversifolia*'nın üç soy *P. falciparum*'a karşı antiplazmodal özelliklerini araştırmış ve seskiterpen lakton (Şekil 1.5/Şekil 1.3) Etikitinin C, FCA suşuna karşı ($IC_{50}=0.33 \mu g/mL$) (Lifongo vd. 2014) karşı aktif olduğu gösterilmiştir. *Vernonia colorata*'dan dört seskiterpen, vernodalol 11 β , 13 dihidro-perodalın 11 β , 13-dihidrobarbonolit ve 11 β , 13,17,18-tetrahidro-venolit bildirmiştir. Bunların arasında vernodalol ve 11 β , 13-dihidro-noraldalin sırasıyla en güçlü antiplazmodal aktivite ($IC_{50}=4.8-1.1 \mu g/mL$) sergilemiştir. *Artemisia afra*'dan elde edilen seskiterpen laktonlar arasında, sitoplazmaya sahip olan 1-desoksi-1a-peroksirupikolin A-8-0 asetat 1 β , 4 β -dihidroksi-bishopsolispolid ve rupikolin A-8-0-asetat

antiplazmodiyal *in vitro* aktivite ($IC_{50}=10.8-17.5 \mu\text{g/mL}$) göstermiştir (Kraft vd. 2003). *Arnica Montana* izolatu, helenalin, dihidrohelenalin ve onların asetatlarından psödoguaianolit türevi izole seskiterpen laktonları *in vitro* *P. falciparum*'a karşı aktivite ($IC_{50} = 0.23$ ile $7.41 \mu\text{M}$) göstermiştir (François vd. 2004). *P. falciparum*'un büyümesi üzerine önleyici etkisi ($IC_{50}=1.2-0.3 \mu\text{g/mL}$), Camchaya kalsemarasından izole edilmiş seskiterpen laktonlar için rapor edilmiştir (Vongvanich vd. 2006).

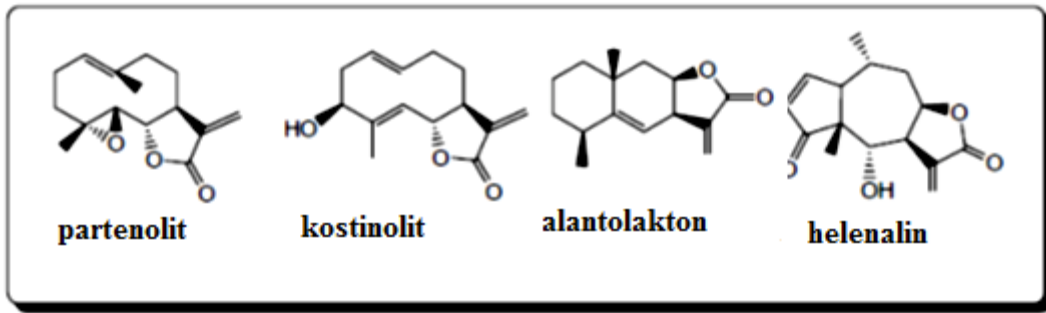


Şekil 1.5: Bazı sıtma önleyiciler seskiterpen laktonların yapıları.

1.2.1.4. Antiviral aktivite

Hepatit B virüsüne (HBV) karşı etkin ve güvenli aşı tedavisine rağmen, HBV ile viral enfeksiyon, dünyada, özellikle de üçüncü dünyada küresel bir sağlık sorununun oluşmasına neden olmuştur. Dahası, HBV enfeksiyonuna karşı direkt antiviral tedavi henüz mükemmel bir şekilde geliştirilmediğinden, potansiyel kütüphaneden yeni anti HBV ajanları için ön bileşikleri keşfetmek önemlidir. Son zamanlarda hepatoblastoma HepG2 hücresinden türetilen, HBV ile aktarılan HepG2 2.2.15 hücresi (Romero vd. 2005) kullanılarak taramaya dayanan artemisinin ve artesunat'ın anti-HBV aktivitesi hakkında bir rapor oluşturulmuştur (Sells vd. 1987). Bu tarama yöntemi, yeni anti-HBV ilaçlarının değerlendirilmesi için ve HBV biyolojisinin birkaç aşamasını incelemek için *in vitro* bir modeli bildirilmiştir (Aberle vd. 2001). Artemisinin, artesunat ve geleneksel Çin tıbbi ilaçlardan saflaştırılmış çeşitli bileşikler, 21 gün süresince ilaç maruziyetinden sonra ($0.01-100 \mu\text{M}$) yüzey proteininin (HBsAg) ve HBV-DNA'nın ölçülmesiyle araştırılmıştır (Romero vd. 2005). Sonuç olarak, artesunat HAsAg sekresyonunu $2.3 \mu\text{M}$ IC_{50} ve $16 \mu\text{M}$ IC_{90} ile kuvvetli bir şekilde inhibe ederken, artemisinin hafif bir

inhibisyon aktivitesi olduğu görülmüştür. Viron üretimindeki arttırmayı değerlendirmek için, farklı tedaviler sırasında HepG2 2.2.15 kültür ortamına HBV-DNA salımı miktarı ölçüldü ve önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Buna ek olarak, artesunat için, konakçı hücredeki toksisite, ilaç konsantrasyonu 20 uM'de gösterilmiş ve HBV-DNA salınımının IC₅₀'sinden hesaplanan terapötik indeksin (TI) 40 olduğu belirlenmiştir. Lamivudin pozitif kontrol olarak TI değeri ile karşılaştırıldığında, artesunat değeri oldukça düşüktür, ancak daha fazla araştırma için makul değerde olduğu gösterilmiştir. Sonunda, artesunat, lamivudin ile kombinasyon tedavisinde denenmiştir. Her iki bileşik de birlikte 20 nM'lik konsantrasyonda birlikte uygulandığında hiçbir toksisite gözlenmemiştir, ancak HBsAg salımında sinerjik bir inhibisyon etkisi gösterilmiştir. Lamivudine dirençli HBV suşlarına karşı olası antiviral ajan olmanın, klinik tedavide sık karşılaşılan sorun olabileceği anlamına gelmediği bildirilmiştir (Efferth vd. 2002). Bu sonuç, daha önce insan sitomegalovirüsleri için bildirilen potansiyele oldukça benzerlik gösterdiği ortaya konulmuştur. Çeşitli seskiterpen laktonlarının anti-viral aktivitesi hepatit C virüsüne karşı bildirilmiştir (Şekil 1.6) (Kempema vd. 2015). Partenolid (10, EC₅₀=2.21 uM), kostunolit (EC₅₀=2.69 uM), dehidrokostür lakton (EC₅₀=3.08 uM), Helenalin (EC₅₀=1.25 uM), Alantolakton (EC₅₀=2.03 uM), Epoksi dihidrosantonin (EC₅₀=10 uM), artemisinin ve diğer iki konjuge lakton gibi bir dizi bileşik test etmişlerdir. Burada, en iyi anti-HCV etkinliği helenalin tarafından gösterildiğini bulmuşlardır.

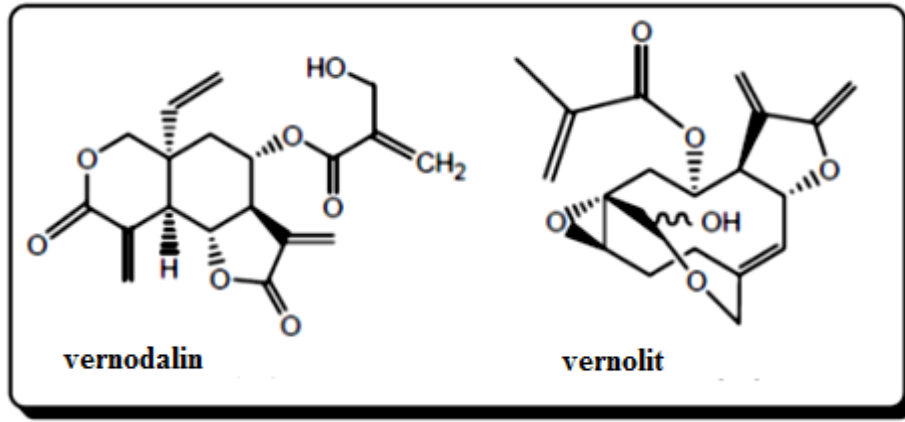


Şekil 1.6: Antiviral seskiterpen laktonlar.

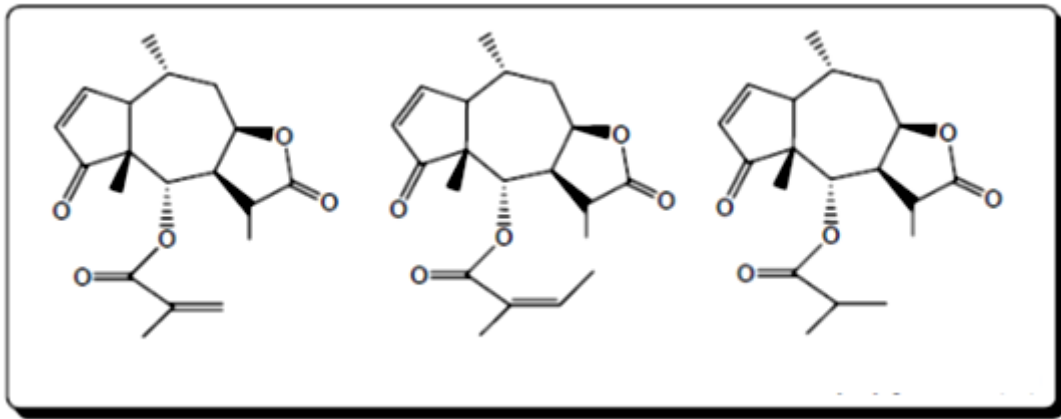
1.2.1.5. Antibakteriyel aktivite

Bazı SL'lerin antibakteriyel aktiviteyi uygulamada etkili olduğunu gösteren fazla miktarda kanıt bulunmuştur. Batı, orta ve güney Afrika'da bulunan bileşiklerin bir üyesi olan *Vernonia colorata*'nın öncelikle Gram pozitif türlere karşı antibakteriyel aktiviteye sahip ve Gram negatif türlere karşı daha düşük aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Musarrat vd. 2006). *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis*'e (Gram pozitif türler) ve *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*'ye (Gram-negatif türler) karşı SL'ler vernodalın, vernolid (Şekil 1.7) ve 11 β , 13-dihidroovernolid izole edilmiş ve etkili olduğu bulunmuştur. 11 β , 13-Dihidroovernolide, daha önce bir Vernonia türünün hiçbir zaman izole edilmemesinden dolayı yeni bir SL olduğu bildirilmiştir. Taranan bileşiklerin üçünün de Gram-negatif bakterilere karşı çok düşük önleyici etkisi gösterilmiştir. Bununla birlikte, *S. aureus* ve *B. subtilis* taranan tüm SL'lere karşı duyarlılık göstermiştir. 11 β , 13-dihidroovernolit yeni bir SL olmasına rağmen, 0.1-0.5 mg/mL arası minimum inhibe edici konsantrasyon (MIC) değerlerine sahip olan vernolid ve vernodalin kiyasla gram pozitif türlere karşı düşük aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Compositae'nin bir üyesi olan Centipeda minima'dan SL'lerin pseudoguaianolides sınıfına ait üç SL'leri izole, karakterize ve taramışlardır (Phytochemical Society of Europe. and Phytochemical Society of North America. 2003.). Bu bitki, soğuk algınlığı, öksürük ve sinüs enfeksiyonlarını tedavi etmek için Güneydoğu Asya'da kullanılmıştır. 6-O-metilakrililplenolin yeni (romatizmalı) olan üç SL, 6-O-metilakrililplenolin, 6-O-angeloilplenolin ve 6-O-izobutiroilplenolin izole edilmiştir (Şekil 1.8) *B. subtilis* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivite göstermişlerdir. Taranan SL'lerin üçünde de biyolojik olarak aktif olan 6-O-isobutyroilplenolin ile bakterilere karşı önemli etkinlik göstermiştir. Hem 6-O-izobutiroilplenolin hem de 6-O metil akrilplenolin, *B. subtilis*'e karşı 150 μ g / mL MIC değerini göstermiştir. 6-O-Angeloilplenolin, 300 μ g/mL'lik bir MIC ile daha az aktif olduğu araştırılmıştır. SL'lerin her üçü de *S. aureus*'un metisiline dirençli ve metisiline duyarlı olmayan suşlarına karşı aktivite göstermiştir. 6-O-izobutiroilplenolin ve 6-O metil akrilplenolin, metisiline dirençli *S. aureus*'a karşı 300 μ g/mL'lik bir MIC'e sahipken, 6-O-angeloilplenolin bu suşa karşı 600 μ g/mL'lik bir MIC ile daha az aktif olduğu bildirilmiştir. *S. aureus*'un metisiline duyarlı suşu açısından 6-O-metilakrililplenolin ve 6-O angeloilplenolin 75 μ g/mL MIC değerlerine sahipken, 6-O

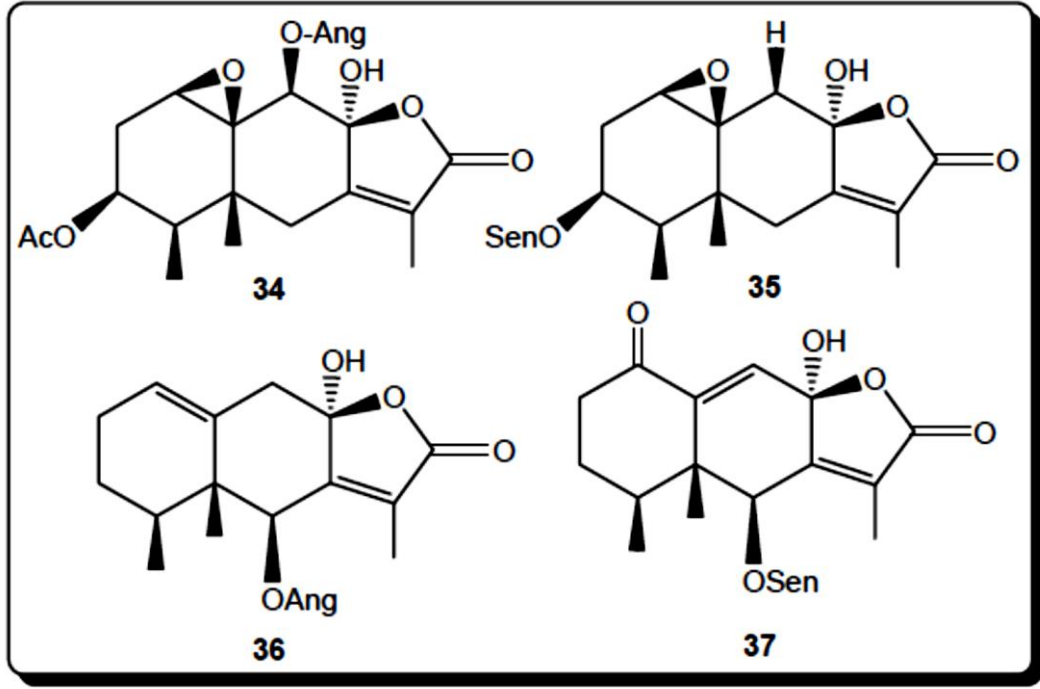
izobutiroilplenolin 38 µg/mL'lik bir MIC'e sahip olduğu belirtilmiştir; bu da bu SL'nin daha fazla olduğunu göstermiştir. Bitki yağlarında bulunan SL'lerin kullanım olasılığını artıran *Compositae*'nin yeni bir türü olan *Ligulariopsis shichuana* olarak bilinen bir bitki türü içinde dört yeni SL'yi keşfetmişlerdir (Wenshu vd. 2002). İzole edilen ve karakterize edilen dört SL sırasıyla (a) 3β-asetoksi-9β-angeloiloksi-1β, 10β-epoksi-8α-senecioiloksi-1β, (b) 10β-epoksi-8α-hidroksiöremofil-7-en-8β-Olid; (c) 6β-angeloiloksi-8α-hidroksiemofil-1,7-dien-8β-olit; ve (d) 1-okso-6p-senecioiloksi-8α-hidroksiememofil-7,9-dien-β-olit olarak belirlenmiştir (Şekil 1.9).



Şekil 1.7: Antibakteriyel seskiterpen laktonları

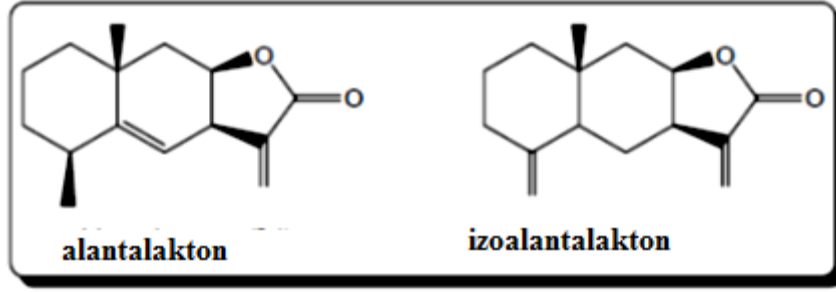


Şekil 1.8: Antibakteriyel seskiterpen laktonları



Şekil 1.9: Antibakteriyel seskiterpen laktonları

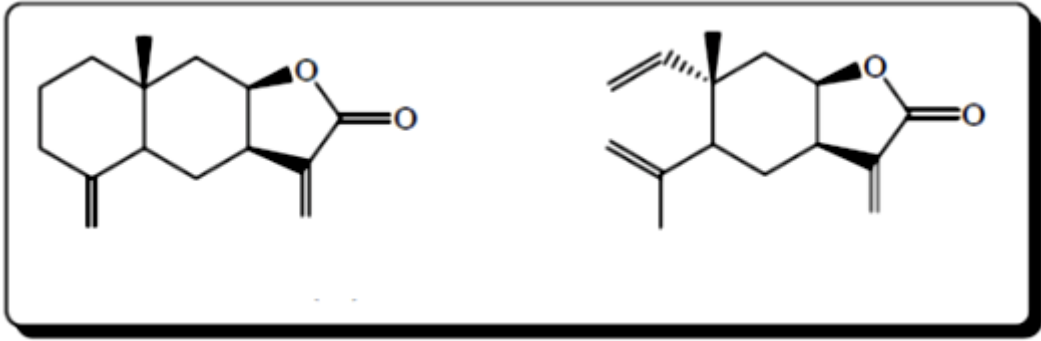
Son olarak, helenalin gibi diğer SL'lerin *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı inhibitör etki gösterdiğinin yanı sıra *Corynebacterium diphtheriae*'ye karşı aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Marles vd. 1995). Alantolakton ve izoalantolakton'dan oluşan bir karışım olan Helenalin, *Inula helenium* bitki türünden türetilmiştir (Şekil 1.10). Helenalin öncelikli olarak üriner sistem için antiseptik olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte, helenalin'nin hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteri gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir, bunlardan ilki daha fazla duyarlılık göstermiştir. SL içeren terapötik etken yağlar için bazı umutlar vardır. Klinik öncesi veriler, SL'lerin bakteriyel gelişimin azaltılmasında etkili olduğunu ve bunun SL'lerin hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriyel enfeksiyonların tıbbi tedavisinde potansiyel olarak kullanılabileceği fikrini güçlendirdiğini ortaya koymuştur (Arias vd. 1987).



Şekil 1.10: Antibakteriyel seskiterpen laktonları

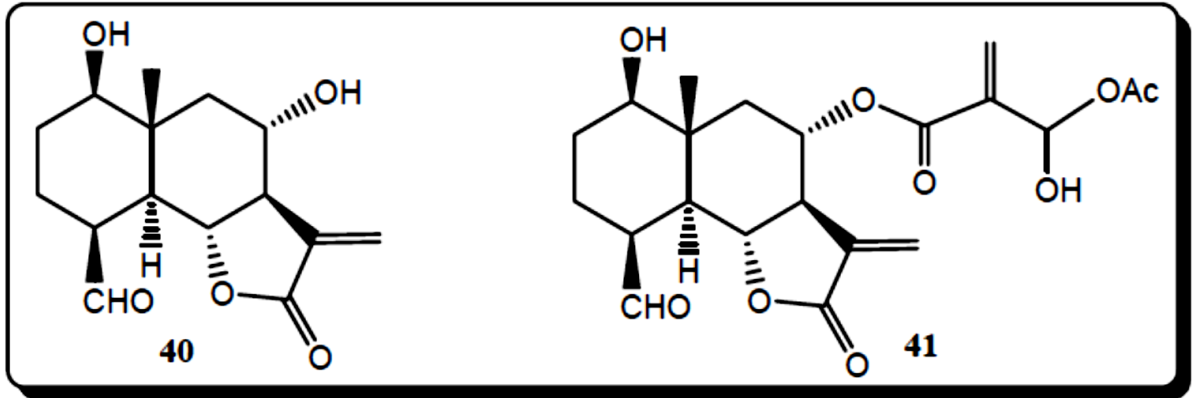
1.2.1.6. Antifungal aktivite

Uçucu yağlarda bulunan belirli SL'lerin antibakteriyel ajanlar gibi davranma potansiyeline sahip olduğunu destekleyen çok sayıda ampirik veri belirlenmiştir. Aynı zamanda bazı SL'lerin de antifungal aktivitelere sahip oldukları ve iki biyoaktif SL'yi sarı çiçekli çok yıllık bitki *Ratibida mexicana*'nın köklerinden izole edilmiş ve karakterize etmişlerdir. Bu bitki öncelikle Meksika'nın kuzeybatı kesimindeki Sierra Madre Occidental'de bulunmuştur (Bismoussa vd. 2015). Hint kabileleri, köklerin baş ağrısı, soğuk algınlığı ve romatizmayı hafifletmekte yararlı olduğunu bulmuşlardır. Bu bitkiden izole edilen iki SL, izoalolantolakton ve elema-1,3,11-trien-8,12 olit (Şekil 1.11) olarak belirlenmiştir. *In vitro* antifungal çalışmalarda, her iki SL'nin de *Helmintosporium*'un radyal büyümesini inhibe ettiğini ve her iki SL için de MIC'in 650 µg/mL olduğunu göstermiştir. *Pythium* büyümesi, 125 ug/mL MIC ile izoalolantolaktone karşı çok daha duyarlı olduğu ortaya konmuştur. *Fusarium* aynı zamanda izoalolantolakton ve elema-1,3,11-trien-8,12-oliteye karşı duyarlılık açısından taranmış, yine izoalolantolakton 200 µg/mL'de radyal büyümenin % 45'ini inhibe ederek yüksek oranda biyoaktiviteyi gösterdiği rapor edilmiştir.



Şekil 1.11: Seskiterpen laktonlarının anti fungal aktivitesi

Akdeniz bölgesi halk tıbbında öncelikli olarak kullanılan bitkiler *Centaurea thessala* türü *drakiensis* ve *C. attica* türlerini havadan parçalanarak iki yeni eudesmanolid izole edilmiştir (Skaltsa vd. 2000). İzole edilen iki yeni eudesmanolid 8α -hidroksi-4-episonchukarpolidin 8α -hidroksi-4-epi-sonchukarpolid ve 8α - (4-asetoksi-3-hidroksi-2-metilenbutanoiloksi) türevi 40-asetoksimalasitanolid olarak belirlenmiştir (Şekil 1.12).



Şekil 1.12: Seskiterpen laktonlarının anti fungal aktivitesi

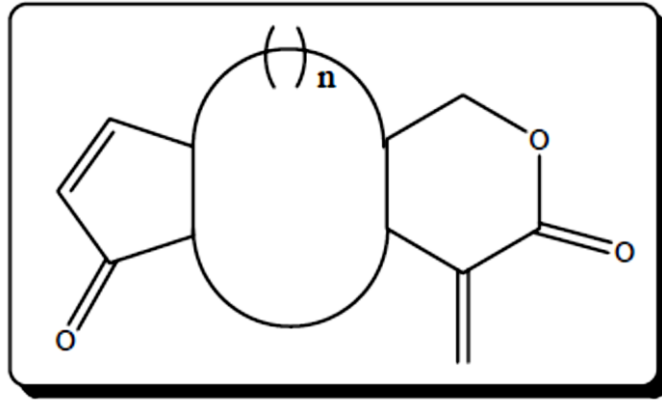
Çeşitli fungal türler, 8α -hidroksi-4-epi-sonchukarpolide ve 40-acetoxymalacitanolide karşı duyarlılık gösterdi (Skaltsa vd. 2000). 8α -Hidroksi-4-epi-sonchukarpolid, 4-asetoksimalalasilolid ile karşılaştırıldığında, bir tarla hariç, taranan tüm mantar türlerine karşı daha yüksek aktivite göstermiştir. 8α -hidroksi-4-epi sonchukarpolide için

MIC değerleri oldukça düşük bulunmuş ve bu bileşik için duyarlılığın çok daha yüksek olduğu gösterilmiştir. İstisnai olarak Cladosporium cladosporioidesın, 8a-hidroksi-4-epi-sonchukarpolid için MIC değeri 0.5 µg/mL iken bu tür 0.06 µg/mL'lik bir MIC değeri ile 40-asetoksimalasitanolide karşı daha yüksek hassasiyet göstermiştir. Buna ek olarak, her iki SL de Penicillium funiculosum'a karşı yüksek MIC'ler göstermiştir, bu iki SL arasındaki farklı türlere karşı engelleyici eylemlerinde herhangi bir farklılık göstermemiştir. Bu iki SL arasındaki aktiviteleredeki farklılıkların, bileşikler üzerinde bulunan farklı iskelet tiplerine ve fonksiyonel gruplara atfedilebileceği ne sürülmüştür. Son olarak, her iki SL'nin de daha büyük antifungal aktiviteye sahip olduğu, miconazole, ticari bir fungusid tarafından pozitif kontrol olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Skaltsa vd. 2000).

1.2.2. Seskiterpen laktonlarının yapısal aktivite ilişkileri (SAR)

Genel olarak, SL'lerin biyolojik aktivitelerine α -metilene- γ -laktonlar veya α , β -doymamış siklopentenonlar gibi nükleofillerin α , β - veya α , β , γ -doymamış karbonil yapıları alkilasyonu yoluyla aracı olduğu düşünülmüştür. Bu yapı elemanları, nükleofiller, özellikle de sistein sülfhidril grupları ile Michael tipi ilave ile reaksiyona girmiştir. Bu nedenle, proteinlerdeki sistein artıkları ve serbest hücre içi GSH gibi tiol gruplarının SL'lerin ana hedefleri olduğu yaygın olarak kabul edilmiştir. Özünde, SL'ler ve protein tiyol grupları veya GSH arasındaki etkileşim, enzim aktivitesinin azalmasına veya GSH metabolizmasının bozulmasına ve hayati derecede önemli hücre içi hücre redoks dengesine neden olduğu belirlenmiştir. SL'lerin kimyasal yapıları ve biyoaktivitesi arasındaki ilişki, özellikle sitotoksisite, anti-inflamatuvar ve antitümör aktivite açısından çeşitli sistemlerde incelenmiştir. Metilen grubuna doymuşluk veya ilave etme gibi yapısal değişiklikler sitotoksisite ve tümör inhibisyonu kaybına yol atığından lakton üzerindeki eksometilen grubunun sitotoksisite için şart olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, SL'lerin sitotoksisitesinden sorumlu faktörün, lakton veya siklopentenon'dan bağımsız olarak $O=C=C=CH_2$ sisteminin varlığı olabileceği de gösterilmiştir. İlave alkile edici grupların varlığının SL'lerin sitotoksisitesini büyük lde arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, *in vivo* anti-tümör aktivitesi için gerekli olan SL'lerde bulunan α -metilen- γ -laktonlar ve α , β -doymamış siklopentenon halkasının

(veya α -epoksisiklopentenon) bulunduğu tespit edilmiştir. Farklı yayınlanmış raporlar yoluyla, SL'lerin gösterdiği çeşitli biyolojik aktivitelerin, α -metilen- γ -laktonlar ve α , β -doymamış siklopentenon halkasının varlığından kaynaklandığı teyit edilmiştir. Özetle, bireysel SL'ler arasındaki etkinlik farklılıkları, alkilleyici elementlerin sayısı, lipofilisite, moleküler geometri ve hedef sülfhidril grubunun kimyasal ortamındaki farklılıklar ile açıklanmıştır (Skaltsa vd. 2000).



Şekil 1.13: Seskiterpen laktonların genel yapısı.

Seskiterpen laktonlar birçok şifalı bitki türünün önemli bir doğal ürün grubu olduğu belirtilmiştir. Antikanser, antiinflamatuvar, anti-tümör, anti-sıtma, antiviral, antibakteriyel, antifungal vb. Gibi yapısal çeşitlilik ve çeşitli potansiyel biyolojik aktiviteler, ilaç araştırması için kimyagerler arasında daha fazla ilgi uyandırmıştır. SL'lerin tam etki mekanizması bilinmemekle birlikte, çeşitli yayınlanmış raporlar vasıtasıyla, seskiterpen laktonlarının çoğunluğu tarafından görüntülenen biyolojik etkinliğin, α -metilen- γ -laktonlar ve α , β 'nin doymamış siklopentenon halkası varlığına bağlı olduğu belgelenmiştir (Skaltsa vd. 2000).

1.3. Alzheimer hastalığı

Biliş, işlev ve davranışta ilerleyici bozulma ile karakterize olan demansın küresel yaygınlığı, toplum üzerinde önemli bir yük oluşturmaktadır. Halen prevalansın 24 milyon olacağı tahmin edilmekte ve 2050 yılına kadar dört kat artacağı öngörülmektedir. Yalnız ABD'de demansın en sık nedeni olan Alzheimer hastalığı

(AD), tahmini sağlık bakım maliyetleri ile birlikte yıllık 172 milyar dolara ulaşacaktır (Thies vd. 2013).

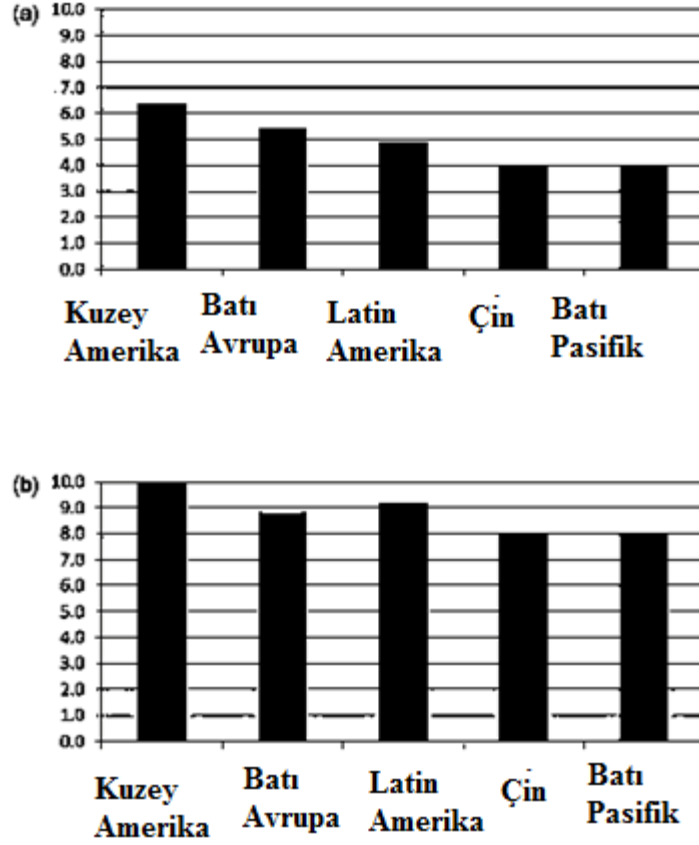
AD beyin dokusunda gözlenen temel patolojik değişiklikleri, diffüz ve nöritik plaklarda ekstraselüler olarak depolanan amiloid- β (A β) peptidi ve nörofibriller yumrular (NFT) olarak hücre içi biriken bir mikrotübül montaj proteini olan hiperfosforillenmiş tau (p-tau) proteindir. Ek değişiklikler arasında reaktif mikrogliyoz ve yaygın nöron, beyaz madde ve sinaps kaybı yer almaktadır. Bu değişikliklere yol ačan mekanizmalar belirlenmeye yönelik çalışmalar devam etmektedir (Thies vd. 2013).

1.3.1. Teşhis kriterleri

1984 yılındaki anlaşmadan bu yana, AD teşhisi için kilit sınıflandırma yöntemi "Ulusal Nörolojik ve Konuşsal Bozukluklar ve İnce Enstitüsü ve Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Bozukluklar Birliği (NINCDS-ADRDA)" kriterlerine göre yapılmaktadır (McKhann vd. 1984). Bu ölçütler, klinik ve nöropatolojik modelleri birleştirir ve "olası", "muhtemel" ve "kesin AD" gibi tanıları atar. AD spektrumu, daha önce düşünöldüğünden daha geniş olduğu ve amiloid plaklar ve NFT'ler dışındaki patolojik değişiklikleri içerdii kabul edilmektedir. Buna göre, NINCDS-ADRDA kriterleri tekrar gözden geçirilmektedir. Güncellenmiş kriterlere dahil edilen biyobelirteçlerin diagnostik özgülüğünü artırması beklenmektedir. 1999'da, normal biliş ve demans arasındaki ara durum "hafif bilişsel bozukluk (MCI)" olarak tanımlanmıştır. Özellikle klinik ortamda MCI, AD gelişme riski altında olan kişileri tanımlamak için yararlı bir etiket olduğunu kanıtlamıştır (Thies vd. 2013).

1.3.2. Yaygınlık oranları

2005 yılına gelindiğinde, dünya genelinde 24.2 milyon kişi demans yaşarken, her yıl 4.6 milyon yeni vaka ortaya çıkmaktadır. Bu vakaların yaklaşık %70'i AH'ye atfedilmiştir. 60 yaş grubundaki bölgesel nüfusta Kuzey Amerika ve Batı Avrupa'daki demansların en sık yaygınlık oranı hızının sergilendiği görülürken, bunları Latin Amerika ve Çin'den ve batı Pasifik komşularından izlemektedir (şekil 1.14) (Ferri vd. 2005). Tüm bu popölasyonlar için demans yaygınlık hızı yaşla birlikte katlanarak artarken, en belirgin artış yaşamın 70 ve 80'li yıllarında görölmektedir (Rocca vd. 2011; Schrijvers vd. 2012 Christensen vd. 2013; Matthews vd. 2013).



Şekil 1.14: a-Demans yaygınlığı (%), b- İnsidans oranları (Chaturvedi 2011'den modifiye edilerek kullanılmıştır)

1.3.3. AH'nın genetik epidemiyolojisi

Başlangıç yaşına dayanarak, AD tüm vakaların %1-5'ini oluşturan erken başlangıçlı AD (EOAD, başlangıç 65 yaş altı) ve geç başlangıçlı AD (LOAD, başlangıç ≥ 65 yıl) %95'lik bir oranda belirlenmiştir. Klinik olarak LOAD'ten ayırt edilemez olsa da, EOAD genellikle daha hızlı bir ilerleme hızı ve Mendel kalıtım kalıbıyla ilişkili olduğu göstermiştir. APP parçalanması ve A β üretimi ile ilgili proteinleri kodlayan üç gen (APP, PSEN1 ve PSEN2), EOAD patofizyolojisinde sıkı sıkıya bağlanmıştır. Bu üç genin AD'ye bağlı mutasyonları, yüksek penetrans (>% 85) gösterir, çoğunlukla otozomal dominant olarak kalıtsaldır ve A β agregasyonuna ve erken başlangıçlı

hastalığa kesin olarak yol açar. Sonuç olarak, bunlar hastalığın 'teşhis biyolojik belirteçleri olarak kabul edilmiştir.

Buna karşılık, LOAD ile ilgili genler hastalık riskini Mendel olmayan bir biçimde aktarmaktadır. LOAD olan hastaların birinci derece yakınları, AD etkilenmemiş birinci derece akraba olmayan kişilerin beklenen yaşam süresi riskinin iki katına sahip olduğu belirtilmektedir. Buna ek olarak, LOAD monozigotik dönemde dizyotik ikizlerden daha sık görülür ve bu bozukluğa ~%60-80 oranında önemli bir genetik katkıda bulunduğunu düşündürmektedir.

On yıldan fazla bir süredir, 19q13 kromozomunda yer alan sadece bir genetik risk faktörü olan APOEε4 alleli, Avrupa kökenli Hispanik olmayan Beyazlarda açıkça ortaya konmuş bir "duyarlılık" geni olarak bildirilmektedir. APOE, bir lipid bağlayıcı proteindir ve insanlarda üç allel, APOEε2, ε3 ve ε4 tarafından kodlanan üç ortak izoform olarak eksprese edilmektedir. Tek bir APOE-ε4 alleli 2-3 kat artmış risk ile ilişkilidir, iki kopyaya sahip olmak beş kat veya daha fazla artış ile ilişkilendirilmektedir (Kuusisto vd. 1994). Buna ek olarak, her kalıtsal APOEε4 alleli, başlangıç yaşını 6-7 yıl düşürmektedir (Breitner vd. 1994). APOEε4 ayrıca düşük bilişsel performans, özellikle bellek alanı ile ilişkilidir ve hafif kognitif bozukluk (MCI) ile ilişkilidir ve MCI'den demansa ilerleme ile birlikte belirlenmektedir (Barabash vd. 2009). APOEε4 için popülasyona atfedilebilir risk % 20-50 olarak tahmin edilmekle birlikte, ε4 varlığı hastalığın gelişimi için ne gerekli ne de yeterli değildir (Myers vd. 1996). İspanyol olmayan Beyazlar dışındaki etnik gruplarda APOE ve LOAD arasındaki ilişki çalışmalar arasında büyük ölçüde tutarsızlık göstermektedir (Slooter vd. 1998).

1.3.4. Genom çapında ilişkilendirme çalışmalarından elde edilen bulgular (GWAS)

Yüzyılın başında ek duyarlılık lokuslarını belirlemeyi amaçlayan binlerce aday-gen temelli ilişki çalışması gerçekleştirildi ancak APP'nin hücre içi ticaretinde rol oynayan yalnızca bir gen, sortilin ile ilgili reseptör (SORL1) tutarlı bir şekilde çoğaltılabildiği. Araştırmalar arasındaki bu tutarsızlıkların başlıca sebepleri, bağlantı dengesizliği (LD) kalıpları ve alel frekanslarındaki farklılıklarla birlikte örnek heterojenlik ve küçük örneklem büyüklükleri ile küçük veya orta derecedeki etki boyutlarını saptamak için sınırlı güç oluşturduğu belirtilmiştir. Son beş yılda, yüksek verimli genom dizilimindeki

teknolojik ilerlemeler, binlerce genetik polimorfizmlerin hipotezsiz eşzamanlı incelemesine izin vermiş ve bu teknolojiyi kullanan büyük uluslararası işbirliği çabaları, genetik 20'den fazla yeni tehlike lokusunu belirleyerek LOAD ve yolakların temelleri olarak belirlenmiştir.

İlk çalışmalar, duyarlılık lokusu olarak CLU, PICALM, CR1 ve BIN1'i tanımlanmıştır (Harold vd. 2009). CLU, aynı zamanda apolipoprotein J (ApoJ) olarak da bilinir, hem periferik hem de beyinde yüksek düzeyde eksprese edilen bir lipoproteindir (Nuutinen vd. 2009). ApoE gibi, lipid taşınmasında da görev almaktadır (Wollmer vd. 2007). Clu'nun ayrıca endositoz ile A β agregasyonu ve reseptör aracılı A β temizlemesini etkileyen bir hücre dışı şaperon gibi davranması öne sürülmüştür (Nuutinen vd. 2009). APOE'den farklı olarak, CLU ile gözlenen genetik ilişkiyi ortaya koyan bilinen kodlama varyantları bulunmamaktadır; bu, ekspresyon düzeylerinde genetik değişikliğin LOAD için değişen riskten sorumlu olabileceğini düşündürmektedir (DeMattos vd. 2004). BIN1 (amfifizin II), APP işlemeyi ve A β 'yı etkileyen aktin dinamikleri, hücre zarı trafiği ve kathrin yardımcı endositoz (Pant vd. 2009) da dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde yer alan Bin1/amfifizin/RVS167 (BAR) gen ailesi üyesidir. PICALM ayrıca, kathrin yardımcı endositozda yer alır ve vezikül topluluğu bölgelerine kathrin ve bağdaştırıcı protein kompleksini taşır (Tebar vd. 1999). CR1, tamamlayıcı sistemin bir parçası olan bir hücre yüzeyi reseptörüdür. Kompleman faktörleri C3b ve C4b için bağlanma alanlarına sahiptir ve bu iki proteini içeren bağışıklık komplekslerinin temizlenmesinde yer almaktadır. A β oligomerleri C3b'yi bağlayabildiğinden CR1, A β 'nın temizlenmesine katılabilmektedir. CR1, AD'de belirgin bir özellik olan nöroinflamasyonda da rol oynayabilmektedir (Crehan vd. 2012). İlginçtir ki, Clu bu süreçte bir inhibitör olarak rol oynayabilmektedir. Özetle, bu ilk GWAS seti, lokusları esas olarak bağışıklık yanıtı, APP işlemi ve lipid metabolizması ve endositoz olarak üç yolakta kümelendiği belirtilmektedir (McGeer vd. 1992).

İkinci büyük GWAS çalışmaları, ek duyarlılık genleri (CD33, MS4A4A/MS4A4E/MS4A6E kümesi, ABCA7, CD2AP ve EPHA1) tespit etmiştir (Hollingworth vd. 2011). İlk GWAS seti ile tanımlanan yolaklara uygun olarak, bu beş lokusun tümü muhtemelen bağışıklık sisteminde yer alırken, ABCA7 ayrıca lipid metabolizması ve APP işlemesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir. CD33 geni,

ekstraselüler sialillenmiş glikanlara bağlanan hücre yüzeyi bağışıklık reseptör ailesinin üyesi olan bir proteini kodlar ve imüno-reseptör tirozin baskılayıcı motif olarak adlandırılan bir sitoplazmik alan aracılığıyla sinyal verdiği bildirilmiştir (Cao and Crocker 2011). CD33 esas olarak periferik bağışıklık sisteminde çalışılmıştır ve burada miyeloid progenitörler ve monositler üzerinde ve ayrıca beyinde eksprese edilmiştir. Ortamda ki CD33, miyeloid hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği görülmüştür (Vitale vd. 1999). MS4A4A/MS4A4E/MS4A6E loküsü, kromozom 11 üzerinde 15 MS4A geni kümesinin bir parçasıdır ve başlangıçta, bir B-lenfosit hücre yüzey molekülü olan CD20'ye homologları ile tanımlanan çoklu membran kapsayan alanlara sahip proteinleri kodları rapor edilmiştir. Bununla birlikte, CD33 gibi, MS4A4A, miyeloid hücreler ve monositlerde eksprese edilir ve muhtemelen bağışıklık ile ilgili bir işleve sahip olduğu gösterilmiştir. EPHA1, hücre yapışması, migrasyonu ve akson yönlendirmesini ve sinaps oluşumunu ve esnekliğini modüle etmek için komşu hücreler üzerinde efrin ligandları ile etkileşen efrin hücre yüzey reseptör ailesinin bir üyesini kodladığı anlaşılmıştır. Ephrin reseptörlerinin genel olarak fonksiyonu üzerinde önemli bir araştırma cesedi bulunurken, EPHA1 gen ürünü hakkında çok az şey bilinmektedir. Diğer efrin reseptörleri gibi, hücre morfolojisini ve motilitesini de düzenler (Yamazaki vd. 2009) ve erken çalışmalar, bu reseptörün vasküler morfogenez ve anjiyogenezini düzenlenmesiyle ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Adams vd. 2000). EPHA1 nakavt farede anormal kuyruk ve üreme sistemi gelişimine neden olur, ancak beyinde hiçbir etkisi olmadığı gösterilmiştir (Duffy vd. 2008). Fare bu kavrama uygun olarak, ifade epitel dokusu ile sınırlıdır. İnsanlarda, EPHA1, CD4-pozitif T lenfositleri (Holen, Nustad, and Aasheim 2010), monositler (Sakamoto vd. 2011), bağırsak epiteli ve kolon tarafından eksprese edildiği bildirilmiştir. Beyin ekspresyonu için kanıt eksikliği ile birlikte, CD33, CR1 ve MS4A4/MS4A6E gibi, AD'deki EPHA1 gen ürününün rolü, bağışıklık sistemi aracılı olabildiği düşünülmüştür. CD2 ilişkili protein geni (CD2AP) doğrudan aktin (Lehtonen vd. 2002), nefrin ve sitoklonel organizasyonda yer alan diğer proteinleri bağlayan bir iskele proteinini kodladığı gösterilmiştir. Bağışıklık sisteminde CD2AP, klatrin bağımlı aktin polimerizasyonunu içeren bir süreçte sinaps oluşumu için gerekli olduğu anlaşılmıştır (Dustin vd. 1998). ABCA7, hücrelipid ve sarmal apolipoproteinler ile yüksek yoğunluklu lipoprotein biyogenezine aracılık eden ABC familyasına ait bütünleşik bir transmembran ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı olarak

bildirilmiştir. APOA-I'i bağlar ve apolipoprotein aracılı fosfolipid ve hücrelerden gelen kolesterol akışı işlevlerini yerine getirdiği gösterilmiştir (Chan vd. 2008). Buna ek olarak, ABCA7, amiloid öncü protein de dahil olmak üzere diğer önemli proteinlerin hücre zarı yoluyla taşınmasını etkiler ve apoptotik hücrelerin makrofajları tarafından fagositoz yoluyla konakçı savunmada yer almadığı rapor edilmiştir (Tanaka vd. 2011).

Son olarak, bugüne kadar Alzheimer Projesi Uluslararası Genomik (IGAP) tarafından gerçekleştirilen en büyük GWAS, dört bağımsız konsorsiyumdan olan Hispanik Dışı olmayan tüm veri kümelerini birleştirmiş ve 74.046 konuyu içeren bir mega metaanaliz gerçekleştirmiştir (Lambert vd. 2013). Bu GWAS, APOE, CR1, BIN1, CD2AP, EPHA1, CLU, MS4A6A, PICALM, ABCA7 ve CD33'e ek olarak, genom genişliği açısından (HLA-DRB5/HLA-DRB1, PTK2B, SORL1, SLC24A4/RIN3, DSG2, INPP5D, MEF2C, NME8, ZCWPW1, CELF1, FERMT2, CASS4) 12 ilave duyarlılık lokusunu ve p değeri $P = 7.4 \times 10^{-7}$ ve $p = 6.6 \times 10^{-8}$ (intergenik lokus, HS3ST1, SQSTM1, TREML2, NDUFAF6, ECHDC3, AP2A2, ADAMTS20, IGH, SPPL2A, TRIP4, SCIMP, ACE) olarak belirlenmiştir. Yukarıda tarif edildiği gibi, SORL1 (sortilin ile ilgili reseptör, L (DLR sınıfı) 1) daha önce bir aday gen yaklaşımında APP'nin ticareti ve işleyişini modüle ettiği gösterilmiştir (Rogaeva vd. 2007). CD33 ve DSG2 hariç, tüm lokuslar bir replikasyon aşamasında doğrulanabilmektedir. Keşif safhasındaki bu lokusun, tek bir SNP'ye dayandığı ve LD'deki herhangi bir SNP tarafından desteklenmediği için, omurgalı epitel hücrelerinde desmosomes'in desmozomların kalsiyum-bağlayıcı transmembran glikoprotein bileşeni olan desmoglein2 kodlamasının DSG2 kodlamasının başarısızlığa uğraması beklenmiştir. Genom çapında önemi olan 12 yeni lokusun, daha önceki GWAS tarafından tanımlanan spesifik yolaklardaki çoğu küme, yani bağışıklık yanıtı (HLA-DRB5/DRB1, INPP5D, MEF2C), APP işlemi (SORL1, CASS4), Tau patolojisi CASS4, FERMT2), hücre göçü (PTK2B) ve LOAD etyolojisinde bu yolakların önemini kuvvetle destekleyen lipid transportu ve endositoz (SORL1) olarak belirlenmiştir. Buna ek olarak, karmaşık bir hastalık hakkındaki fikriyle uyumlu olarak, bu çalışmanın bulguları, ilave yolların varlığını da ileri sürmüşlerdir. Bunlardan bir tanesi hipokampal sinaptik fonksiyon olabilir: MEF2C aktiviteye bağlı olarak sinaptik bağlanmanın iyileştirilmesi sırasında aşırı sinaps oluşumunu sınırlar ve bu nedenle hipokampusa bağlı öğrenme ve hafızayı kolaylaştırabildiği bildirilmiştir. Bu lokustaki mutasyonlar ve delesyonlar aynı zamanda

zihinsel gerilik, stereotipik hareketler, epilepsi ve serebral malformasyon ile ilişkilendirilmiştir. PTK2B tarafından kodlanan protein, anıların oluşumunda merkezi bir süreç olan hipokampal CA1 (cornu amonyak 1) bölgesindeki uzun süreli potensiyasyonun indüksiyonunda yer aldığı anlaşılmıştır. Bununla birlikte, bu lokuslardaki en güçlü iki SNP'nin LD'de olmadığı ve bu lokuslar arasında bir rekombinasyon sıcak noktası olduğu gerçeği, her iki dernekten de bağımsız olduğunu düşündürmüştür. CELF1, NME8 ve CASS4 sinyallerinin önerdiği bir başka yol, sitoskelet fonksiyonu ve aksonal transport olabildiği gösterilmiştir (Akhtar vd. 2012).

Avrupa kökenli olmayan Hispanik Beyazlılarda yapılan bu GWAS'de, APOE dışındaki her lokustaki en güçlü SNP'ler, etki büyüklükleri 1.16'dan 1.20'ye kadar değişen oranlarda % 1.0 ve % 8.0 aralığında nüfusa atfedilebilir kesirler (PAF) göstermiştir (Farrer 1997). Karayipler'de bugüne kadar yapılmış en büyük GSA Hispanikler (J. H. Lee vd. 2011) CLU, PICALM ve BIN1'deki dernekler çoğaltılmış ve 2p25.1, 3q25.2, 7p21.1 ve 10q23.1'de birkaç ilave lokus yer almıştır. Geç başlangıçlı Alzheimer Hastalığı Yaşam Üzerine Ulusal Enstitü'nden (NIA-LOAD) Avrupa kökenli olmayan Hispanik Beyazlıların bağımsız bir grubu gözlenmiştir. Kafkasyalılardaki tüm GWAS lokuslarının aksine, ABCA7 lokusu Afrikalı Amerikalılarda APOEε4'ünkinden daha güçlü bir etki boyutuna sahip olduğu gösterilmiştir. Afrikalı Amerikalılardaki bağımsız çalışmalar ve işlevsel yöntemlerle teyit edilmesi gerektiği, ancak bu bulgu gelişmekte olan ülkelerde önemli etkilere sahip olabildiği belirtilmiştir. Buna ek olarak, bu çalışma APOE'yi, bu etnik grupta, bu çalışmadan önce tutarlı olmayan bir duyarlılık geni olarak doğrulamıştır (Reitz vd. 2013).

1.3.5. Genetik Olmayan Riskler ve Koruyucu Faktörler

1.3.5.1. Serebrovasküler hastalık

Hemorajik infarktlar, küçük ve büyük iskemik kortikal infarktlar, vaskülopatlar ve beyaz madde değişiklikleri gibi serebrovasküler değişiklikler demans riskini artırır ancak spesifik altta yatan mekanizmalar belirsizliğini korumaktadır. Enfarktüs veya beyaz madde hiperintensileri, talamus ve talamo-korteks projeksiyonları gibi hafıza işlevinde önemli olan beyin bölgelerinin hasarına doğrudan yol açabilmektedir. Bununla birlikte, Aβ'nın çökmesini de artırabilirler, bu da bilişsel düşüşe neden olabilir veya

bilişsel fonksiyonu zayıflatan inflamatuvar yanıtları indükleyebilmektedir. Son olarak, hipoperfüzyon, sinaps oluşumu ve sinaptik plastisite için kritik olan bir serin-treonin kinazı olan siklin bağımlı kinazın (CDK5) aşırı eksprese edilmesine yol açabilmektedir (Wang vd. 2006). Aberrant CDK5 aktivasyonu nöronal apoptoz ve ölüm ile ilişkilidir (Sun vd. 2008). Bu kinaz, tau'nun anormal fosforilasyonunda yer alabilmekte, bu da NFT oluşumuna katkıda bulunabilmekte ve NFT patolojisini amiloid plaklarla bağlayan anahtar bir protein olabilmektedir (Wen vd. 2007).

1.3.5.2. Kan basıncı

Geç dönem yaşlarda ölçülen kan basıncı düzeyleri ile ilgili kognitif azalma, demans ile kesitsel çalışmalar ve uzunlamasına çalışmalardan elde edilen veriler tutarsız kalmaktadır (Elias vd. 2004). Bir ölçüde, bu görüşmeler, çalışma tasarımındaki farklılıklar, özellikle kan basıncının ölçümü ile kognitif yeteneklerin değerlendirilmesi arasındaki zaman farkı ve bu parametrelerin ölçüldüğü yaşa atfedilebilmektedir. Bununla birlikte, orta yaş grubundaki (40-60 yaş) yüksek kan basıncı seviyeleri ile geç yaştaki kognitif bozukluk arasındaki ilişkiyi araştıran gözlemsel çalışmaların verileri, gruplar arasında nispeten tutarlı olduğu kanıtlanmaktadır; bu, orta yaşta kan basıncının yükseldiğini göstermektedir ve daha yaşlı kognitif bozukluk, demans ve AD riskini artırmaktadır (Kivipelto vd. 2001).

Hipertansiyon, kan-beyin bariyerinin (BBB) vasküler bütünlüğünü etkileyerek AD riskini artırabilir ve böylece beyin dokusunda protein ekstrasvazasyonu meydana gelmektedir (Kalaria 2010). Protein ekstrasvazasyonu, hücre hasarına, nöronal veya sinaptik fonksiyonda bir azalmaya, apoptozise ve A β birikiminde bir artışa neden olarak bilişsel bozulmaya neden olabilmektedir (Deane, Wu, and Zlokovic 2004). Artan yaşla birlikte, yüksek kan basıncının AD riski üzerindeki etkisi azalır ve hatta tansiyonun yükselmesi ile koruyucu bir etki ortaya çıkarabilmektedir. Bu gözlem, AD başlamasını takiben, muhtemelen damar sertleşmesi, kilo kaybı ve kan akışının otonomik düzenlenmesindeki değişiklikler sonucu kan basıncının düşmeye başladığı gerçeği ile açıklanabilmektedir. Kognitif bozukluğu olan hastalarda antihipertansif tedavilerin yararını değerlendiren randomize, plasebo kontrollü çalışmalar (RCT) tutarsızlık göstermektedir (SHEP 1991).

1.3.5.3. Tip 2 diyabet

Gözlemsel çalışmalarda, tip 2 diyabetin (T2D) AD riskini yaklaşık iki katına çıkıdığı belirlenmiştir (Katon vd. 2015). T2D'yi ve LOAD'ı bağlayan mekanizmalar net değildir, ancak serebrovasküler ve non-serebrovasküler mekanizmaları içerebilmektedir (Luchsinger 2008). T2D, inme için bir risk faktörüdür ve buna hipertansiyon ve dislipidemi dahil diğer vasküler risk faktörleri eşlik etmektedir (Meschia vd. 2014). Patoloji çalışmalarında T2D'nin infarktlarla ilişkili olduğunu, ancak klinik LOAD'lı hastalarda AD patolojisi ile ilişkili olmadığı çalışmalarında bildirilen bulgular, bilişsel bozukluğa neden olması için gerekli olan amiloidin direncini düşüren infarktörlerin varlığının, T2D yüklemeye bağlı olduğunu belirtmektedir (Arvanitakis vd. 2006).

Potansiyel olarak T2D'yi ve LOAD'ı bağlayan serebrovasküler mekanizmalar, hiperinsülinemi ve ileri glikozilasyon ürünleri içermektedir. Hiperinsülinemi T2D'den önce gelmektedir ve buna eşlik edebilmektedir (Festa vd. 2006). İnsülin kan-beyin bariyerini geçebilir ve yaşlı insanlardaki periferik insülin infüzyonu beyindeki A β temizlenmesinin vekil bir işareti olan BOS'daki 42 amino asit β -amiloid (A β 42) düzeylerini ve dolaylı belirteçlerini artırmaktadır (Watson vd. 2003). Beyinde, hipokampus ve entorinal korteks de dahil olmak üzere LOAD'ın erken döneminde etkilenen yapılar olan insülin reseptörleri vardır. İnsülin degrade edici enzim (IDE), beyindeki A β temizlenmesiyle bağlantılıdır ve insülin ve A β , IDE için birbiriyle rekabet eden substratlardır (Farris vd. 2003). Beyindeki insülin LOAD patogenezinde merkezi olan A β ve tau protein fosforilasyonunun artmasını arttırabilmektedir. Periferik hiperinsülinemi, fizyolojik seviyelerde doymuşluğa bağlı olarak kan-beyin bariyerindeki insülin alımını aşağıya çekebilmektedir. Bu beyin insülin düzeylerinin düşürülmesine ve IDE ekspresyonunun downregülasyonuna ve IDE aracılı amiloid redüksiyonunda azalmaya neden olabilmektedir. Bu gözlem, LOAD tedavisinde rosiglitazon, insülin sensitizörü ve intranazal insülinin kullanımını desteklemek için kullanılmıştır. T2D ortamında, diyabetik hayvan ve insan dokuları, glikosilasyonun artmış gelişmiş ürünleri ve reseptörlerinin upregülasyonu içermektedir (Park 2001).

1.3.5.4. Vücut ağırlığı

Prospektif çalışmalar hem düşük hem de yüksek vücut ağırlığını artan bilişsel bozukluk ve AD riskiyle ilişkilendirmiş ve vücut ağırlığının ölçülme yaşına bağlı ve merkezi tarafından yönlendirilen bir U şekli ilişkisi olduğunu öne sürmektedir (Whitmer vd. 2008). Buna ek olarak, demansın prodromal fazında malnutrisyona bağlı olarak vücut ağırlığının kaybetmesine bağlı demans başlangıcından önceki yıllarda ters nedenselliğe ilişkin kanıtlar bulunmaktadır (Gustafson vd. 2009).

1.3.5.5. Plazma lipid seviyeleri

Son dönemdeki dislipidemi ile bilişsel bozukluk ya da AD ile ilgili en kesitsel çalışmalar ve gözlemsel çalışmalar tutarsızdır, orta yaş grubunda ölçülen lipidler ile AD riski arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar çoğunlukla zararlı bir etkiye işaret etmektedir. Bu bulgular, apolipoprotein E (APOE), apolipoprotein J (APOJ, CLU), ATP bağlayıcı kaset alt ailesi A üyesi 7 (ABCA7) ve sortilin ile ilgili reseptör (SORL1)'de dahil olmak üzere AD duyarlılık genleri olarak kolesterol metabolizması veya taşınmasıyla ilişkili birkaç geni açıkça tanımlayan genetik bağlantı ve ilişki çalışmaları tarafından desteklenmektedir. Fonksiyonel hücre biyolojisi çalışmaları, A β prekürsör protein işleminin β -sekretaz ve γ -sekretaz ile modülasyonunda lipid sal kolesterolünün kritik bir rol oynadığını destekler ve A β üretiminde değişikliklere neden olmaktadır. Bununla birlikte, çelişkili kanıtlar, dislipidemi ve AD riski arasında hiçbir veya tartışmalı bir ilişki olmadığını gösteren, statin tedavisinin faydalı bir etkisini gözlemeyen randomize klinik araştırmalar ve dolaşımdaki ve beyin kolesterolü arasında çok az değiş tokuş bulunduğunu düşündüren epidemiyolojik çalışmalarla ortaya çıkmaktadır; bu, artmış membran kolesterolü amiloid sitotoksosite yoluyla zar bütünlüğünü kısıtlayarak koruyucu olduğu ve hücrel kolesterolün, non-membran alanlardaki β -sekretaz 1 ve A β öncü proteininin kolokalizasyonunu inhibe ettiği ve böylece bir A β -bozunum enzimi olan plazminin üretilmesinin arttığını göstermektedir (Kuo vd. 1998).

1.3.5.6. Metabolik sendrom

Çeşitli çalışmalar, bir bütün olarak metabolik sendrom ile AD veya bilişsel düşüş riski arasındaki ilişkiyi değerlendirmiştir. Bu araştırmaların çoğu, bu sendromun varlığı ile

bilişsel işlev bozukluğu arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir (Raffaitin vd. 2009).

1.3.5.7. Sigara tüketimi

Durum kontrol çalışmaları, sigara içilmesinin AD riskini düşürdüğünü (Ferini-Strambi vd. 1990) öne sürmüştür, bununla birlikte prospektif çalışmalar sigara içilmesinin bu riski artırdığını veya bu hastalığın gelişme olasılığını etkilemediğini göstermiştir. Tütün endüstrisi üyeliğini hesaplarken sigara içimi ile AD arasındaki ilişkiyi inceleyen bir meta-analiz, endüstriye bağlı olmayan 18 kesitsel çalışmanın birleşik sonuçlarının hiçbir ilişki sağlamadığını ortaya koymuştur (Cataldo vd. 2010). Tersine, tütün endüstrisi üyeliğiyle ilgili sekiz kesitsel araştırmadan elde edilen veriler, sigaranın AH'ye karşı negatif etkisini öne sürmüştür. Tütün endüstrisi üyesi olmayan on dört grup çalışması AD ile sigara içme riskinde anlamlı bir artış sağlamıştır. Sigara, birkaç mekanizma ile AD riskini etkileyebilmektedir. Yüksek oksidatif strese neden olan serbest radikallerin oluşumunu artırabilir veya inflamatuvar immün sistemi etkileyebilmekte, bu da fagositlerin aktivasyonuna ve daha ileri oksidatif hasara neden olabildiği bildirilmiştir. İkincisi, serebrovasküler hastalığı teşvik ederek AD riskini etkileyebilmektedir. Bununla birlikte, nikotinin nikotinic asetilkolin reseptörlerinde (nAChR) artışı indüklediğini ve böylece AD'de kolinerjik defisitlere yol açan nAChR kaybını dengelediğini düşündüren bir koruyucu etki için kanıt gösterilmiştir (Traber vd. 2000)

1.3.5.8. Travmatik beyin hasarı

Retrospektif çalışmalar (Mayeux vd. 1995), travmatik beyin hasarı geçmişi (TBI) olan bireylerin olmayan kişilerden daha fazla demans riski taşıdıklarını önermektedir. İki meta-analizde (Fleminger 2003) TBI'lı hastalardaki demans riski erkeklerde kadınlardan daha yüksek olduğu öne sürülmektedir. TBI ile AD arasındaki ilişkiyi araştıran prospektif çalışmalar tutarsız (Plassman vd. 2000) olarak ortaya çıkarken, postmortem ve deneysel çalışmalar bu koşullar arasındaki bağlantıyı desteklemektedir (Hartman vd. 2002). İnsan beyin hasarından sonra beyin dokusunda A β patolojisinin ve tau patolojisinin yaygınlığı, beyin omurilik sıvısı (CSF) A β düzeyleri artmakta ve APP aşırı üretilmektedir (Franz vd. 2003).

1.3.6. Genetik olmayan koruyucu faktörler

1.3.6.1. Diyet

Tekli doymamış yağın ana kaynağı olan zeytinyağı, kırmızı et ve kümes hayvanlarının düşük bir alımı bitki gıdaları ve balıkların yüksek bir miktarda alınması ile vasküler komorbidite (Scarmeas vd. 2009) düzeylerinden bağımsız olarak AD ve MCI insidansında azalma (Scarmeas vd. 2006) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Balık, meyve ve sebzelerde yüksek diyetler antioksidan ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFAs) bakımından yüksektir. Reaktif oksijen türleri, AD'deki nöronal hasarla açıkça ilişkilidir, ancak bu birliktelik nörotoksik süreçte birincil veya ikincil bir olay olup olmadığı konusunda netlik kazanmamıştır. A β birikimi, serebral demir ve bakır konsantrasyonlarında bir düşüşe neden olur, oksidatif stres ve nöronal hasarla sonuçlanmaktadır (Nagano vd. 2004). İn vitro çalışmalar E vitamininin A β ile ilişkili lipid peroksidasyonunu ve apoptozu azalttığını göstermektedir (Butterfield vd. 2002). Buna ek olarak, karotenler ve vitamin C, lipid peroksidasyonuna karşı korur (Bateman vd. 2011) ve vitamin C, nitrosaminlerin oluşumunu azalmış ve katekolamin sentezini etkileyebilmiştir (Tannenbaum 1989). Antioksidan alımının serebrovasküler hastalık riskini azaltarak AD riskini azalttığı da mümkündür (Voko vd. 2003). Oksidatif stresin azaltılmasının yanı sıra, PUFA'lar nöronal ve vasküler fonksiyonlar ve inflamatuvar süreçler üzerinde olumlu etkilere sahiptir (Calder vd. 2002). E ve C vitaminlerinin ya da PUFA'ların etkisini tek tek değerlendiren gözlemsel popülasyon temelli çalışmalar sonuçsuz kalmıştır (Engelhart vd. 2002) ve antioksidan veya PUFA takviyesi etkilerini inceleyen çoğu RKC, bilişsel performans ile hiçbir ilişki bulamamıştır (Kang vd. 2015).

1.3.6.2. Fiziksel aktivite

Epidemiyolojik ve deneysel veriler, fiziksel egzersizin beyin sağlığını geliştirebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, çelişkili sonuçlar, egzersiz düzeyleri ile bilişsel düşüş veya bunama arasındaki ilişkiyi inceleyen kesitsel ve uzunlamasına gözlemsel çalışmalardan ortaya çıkmıştır: Bazı çalışmalar fiziksel aktivitenin beyin sağlığı üzerinde yararlı bir etkiye sahip olduğunu belirtmişken, diğer çalışmalar da değişkenler arasındaki ilişki gösterilmiştir (Abbott 2004). Sağlıklı yaşlı bireylerde egzersizin bilişsel işlev üzerine etkisini araştıran çalışmalar çelişkili sonuçlar vermiştir

(Emery vd. 1998). Fiziksel aktivite, serebral kan akışında, oksijen ekstraksiyonunda ve glikoz kullanımında artış ile kılcal yoğunlukta bir artış gibi yapısal beyin değişikliklerini teşvik eden büyüme faktörlerinin aktivasyonu yoluyla kogniteyi etkileyebilmektedir. Buna ek olarak, kemirgen çalışmaları fiziksel aktivitenin amiloid plak oluşum hızını azalttığını göstermiştir (Dishman vd. 2006).

1.3.6.3. Zihinsel aktiviteler

Sonraki ileriye dönük prospektif çalışmalar, öğrenme, okuma veya oyun oynamak gibi bilişsel olarak teşvik edici etkinlikler yapan genç ve (Carlson vd. 2008) ileri yaştaki kişilerin demans geliştirmesi olasılığı daha düşüktür. Bununla birlikte, bilişsel eğitimin faydası alana özgü ve hafıza zayıflığı olmayan kişilerde daha belirgin gözükmemektedir (Carlson vd. 2008).

1.3.7. Biyobelirteçler

Biyolojik belirteçler, hastalık riskinin belirlenmesinde yararlıdır, bunun yanında bir tanı kurulmasında da çok değerlidir. Otozomal dominant olarak kalıtsal mutasyonlar hastalığın belirteçleri iken, tanımlanmış olan kan ve beyin görüntüleme ile ilgili çeşitli ölçümleri içeren ek biyolojik belirteçler, sadece tanı spesifikliğini arttırmaya katkıda bulunur.

1.3.7.1. Plazma biyolojik belirteçleri

AD'in plazma biyobelirteçleri, BBB'yi geçebilen taşıyıcılar tarafından taşınan küçük veya lipofilik proteinleri ve proteinleri içermektedir. Fizyolojik koşullar altında beyinde A β 'nin üretimi ve depolanması ile trombositlerle çevresel üretimi dengeleyen dengeli bir beyin A β seviyesi bulunmaktadır. Sonuç olarak, bilişsel olarak sağlıklı bireylerde, beyin A β seviyeleri, plazma A β konsantrasyonlarına göre yansıtılır. A β 'nin amiloid plaklara bırakıldığı demans hastalarında beyin ve plazma A β seviyeleri arasındaki ilişki açık değildir. Ailesel AD (Jankowsky vd. 2004) ve APP üçlüsüzlü Down sendromu (Schupf vd. 2001), plazmada toplam A β seviyeleri ve A β 1-42 seviyeleri yükselmektedir. Sporadik AD'de, bir risk biyolojik belirteç olarak plazma A β 'nin kullanılabilirliğini araştıran çalışmalar tartışmalara neden olmaktadır, muhtemelen çalışmalarda örnek toplanmasının zamanlamasındaki değişkenlik, A β 'yi saptamak için farklı antikorların kullanımı ve plazma A β 'nin doğrulamasının eksikliği AD için bir risk

biyolojik belirteç olarak kullanılmaktadır. Artan plazma A β 1-42'nin sporadik AD için öncül bir risk faktörü olduğu kanıtları vardır; buna karşın azalma seviyeleri veya A β 1-42/A β 1-40 oranında bir düşüş hastalık başlangıcı belirtmektedir. C-reaktif protein, IL-1 β , TNF, IL-6 ve dönüştürücü büyüme faktörü β içeren kolesterol, homosistein veya iltihap ile ilişkili proteinler gibi AD riski için plazma biyobelirteçleri olarak araştırılan diğer bazı moleküller çalışmalar arasında tutarsızlık göstermektedir (Mayeux vd. 1999).

1.3.7.2. Beyin omurilik sıvısı (BOS) biyobelirteçleri

Proteinlerin beyin ve BOS arasında serbest taşınması nedeniyle, A β 1-42, BOS'daki toplam tau (t-tau) ve p-tau seviyeleri beynin metabolik süreçlerini yansıtır ve doğru tanısına yardımcı olmak için kullanılabilmiştir. Hastalığın erken evresinde MCI veya AD'de A β 1-42'nin BOS düzeyleri, bilişsel olarak normal bireylere göre t-tau veya p-tau artırıldığında azalmıştır (Mattsson vd. 2009). A β 1-37, A β 1-38, A β 1-39, A β 1-40 ve A β 1-42 kombine değerlendirilmesi ilerlemeyi MCI'dan AD'ye tahmin etmede duyarlılığı ve spesifikliğı daha da arttırabilmiştir (Portelius vd. 2006). BOS biyobelirteçleri ile biriken amiloid konsantrasyonları (plaklarda) ve beyindeki NFT'ler arasındaki ilişki belirsizliğini korumuştur. Amiloid plaklarda A β birikiminin beyinde ve BOS'ta çözünür A β 'nin azalmasına neden olabileceğı önerilmiştir (Fagan vd. 2006). Önceki çalışmalar, AD'li kişilerde p-tau BOS düzeyleri ile NFT konsantrasyonu arasında pozitif bir korelasyon olduğunu önermiştir (Buerger vd. 2006), ancak diğer çalışmalar bu korelasyonları gözlemlememiştir (Buerger vd. 2003). Çalışmalar arasındaki tutarsızlıkların nedenleri, BOS tau veya A β düzeylerini etkileyen faktörlerde farklılıklar olabilir. Örneğin, bir APOE ϵ 4 alleli veya daha yüksek yaş taşımak, beyinde A β 1-42'nin ve BOS'un daha düşük A β 1-42 seviyelerinin çöküşünü hızlandırmaktadır (Fukumoto vd. 2003). Dahası, BOS APOE düzeyleri, bilişsel bozukluğu olan hastalarda t-tau ve 24S-hidroksikolesterol (24S-OHC) CSF düzeyleri ile pozitif korelasyon göstermiştir (Fukumoto vd. 2003). Klinik öncesi AD için biyolojik belirteçleri araştıran 14 çalışmanın geniş ölçekli bir meta-analizi, A β 1-42, t-tau ve p-tau'nun duyarlılığı düşüktür (etki büyüklükleri: 0.91-1.11). Birkaç ek BOS biyobelirteçleri araştırılmıştır ancak çalışmalar süresince tutarsızdırlar ve prediktif değeri açıklığa kavuşturulmamıştır (Leon vd. 2007).

1.3.7.3. Biyolojik belirteçleri görüntüleme

1.3.7.3.1. Yapısal MR

Yapısal MR görüntüsünde, LOAD, hipokampus ve amigdala'da spesifik medial temporal lobda atrofi ile karakterizedir. EOAD'da beyin atrofisi daha posterior olarak yayılabilir ve posterior korteks, oksipital loblar, posterior cingulate ve precuneus da olabilmektedir. Hipokampus ve entorinal kortekste atrofi, hafıza işlevinde bir azalma, hafıza bozukluğunun progresyonu ve artmış AD riski (Apostolova vd. 2006) ile ilişkilidir. Buna ek olarak, beyaz madde değişiklikleri görülebilmektedir. Bununla birlikte, bu değişikliklerden hiçbiri, çeşitli diğer nörodejeneratif bozukluklarda olduğu gibi normal yaşlanmada da ortaya çıkan AD'ye özgü olmadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, bazı çalışmalar, bazı yapısal MR biyobelirteçlerinin bir dereceye kadar ayırıcı tanı gücü bulunduğunu önermiştir. Amnestik MCI'lı hastalar arasında LOAD'a dönüşenler, hipokampusta ve alt ve orta temporal gri'de AD'e dönüşmeyenlere göre daha fazla atrofi gösterdiğine dair kanıt gösterilmiştir (Chételat vd. 2005). Ayrıca, korpus kallozumdaki atrofi (özellikle anterior bölge) AD'yi, posterior alanda daha fazla atrofi gösteren frontotemporal bunama ile ayırt etmeye yardımcı olabileceğine dair kanıtlar incelenmiştir (Josephs vd. 2004). Difüzyon tensörü görüntüleme (DTI), çürümemiş bireylere kıyasla, AD ve MCI kişilerin bazı beyin bölgelerindeki beyaz madde bütünlüğündeki azalmaları tanımlamayı sağlar ve bu değişiklikler hastalığın erken döneminde ortaya çıkarılmasını önermiştir. Bu düşünce ile uyumlu olarak, ailesel AD mutasyonlarının prelinik ve presemptomatik taşıyıcıları, taşıyıcı olmayanlara kıyasla beyaz cevherin bozulmasını artırdığı gözlenmiştir (Ringman vd. 2008). Arteriyel spin etiketleme (ASL) -MRI, fonksiyonel serebral perfüzyon defisitlerinin MR ile incelenmesine izin vermektedir. ASL-MRG çalışmaları AD hastalarında demansız kişilerle kıyaslandığında azalmış serebral kan akımı ortaya koymuştur, MCI'yı AD'den ayırt edebilir ve MCI'dan AD'ye ilerleyiş kognitif düşüşünü ve ilerlemesini öngörebilmiştir (Chao vd. 2005).

1.3.7.3.2. Fonksiyonel MR

Fonksiyonel MRG (fMRI) dinlenme sırasında nöronal aktiviteyi veya belirli beyin bölgelerini harekete geçiren bir görevi görselleştirmiştir. En yaygın kullanılan yöntem,

deoksihemoglobin konsantrasyonundaki değişikliklere (BOLD-fMRI) dayalı kan akımı değişikliklerini ölçmüştür (Sperling 2011). Birçok çalışma, AD'li kişilerin medial temporal lob, parietal lob ve hipokampal bölgelerde, bilişsel bir görev sırasında kontrollere kıyasla azalmış BOLD sinyali göstermiştir. Buna ek olarak, bazı çalışmalar, MCI ve sağlıklı kontrollere sahip hastalarda görevle ilişkili farklı nöronal aktivite modellerini gözlemiştir (Teipel vd. 2003).

AD beyinlerinin varsayılan modda ağında sağlıklı kontrollere kıyasla kesintiye neden olan bağlantı olduğu için, dinlenme durumu fMRI, AD'deki fonksiyonel bağlantı açıklarını araştırmak için kullanılabilmiştir. Çalışmalar, bu düşünce doğrultusunda istirahat fMRI'sinin AD'yi MCI ve MCI ile kontrollerden ayırt edebileceğini göstermiştir (Teipel vd. 2003). AD için risk altındaki bireylerde, görevle ilişkili fMRI'ye karşı dinlenme durumunun doğrudan karşılaştırılmasında, dinlenme varsayılan aę analizleri daha sağlam ve hassas veriler sağlamıştır (Fleisher vd. 2009). BOLD sinyalleri, çeşitli anatomik, fizyolojik ve görüntü parametrelerine bağımlıdır ve nitel veya yarı-analitik olarak yorumlanabilmiştir. Sonuç olarak, bireyler arası ve bireysel değişkenlik demans kaynaklı bozuklukların ayırıcı tanısında kullanımını sınırlamıştır. Bununla birlikte, fMRI'deki son gelişmeler insan beynindeki işlevsel ağların tanımlanmasına izin vermiştir. Nörodejeneratif bozuklukların erken evrelerinde kognitif-davranışsal fonksiyonun incelenmesi, bu hastalıklardan etkilenen nöroanatomik ağların tanımlanmasına izin verebilmiş ve bunamının altında yatan çeşitli bozuklukların ayırıcı tanısında yardımcı olabilmıştır. BOLD seviyeleri, farmakolojik fMRI çalışmalarında tedavi etkilerini değerlendirmek için de faydalı olabilmıştır. Birçok araştırmada asetilkolinesteraz inhibitörlerinin (AChEIs) uygulanmasından sonra görev performansı sırasında artmış beyin aktivasyonu gösterilmiştir. Yeni bir dinlenme durumu fMRI çalışması, hipokampusta AChE'nin indüklediği fonksiyonel bağlantıyı geliştiren, bilişsel düzelme ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Yeni terapötiklerle arttırılmış BOLD aktivasyonu, potansiyel etkinliği işaretleyebilmiştir (Goveas vd. 2011).

1.3.7.3.3. Pozitron emisyon tomografisi (PET) ve tek foton emisyon hesaplamalı tomografi (SPECT)

Demans için tanısal araç olarak PET ve tek foton emisyon CT (SPECT) yaygın olarak değerlendirilmektedir ve her iki teknikte de iyi tanısal ve prognostik özellikler göstermektedir. Amiloid, tau veya metabolik aktiviteyi hedefleyen birkaç pozitron emisyon tomografisi (PET) ligandları araştırılmaktadır. Hem amiloid plaklara hem de NFT'ye bağlandığı gösterilen erken bir radyo-traktör 2- [1- {6 - [(2- [F-18] fluoroetil) (metil) amino] -2-naftil} etiliden) malononitril (FDDNP) olarak kullanılmaktadır. FDDNP, hipokampus ve amigdala da dahil olmak üzere limbik bölgelerdeki protein agregalarını gözler önüne sermektedir (Braak vd. 1991) ve AD, MCI'lı ve kognitif bozuklukları olmayan kişiler arasındaki farklılıkları göstermektedir. Bununla birlikte, kortekste küçük sinyal farkları onun yararını azaltabilmektedir (Shin vd. 2011).

Geliştirilen ilk amiloid spesifik görüntüleme probu Pittsburgh B bileşeni (PIB) olduğu bildirilmektedir. PIB, kortikal ve striatal A β plağına selektif olarak bağlanır, otopside AD tanısı, fibriler amiloid plakları ile güçlü bir pozitif korelasyon göstermekte ve klinik AD varlığında BOS A β 42 seviyeleri ile ters korelasyon göstermektedir (Jagust vd. 2009). Bununla birlikte, bazı demansız bireylerde PIB'nin çok fazla tutulduğu (Rowe vd. 2007) ve uzunlamasına çalışmalar, bu tutmanın prelinik AD'yi temsil edip etmediğini açıklığa kavuşturmaya ihtiyaç duymaktadır. Florbetaben (18F-BAY94-9172) ve Florbetapir (18F AV-45), AD'yi benzer bağlanma profillerine sahip, fakat PIB'ye göre daha uzun yarı ömrü olan, güçlü duyarlılık ve özgüllük ile AD'leri kontroller ve diğer demanslardan ayıran yeni amiloid görüntüleme ajanları olduğu gösterilmektedir (Sheline vd. 2013).

18F-fluorodeoxyglucose (FDG) -PET görüntüleme ile ölçülen serebral metabolizma AD'de azalmaktadır. Sağlıklı kontrollere kıyasla MCI ve AD'de bölgesel (ör. Parietal) serebral glukoz metabolizmasının azaltılmış olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Arnaiz vd. 2001). FDG-PET önlemleri, bilişsel açıklarla güçlü şekilde ilişkilidir ve ayrıca MCI'dan AD'ye progresyonu tahmin edebilmektedir. Dementia tanısı için yüksek sensitivite (% 94), düşük özgüllüğü (% 73-78) vardır. FDG-PET ve ASL-MRG analizlerinin birleştirilmesi AD hastalarını kontrollerden tek başına her iki yöntemden daha etkin şekilde ayırt etmektedir (Dashjamts vd. 2011).

Son olarak, mikrogial aktivasyonunu gösteren moleküler görüntüleme problemleri, PET görüntüleme için geliştirilmiştir. Bu radyoligandların çoğu nöroinflamatuvar süreçleri yansıtan çevresel benzodiazepin reseptörü olarak da bilinen 18 kDa translokator proteinine (TSPO) bağlanmaktadır (Veenman and Gavish 2000). En sık kullanılan PET probu olan 11C- (R) -PK11195, AD'li ve MCI'lı hastalarda retansiyonu yaşlı olmayan demanslı bireylere göre daha fazla göstermektedir (Okello vd. 2009).

Son yıllarda AD'yi anlamada önemli ilerleme kaydedilmiştir. Özellikle genetik çalışmaların bulguları, APP metabolizması, immün yanıt, inflamasyon, lipid metabolizması ve hücre içi ticaret/endositoz gibi spesifik mekanik yolları işaret etmiştir. Onaylandıysa, bu bulgular genetik test, önleme ve tedavi için yeni yollar açma potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte, kazanılan bilgi klinik ortamda uygulanmadan önce birkaç hususa değinilmelidir. Birincisi, bilinen duyarlılık genlerinde ve henüz tanımlanmamış genlerde spesifik nedensel değişkenler haritası çizilmelidir. Günümüzde, YÜK ile ilişkili nedensel yaygın ve ender varyantları belirlemeyi amaçlayan büyük ölçekli bütün exome ve bütün genom sıralama çalışmaları devam etmektedir. Bu çabalar arasında beyazlar ve Karayipler İspanyolları bulunur ve bu çabayla tanımlanan varyantların işlevsel olarak teyit edilmesi gerekirken, bu çalışmalar bu etnik gruplardaki genetik risk faktörlerinin daha doğru bir şekilde anlaşılmasına, risk tahminlerinin hassaslaştırılmasına ve teşhis edilmesine izin verir ve bireysel etnik gruplara özgü tahmini test protokolleri oluşturmaktadır. İkincisi, bu ve diğerleri - henüz belirlenmemiş - yollar hastalıklara yol açan ve hangi yolların nasıl etkileşime girdiğini tam mekanizma aracılığıyla açıklığa kavuşturulmalıdır. Monoterapinin kompleks bir hastalığa yeterince etkili olması muhtemel değildir ve daha ayrıntılı bir risk profili, çok yönlü daha iyi bir girişim stratejisi için ipuçları sağlayacaktır. Üçüncüsü, etkili önleme ve tedavi stratejileri elde etmek için, hastalık sürecinin erken tanımlanması (klinik ifadesinden önce) geliştirilmelidir; Bu, teşhis rutinde AD biyolojik belirteçleri için standart işletim prosedürlerinin geliştirilmesini içermektedir. Bilişsel olarak normal fonksiyon veya MCI'dan AD'ye ilerlemenin muhtemel olacağı ve müdahalenin belirli bir patolojiyi ilerletmesini durduracağı açıkça tanımlanabilir riskli olanların etkili bir şekilde taranmasının esas olduğu belirtilmektedir.

1.4. Alzheimer hastalığı çalışmalarında kullanılan *in vitro* modeller

Alzheimer hastalığı (AD) genel anlamda zihinsel rahatsızlıkların %60'ını kapsamaktadır ve en önemli nörodejeneratif hastalıklardan biridir. Önlenemeyen, iyileştirilemeyen ve yavaşlatılmayan AD'dan dünya çapında milyonlarca insan zarar görmektedir. AH kronik bir nörodejeneratif hastalık olup ilk göstergesi genellikle kısa dönemli hafıza kaybıdır. Hastalık ilerledikçe birçok semptomda kendini gösterebilmektedir, örneğin olarak yön bulma zorluğu, motivasyon kaybı, ruh halinde değişimler, dil kullanmada sorunlar ve kendi bakımında zorlanmalar olabilir. Bu gibi rahatsızlıkların ilerlemesi sonucunda hastanın vücudu hayatsal fonksiyonlarını yerine getiremez olur ve hastalık ölümle sonuçlanmaktadır. Amerika gibi büyük ülkelerde AD engellemek için yapılan bilimsel çalışmalara yılda yaklaşık 1 trilyon dolar bütçe ayrılmaktadır. AD sürekli ilerleme gösteren nörodejeneratif bir hastalık olup, β -amyloid protein ($A\beta$) üretimi ve hiper-fosforlanmış Tau proteininin birikimi sonucunda; sinaptik bağların kopmasına ve nöronların büyük oranda ölmesine neden olmaktadır. World Health Organization (WHO)'un 2012 verilerine göre dünya çapında 35.6 milyon bireyde zihinsel rahatsızlık bulunmaktadır ve bu hastaların % 60-70'ini AD'leri oluşturmaktadır. Yapılan analizler göstermektedir ki 2030 yılına kadar bu sayı 65 milyona ulaşarak iki katına çıkacaktır. Bu sonuçlar göstermektedir ki AD bulunan kişilerin sayısı da bu rakamlara paralellik göstererek büyük oranda artacaktır (Zhang vd. 2010).

Alzheimer hastalığının (AD) oluşma nedenlerinin başında senile plaques (SPs), neurofibrillary tangles (NFTs) ve nörotransmitter sistemlerinin elemanlarını kaybetmesi gelmektedir. İlk olarak SP genel anlamda amiloid beta ($A\beta$) proteininin nöronlarda ve glial hücrelerde birikmesi sonucunda oluşmaktadır. $A\beta$ birikmesi, Amiloid prekürsor Protein (APP)'nin parçalanması sonucunda gerekli enzimlerin çalışmaması ve $A\beta$ 'yı metabolize edememesi durumunda ortaya çıkarmaktadır. Bu birikim sonucunda oksidatif stres, hücre zarında parçalanmalar, mitokondri metabolizmasında bozukluklar, hücre döngüsünde hatalar, protein katlanma hataları ve DNA hasarı gibi birçok durum meydana gelebilmektedir (Shen vd. 2006). NFTs hücre içerisinde sitoskeleton bölgelerinde biriken ve hatalı fosforlanmış tau proteinleri nedeniyle oluşmaktadır. Bu yumak yapıları nöronlarda farklı hücresel komponentlerin iletilmesini engelleyerek

dejenere olmuş hasarlı nöronlar oluştururlar ve sonucunda nöron hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır (Salehi vd. 2003).

Araştırmacılar çok fazla çaba ve maddi kaynak harcayarak AH'nı anlamaya ve bu hastalık için ilaç geliştirmeye yönelik çalışmalar yapmaktadırlar. Bu çalışmaların yapılabilmesi için birçok farklı *in vivo* ve *in vitro* model geliştirilmiştir. *In vitro* modelleri genellikle transgenik modeller, kanser hücre hatları (nöroblastoma ve pheochromocytoma hücreleri) veya birinci derece nöron kültürleri oluşturmaktadır. AH'ında başrol oynayan proteinler bu hastalık çalışmasında büyük öneme sahiptir ve bu çalışmalarda kök hücrelerinden faydalanma yoluna gidilerek human induced pluripotent stem cells (iPSCs) ve human embryonic stem cells (hESC) gibi kök hücrelerin çalışmalarda kullanılarak AH hücre ortamında canlandırılmasına olanak sağlanmaktadır (Cundiff vd. 2011; Yagi vd. 2011).

1.4.1. Güncel modeller

Alzheimer hastalığının (AH) *in vitro* ortamda canlandırılması için hastalığın nedenleri ve altında yatan mekanizmalar araştırılmaktadır. Bu metotların en başında sentetik amiloid beta peptidi gelmektedir, çünkü bu peptid Ah'da beyinde oluşan amiloid plaklarının temel kaynağıdır. Sentetik amiloid beta kullanımının yanında gen transfeksiyonu ile insertional susturma yapılarak hücrelerde AH canlandırılmaktadır. Bu iki metodun da kendine özgü avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Sentetik A β peptidi kullanılarak AH'ında olduğu gibi ortamda oksidatif stres oluşturulup ROS'ların oluşumu tetiklenebilmektedir. Fakat hücre dışı etkileşimle oluşturulan bu ortam hastalığın ileri düzeylerini kapsamamakla birlikte, AH'nın özelliklerini bütünüyle göstermemektedir. Bunun dışında gen modifikasyonlarıyla oluşturulan AH modelleri hücre içi ve hücre dışı hastalık özelliklerini taşımakla birlikte, hastalığın ileri seviyelerinde ki koşullarını sağlamaktadır. Bu modellerin risklerini ise modifikasyona uğratılmak istenilen genlerde mutasyonların gerçekleştirilmesi çok zaman ve zahmet gerektirmektedir. Bunun yanında çalışmaların sonunda transfeksiyonun gerçekleştirilmesinin garantisi yoktur. A β proteinin birkaç farklı isoformu bulunmaktadır ve 42 amino asitten oluşmaktadır. A β 1-42 amyloid plaklarının oluşturan temel kaynaktır fakat bunun dışında A β 1-40 ve A β 25-35 gibi formlarıda bulunmaktadır ve bu formlar hücrede oksidatif stres ve nörokoruma gibi çalışmalarda

kullanılmaktadır. Bunun yanında A β 1-42 sıçanlarda kortikal nöronlar üzerinde ve SH-SY5Y nöroblastom hücre hattı üzerinde çalışılmış ve reactive oxygen species (ROS)'lerde artış, mitokondri çalışma bozuklukları, apoptosis ve nöronal disfonksiyona sebep olduğu görülmüştür. Bu özellikler AH ile örtüşmekle birlikte ileri düzeyde ki AH özelliklerini ve ilerlemesini yansıtmamaktadır (Moreira vd. 2005). Sentetik A β hücre kültürü üzerinde kullanılmasının dışında, hücrelere transfeksiyon yoluyla yapılan mutasyonlarla elde edilen *in vitro* AH modelleri de bulunmaktadır. AH ile alakalı birçok gen bulunmaktadır ve bu genlerin başında Presenilin 1 (*PSEN1*) ve presenilin 2 (*PSEN2*) gelmektedir. Bu genlerin mutasyonu sonucunda hücre içi ve dışında A β (1-42) proteininin birikmesi gözlenmiştir. Bununla beraber APP geninin transfeksiyonu ve overekspresyonu ile *in vitro* AH modeli oluşturulmuştur. Ayrıca down sendromlu hastadan elde edilen fibroblast hücreleri tekrar programlanarak induced pluripotent kök hücreleri elde edilmiş ve bu hücreler APP geninden 3 kopya taşıdığından AH modeli oluşturulmuştur. APP ve Tau genleri adenoviral vektörlerle sıçanların hippocampal nöron ve dorsal kök gangliyonlarına aktararak apoptosis ve APP birikimi sonucunda Tau proteininin artmasına neden olmuştur. Bu çalışmalar A β peptidinin sentetik olarak hücre kültüründe kullanılmasından daha iyi sonuçlar vermesine rağmen yapılan mutasyonlar ve gen aktarımlarının AH'ın özelliklerini gösterme şansı düşüktür (Shi vd. 2012; Stoppelkamp vd. 2011).

İnsan nöroblastoma (SH-SY5Y) en genel olarak *in vitro* AH modeli oluşturulmak için kullanılan bir hücre hattıdır. Farklı faktörler kullanılarak SH-SY5Y hücre hattı olgun nöron hücrelere benzer hatlara dönüştürülmektedir. Bu hücre hattı tau ve mikrotübül proteinlerinin AH üzerinde ki fonksiyonunu anlamada büyük öneme sahiptir. Bu hücre hattı kullanılarak AH oluşum mekanizmaları ve ilaç etkileşimleri ile ilgili önemli bilgiler elde edilebilmektedir. Olgun nöronlar elde edildikten sonra toksik A β uygulanır ve sonucunda nörodejenerasyon oluşumu gözlemlenir. Fakat bu model gerçek anlamda Ah bütün özelliklerini yansıtamaz çünkü dönüştürüldükleri kanser hattının genlerinin interaksiyonları bulunmaktadır (Ntimi vd. 2013).

Immortal rat hippocampal hücre hattı embriyonik sıçan hippocampusünden elde edilmektedir ve kanser hücrelerinden farklı olarak bilinen bir beyin bölümünden elde edildiklerinden alt hücrelerinin fenotipleride bilinmektedir. Bu hücreler retroviral

onkogen transduksiyonu ile ölümsüzleştirilirler (tsA58 ve U19tsa). Ölümsüzleştirilen bu hücrelerin iki temel özellikleri bulunmaktadır; sürekli proliferasyon ve bölünmeler ile nöronların dönüşüm özellikleri kazanması. Dönüşen bu hücreler, nöronların ve glial hücrelerin markörlerini taşımaktadırlar (NFP (Neurofilament protein) ve GFAP (glial fibrillary acid protein)). Bu hücre hattı hippocampal nöronlardan oluştuğu ve bu bölgenin hatırlama ve hafızadan sorumlu olmasından dolayı AH'nın patojenezini anlamada büyük öneme sahiptir. Bu hücre hatları kanser hücre hatlarına kıyasla daha önemli bilgiler edinmemize ve AH'nın nöropatojenik özelliklerini daha iyi anlamamızı sağlamaktadır (Nguyen vd. 2010).

İndüklenmiş insan pluripotent kök hücreleri (iPSCs) birincil insan fibroblast hücrelerinin alzheimer hastalarından elde edilerek oluşturulmaktadır. Bu hücreler OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 ve NANOG transkripsiyon faktörleri kullanılarak yeniden programlanarak insan pluripotent kök hücreleri (iPSCs) oluşturulmaktadır. iPSC'ler retroviral transduksiyon kullanılarak iki farklı klon elde edilebilmektedir. Bunlar presenilin1 geni mutasyonu ile elde edilen A246E (PS1-2 iPSC and PS1-4 iPSC) hücre hattı ve PS2 geni mutasyonu ile elde edilen N141I (PS2-1 iPSC and PS2-2 iPSC) hücre hattıdır. Bu hücre hatları kullanılarak presenilin geninin nöron değişimindeki etkisi ve A β proteininin hücrede ki yoğunluğunun etkileri analiz edilebilmektedir. Ayrıca bu hücre hatları ile ilaç denemeleri yapılabilmekte ve sonucunda γ -sekrataze inhibitörleri kullanılarak A β salınımı kontrol altına alınabilmektedir. Bunun dışında hastalardan elde edilen insan canlı nöron hücreleri (FAD-iPSCs-derived neurons) ilaç geliştirmede ve yeni ilaçların doğrulanmasında büyük öneme sahip olduğu bilinmektedir (Yagi vd. 2011).

Bir başka *in vitro* insan hücre modeli ise down sendromlu hastalardan elde edilen kortikal nöron hücrelerinin dönüştürülerek kök hücreler elde edilmesiyle oluşturulmaktadır. APP geninin 21. Kromozom üzerinde olmasından dolayı trisomi 21 (down sendromu) hastalarından elde edilen bu hücreler AH çalışmalarında uygun birer model olarak kullanılabilir. AH başlangıcında görülen A β peptidinin birikmesi dışında, ileri seviye hastalıkların göstergesi olan Tau proteininin hiperfosforlanması bu tür hücre hatlarında analiz edilebilmektedir. Down sendromu kök hücre hattı (DS-iPSC) ile AH'nın ilk ve ileri düzey safhaları incelenebilmektedir. Ayrıca ilaç analizleri

yapılırken zamana dayalı ileri düzey AH özellikleri test edilebilmeyi mümkün kılmaktadır (Selkoe 2008).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Parfafenol'den (*Tanacetum parthenium*) türetilen doğal olarak ortaya çıkan bir seskiterpen lakton olan partenolid, olağanüstü anti-kanser ve anti-inflamatuar özellikler sergiler ve bu da daha ileri çalışmalar ve ilaç geliştirme için önemli bir aday olmasını sağlar. Mathema ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada sitokrom c, aktive B hücrelerinin nükleer faktör kappa-hafif zincir arttırıcı (NF- κ B), sinyal iletimi ve transkripsiyon aktivasyonu (STAT) ile ilişkili olarak bu kimyasalın moleküler olaylarını ve hücreye spesifik aktivitelerini kısaca araştırmışlardır. çalışmalarında, partenolid'nin pro-apoptotik genlerin güçlü NF- κ B-ve STAT-inhibisyon aracılı transkripsiyonel baskılanmasını gösterdiği bildirilmektedir. Bu bileşik hem transkripsiyonel düzeyde hem de ilişkili kinazların doğrudan inhibisyonuyla (IKK- β) etkimektedir. Benzer şekilde, bu derlemede intrensek apoptotik sinyal yolu aracılığıyla tümör hücrelerinin partenolid bağlı ROS aracılı apoptozu tartışılmıştır. Bu bileşiğin normal hücrelere zarar vermeme yeteneği, aynı zamanda kanser hücrelerinde dışsal apoptoz sinyaline ek olarak hassaslaşmaya neden olması, kanser ve iltihap ile ilgili bozuklukların tedavisinde önemli, yeni bir terapötik strateji sağladığı öne sürülmüştür.

Gao ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada beş yeni seskiterpen lakton, rasemosalakton A-E ve 19 bilinen seskiterpen lakton, *Inula racemosa*'nın köklerinden izole etmişlerdir. Onların yapıları kapsamlı spektroskopik analizle aydınlatılmış ve 2'nin mutlak konfigürasyonu X-ışını kırınımı analizinden çıkarılmıştır. Bileşik 1, 6, 8, 10, 12, 14 ve 17, insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri A549, hepatosellüler karsinoma HepG2 ve insan fibrosarkom HT1080 hücrelerine karşı 0.38 ile 4.19 μ g/mL arasında değişen IC₅₀ değerleriyle antiproliferatif aktiviteler sergilemiştir. Bileşikler 6 ve 8, sırasıyla 2.4 ve 2.5 μ g/mL IC₅₀ değerleri ile endotel hücrelerine karşı anti-proliferatif aktiviteler sergilemiştir. Ayrıca, 6 ve 8 numaralı bileşiklerin her ikisi de, 1.0 μ g/mL'de endotel hücresi tüp oluşumunu inhibe etmiştir. Bileşik 6'nın alantolidlerden hızlı ve kolay hazırlayıcı ölçekte izole edilmesi için bir yöntem tarif edilmektedir.

Seskiterpen laktonlar (SL), anti-inflamatuar ve antitümör etkinliğe sahip biyolojik olarak aktif bitki bileşiklerinin geniş ve çeşitli bir grup oluşturmaktadır. Alt sınıfı

germakranolidler SL'lerin başlıca gruplarından biridir. Bir anti-kanser ajanı olarak klinik çalışmalarda test edilen çok sitotoksik SL olan partenolid'yi içeriyor. Kreuger ve ark. (2012) çalışmalarında, hücre döngüsü tutuklanması, farklılaşması, intrinsik yol süresince apoptoz indüksiyonu ve ekstrinsik yolağın hassaslaşması ile ilgili SL antitümör aktivitesine odaklanmışlardır. Ayrıca, konvansiyonel kemoterapötikler ile birlikte yapılan tedaviye yanıt olarak tümörlerin gerilemesine değinmektedirler. Nükleer faktör-KB ile hedeflenmiş anti-enflamatuvar aktiviteyi *in vitro* ve *in vivo* olarak inceler ve onu moleküler mekanizmalarda yer alan SL yapısal özellikleriyle ilişkilendirdiler. SL'lerin umut verici antikanser ajanlar olarak ortaya çıktığı, ancak farklı hücre ölüm yöntemlerinde bilinen SL'lerin moleküler mekanizmalarını tam olarak anlamak ve bu mekanizmaların SL'lerin etkili antitümör ve anti-inflamatuvar aktivitelerine nasıl katkıda bulunduğu konusunda daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu belirtmektedirler.

Falco ve ark. (2013) araştırmalarında, pembe çiçekli kekik (*Origanum vulgare* L. subsp. *Vulgare* L.) bitkisinin farklı mekansal dağılımı (tek ve çift sıra) altındaki bitkisel yağ üretimini, kimyasal kompozisyonunu ve biyolojik aktivitesini araştırmayı amaçlamaktadır. Bu bitki faktörünün büyümesini, toprak örtüsünü, taze biyokütle, uçucu yağ miktarı ve bileşimi etkilediği gösterildi. Özellikle, bitki örtüsü tedavisi için tam çiçekte uçucu yağ yüzdesi daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Hidrodistillasyonla elde edilen yağların kimyasal bileşimi GC ve GC-MS ile tam olarak karakterize edilmiştir. Tek sıra halinde yetiştirilen bitkilerden elde edilen yağ sabinende zengindir; çift sıra halinde yetişen bitkiler ocimenlerde daha zengin oldupu söylendi. Esansiyel yağlar özellikle Gram pozitif patojenlere ve özellikle *Bacillus cereus* ve *B. subtilis*'e karşı antimikrobiyal etki göstermiştir.

Copaiba oleoresinler, *Copaifera* türlerinin (*Leguminosae*-*Caesalpinoideae*) ağaçlarının gövdelerinden sızmaktadır. Bu oleoresin, diterpenoidlerin, özellikle de monoksit ve di-asitlerin, seskiterpen hidrokarbonlar tarafından çözündürülmüş bir çözeltilisidir. Sesquiterpenes ve diterpenler (labdane, clerodane ve kaurane iskeletleri) her *Copaifera* türü için farklıdır ve bildirilen çeşitli anti-tümöral etkilerden embriyotoksik etkilere kadar değişen çeşitli biyolojik etkinliklerle bağlantılıdır. Leandro ve ark. (2013) bu

oleoresinde halihazırda tarif edilen tüm maddeleri ana terpenoidlerin yapıları ve aktiviteleri ile birlikte sunmaktadır.

Ayçiçeklerdeki sesquiterpen laktonları, patojen, yabancı ot ve böceklerle olan etkileşimler için önemlidir. *Helianthus annuus*'un geniş bir yelpazesinde, disk çiçeklerinden ekstrakte edilen sesquiterpen laktonların kompozisyonlarındaki farklılıklar, vahşi ve ekili ayçiçekler arasında ve ayrıca ayçiçeği melezleri üretmek için kullanılan farklı inbreds grupları arasında bulunmaktadır. Prasifka ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada yarımcılık fonksiyon analizi kullanarak, vahşi ayçiçeği, yetiştirilen inbreds ve melezleri sınıflandırmada genellikle argophyllone B, niveusin B ve 15-hidroksi-3-dehydrodesoxyfruticinin varlığının ve göreceli bolluğunun (% 75) etkili olduğunu göstermiştir. Argophyllone B, ayçiçeği gübresi olan *Homeosoma electellum*'un larval kütlelerini >% 30 oranında azaltmıştır. Ekilen floretlerden düşük miktarda karışık ekstrakt larva kütlelerinde benzer bir (% 40) azalma gerçekleşmiştir; bu da sesquiterpen laktonların kombinasyonlarının additif olarak hareket ettiğini göstermektedir.

Alzheimer hastalığı (AD) ilerleyen aşamalarında derin bir duygusal rahatsızlığa neden olan ilerleyici bellek kaybıyla karakterizedir. AD'nin tedavisi için henüz güvenli ve etkin bir ilaç bulunmadığından, bitkilerden gelen sekonder metabolitler bu meydan okumanın karşılanmasında etkili olabilmektedir. Ibrahim ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada, şifalı bitki *Amberboa ramosa*'nın sesquiterpenlerini kolinesteraz inhibe edici aktiviteleri için değerlendirmişlerdir. *Amberboa ramosa*'nın etil asetat çözünür fraksiyonundan dört sesquiterpen lakton izole edilmiştir. Amberbin C'in yeni olduğu bulunmuşken, diğer üç Amberin, Amberbin A ve Amberbin B daha önce bildirilmiştir. İzole edilen bileşiklerin yapıları, farklı spektroskopik teknikler kullanılarak açıklanmıştır. İzole edilmiş bileşikler, asetil kolinesteraz ve butiril kolinesteraz enzimlerine karşı inhibe potansiyeli bakımından test edildi. Bütün bileşikler, asetil kolinesteraz ve butiril kolinesteraza karşı mükemmel inhibitör aktiviteler göstermiştir. Yeni bir sesquiterpen lakton izole edildi ve tamamen karakterize edildi; *Amberboa ramosa*'dan sesquiterpen laktonları, asetil kolinesteraz ve butiril kolinesteraz enzimlere karşı iyi inhibitör aktiviteler gösterdi; bu çalışma, sesquiterpen laktonun Alzheimer hastalığına (AD) karşı ilaç gelişiminde ilginç kurşun molekülleri haline gelebileceğini göstermiştir.

Yemek olarak da kullanılabilen bir ilaç türü olarak *Alpinia oxyphylla* Miq. Çin'de uzun bir klinik öyküsü vardır. Çeşitli çalışmalar, *Alpinia oxyphylla* meyvelerinden kloroform (CF) ekstresinin önemli nöroprotektif aktivite etkilerini göstermiştir. Shi ve ark. (2014) çalışmalarında kognitif yetenek üzerine sinir koruma ile seskiterpenler içeren CF ekstraktının olası mekanizmalarını aydınlatmak için, farelere A β 1-42 ve daha sonra CF ile bu çalışmada enjekte edilmiştir. Sonuçlar, CF'nin uzun süreli tedavisinin, davranış testlerinde bilişsel performansları arttırdığını, glutatyon peroksidaz (GSH-px) aktivitelerinin arttığını ve malondialdehit (MDA), asetilkolinesteraz (AChE) ve amiloid- β düzeyini (A β) düşürdüğünü göstermiştir ve mikroglia aktivasyonunu, nöronal asidofili dejenerasyonunu ve korteks ve hipokampusta nükleer yoğunlaşmayı tersine çevirmiştir. Bu sonuçlar, CF'nin oksidatif stresini zayıflatarak ve kolinerjik fonksiyonları güçlendirmek için mikroglia aktivasyonunu ve nöronal asidofili dejenerasyonunu düzenleyerek öğrenme ve hafıza defisitlerini iyileştirdiğini göstermektedir.

Amiloid- β peptidin (A β) serebral birikimi AD'nin kritik bir özelliğidir. Bu nedenle, tıbbi bitkilerin alternatif bir önleme biçimi ya da muhtemel bir AD tedavisi olarak kullanımı, ilginç araştırma alanlarını oluşturmaktadır. Seskiterpen laktonlar ve bir seskiterpen alkol, birkaç anti-oksidatif ve anti-inflamatuar etkiye sahip olan *H. brasiliense*'de bulunan bileşiklerdir. Amoah ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada, bu bileşiklerin bir amiloid-p-peptid kaynaklı Alzheimer hastalığı fare modelinde nöroprotektif etkileri olup olmadığını araştırdık. Farelere, intraserebroventriküler olarak A β 1-42 peptidi enjekte etmiş ve daha sonra 1 ug/alan IGM-A (15-asetoksi-izogermafürolit), IGM-H (15-hidroksi-izogermafürenolit), PDA (Podoandin), EHP (1,2-epoksi-10a-hidroksi-podoandin), HDS (13-hidroksi-8,9-dehidrozizokarid) ve ARD (aromadendrane-4p, 10a-diol) uygulamışlardır. Tedaviden yedi gün sonra hayvanların hafızaları inhibisyon önlemede test edildiği gözlenmiştir. Hayvanlar üzerindeki davranış testlerinden sonra beyinler çıkarılmış ve oksidatif stres için biyokimyasal testlere tabi tutulmuştur. Sonuçlar, ARD, HDS ve PDA'nın pasif kaçınma görevinde A β 1-42 peptidinin neden olduğu hafıza zayıflamasını önemli ölçüde iyileştirdiğini ortaya koymuştur (P <0.05). Buna ek olarak, GSH aktivitesi artarken, TBARS seviyeleri bu bileşiklerle tedavi edilerek düşürülmüştür. Bu sonuçlar, bu bileşiklerin, hayvanlar tarafından uyarılan peptid amiloidin bilişsel açığını engellediğini ve Alzheimer hastalığı terapisi için potansiyel adaylar olabileceğini düşündürmektedir.

Alzheimer hastalığına yakalanmış yaşlı insanların miktarı her yıl artmaktadır. Kolinesteraz inhibitörleri, hastalığın semptomlarının hafifletilmesinde etkili olduklarını ve böylece bu tedaviler için bir araştırma alanı açtığını göstermiştir. Birçok biyolojik çalışmada etkili ajanlar olarak tanınan bitkisel ürünler şu anda asetilkolinesterazı, başka bir deyişle Alzheimer hastalığını inhibe etmek için dikkat çekmektedir. Hajimehdipoor ve ark. (2004) çalışmalarında, *Inula oculus-christi* ve *I. aucheriana*'dan üç seskiterpen laktonunun AChE'yi inhibe etme kabiliyeti, Ellman testi ile değerlendirmişlerdir. Gaillardin ve pulchellin C *I. oculus-christi*'den, britannin *I. aucheriana*'dan kromatografik yöntemlerle elde edildi. Metanol içerisinde 3 mg/mL konsantrasyonda çözülmüş ve bileşiklerin AChEI aktivitesi, substrat olarak Acetilthiocholine iyodid ve reaktif olarak 5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit kullanılarak 96 delikli Ellman yöntemi ile belirlenmiştir. İncelenen bileşiklerin AChEI aktivitesi sırasıyla gaillardin, britannin ve pulchellin C için 300 µg/L konsantrasyonda% 67.0,% 25.2 ve% 10.9 olarak elde edildi. Üç seskiterpen lakton arasında, AChE'nin% 67 inhibisyonu ile gaillardin gelecek Alzheimer çalışmaları için iyi bir aday olarak kabul edilebilmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

Tez kapsamındaki araştırmalarda kullanılan SH-SY5Y (ATCC[®], CRL-2266[™]) insan nöroblastom hücre modeli ATCC[®] hücre kültürü koleksiyonundan temin edildi. Çalışmada kullanılan kitler ve diğeri kimyasal malzemeler Tablo 3.1’de, cihazlar ise Tablo 3.2’de gösterilmektedir.

Tablo 3.1: Araştırmada Kullanılan Kit ve Kimyasal Listesi

Kitler	Alındığı Firma
MTT Cell Proliferation Assay Kit	Chemicon [®] (Germany)
LDH Assay Kit	Cell Biolabs (Chinese)
DMEM	Sigma-Aldrich [®] (Germany)
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco [®] (USA)
L-Glutamine	Gibco [®] (USA)
PBS	Sigma-Aldrich [®] (Germany)
Tripan Blue	Sigma-Aldrich [®] (Germany)
DMSO	Sigma-Aldrich [®] (Germany)
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich [®] (Germany)
Etanol	Sigma-Aldrich [®] (Germany)
Triton-X-100	Cell Biolabs (Chinese)

Tablo 3.2: Araştırmada Kullanılan Cihaz Listesi

Cihazın Adı	Modeli
Spektrofotometre	Biotek EPOCH
Biyogüvenlik Kabini	ESCO NordicSafe™
CO ₂ 'li İnkübatör	ESCO Celculture
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
İnvert Mikroskop	Leica DFC450C Model: CH-9435
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Masaüstü pH Metre	Adwa , AD1000
Dijital Mikrobiyolojik Emniyet Kabini	ESCO, AC2-4E8M
Soğutmalı Santrifüj	Hettich, Universal 320R
Isıtıcı-soğutucu Kuru Blok	Bioer, ch 202
CO ₂ İ incubator(115lt)	Esco, ccl-170b
Derin dondurucu – 86, büyük boy	Esco, uus-439b
UV-Visible Spektrofotometre	Mecasys, Optizen uv/vis
Vorteks	DAIHAN
Otoklav	JSR, JSAC-60
Analitik Terazi (0,0001)	Shimadzu ATX 224
Isıtıcı Manyetik Karıştırıcı	Daihan, shr
Su Banyosu	Daihan
Sterilizatör	Microtech, mst 55

3.2. Yöntem

3.2.1 SHSY5Y'den Olgun Nöron Dönüşümü

SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı, 2 mM L-glutamin, penisilin (20 ünite/ml), streptomisin (20 mg/ml) ve % 15 (V/V) ısı ile inaktive edilmiş fetal bovin serumu, Dulbecco'nun modifiye Eagle besiyeri (Sigma-Aldrich®, ABD) içerisinde 37° C'de inkübatöre valf pozisyonunda % 5 CO₂'de incübe edildi. Hücreler, önceden 0.05 mg/ml kollajen ile kaplanmış 10⁴ hücre/cm²'lik bir hücre yoğunluğuna kültürlendi. Hücrelerin

ekilmesinden bir gün sonra 10 uM all-trans-RA DMEM (% 5 fetal bovin serumu) ilave edildi. 5 gün sonunda, hücreler, RA varlığında 3 kez DMEM ile yıkandı ve 50 ng/ml BDNF ile farklı zaman aralıklarında inkübe edildi. Dönüştürülen hücre kültürü, farklı austrisin (Sigma-Aldrich®, ABD) konsantrasyonlarında 24 ve 48 saat süresince β -amiloid peptid ile inkübe edildi.

3.2.2. Hücre Canlılığının Ölçülmesi ve MTT Analizi

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrasodium bromide) canlı hücreler tarafından koyu mavi-mor renkli formazanlara [(2E,4Z)-4,5-Dimethylthiazol-2-yl]3,5-diphenylformazan] dönüştürülen sarı renkli bir substrattır. Bu reaksiyon canlı hücrelerde bulunan aktif mitokondriler tarafından gerçekleştirilir ve hücre canlılığını ölçmek amacı ile kullanılır. Hücre canlılığı ve bileşiklerin sitotoksik etkilerini incelemek amacıyla Üreticinin talimatlarına (Cayman Chemical Company®, Ann Arbor, MI, ABD) göre 3- (4,5-Dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) çözeltisi kullanıldı. Kısaca, MTT hücre kültürlerine 3 saat süresince ilave edildi ve inkübasyon işleminden sonra formazan kristalleri dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich®) içinde çözüldü ve plakalar 570 nm dalga boyunda bir plaka okuyucu kullanılarak analiz edildi.

3.2.3. LDH Analizi

Laktat Dehidrogenaz (LDH) hemen hemen her hücrede bulunan sitozolik bir enzimdir. Hücre membran bütünlüğü bozulduğu durumlarda ise ekstrasellüler ortama salınır. Şekil 3.5'te gösterildiği gibi ekstrasellüler ortamda bulunan LDH enzimi hücrelerin membran bütünlüğünün bozulduğunu ve ölüme gittiğini göstermektedir. LDH sitotoksikite test kiti (Cayman) üreticinin protokolüne göre kullanıldı. Hücreler, 96 gözlü plakalara ekildi ve 24/48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda seskiterpenlere maruz bırakıldı. Maruz kaldıktan sonra, oyuklarda partiküllerin atılması için 96 oyuklu plaka 400 gr'da 5 dakika süresince santrifüje tabi tutuldu. Daha sonra, 100 μ L üst faz, Cayman kitinden 100 uL reaksiyon karışımı ile 96 oyuklu bir plakanın yeni bir oyuğuna aktarıldı ve 30 dakika süresince oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak, çözeltinin absorbansı 490 nm'de bir mikropilaka okuyucu kullanılarak ölçüldü.

3.2.4. Apoptoz-Nekroz testi

5×10^4 hücre santrifüj ile toplandı ve hücreler 500 ul 1X bağlama tamponunda yeniden süspanse edildi. 5 ul Annexin V-FITC ve 5 ul propidyum iyodür (PI 50 ug/ml) kültürlerine ilave edildi ve karanlıkta 5 dakika inkübe edildi. Hücreler daha sonra 4°C 'de 30 dakika süresince fosfat tamponlu salin içinde % 4 paraformaldehid ile sabitlendi. Son olarak, kültürler akış sitometrisi (CyFlow® Cube 6, Almanya) ile gözlendi.

3.2.5. Hoechst 33258 floresan boyama ile Apoptoz analizi

Hoechst 33258 boyama apoptotik çekirdekleri saptamak için kullanıldı. B-amiloid kültürleri, negatif kontrol ve LA-GPE (25 uM) ile pozitif kontrol (sadece β -amiloid, 20 μM), hücre morfolojisini analiz etmek için 24 ve 48 saat inkübe edildi. Ardından, hücreler fosfat tamponlu salin içinde % 4 paraformaldehit ile 4°C 'de 30 dakika sabitlendi. Hücreleri PBS ile yıkadıktan sonra, nükleer DNA'lar 1 uM Hoechst 33258 floresan boyası ile oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Hücreler incelendi ve floresan mikroskopu (Leica® DM IL LED) altında görüntülendi.

3.2.6. Asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesinin belirlenmesi

Hücrel Alzheimer hastalığı modelindeki AChE aktivitesi, üreticinin önerdiği protokole göre Abcam®'den (Cambridge, MA, ABD) Asetil Kolinesteraz Test Kiti (Kolorimetrik) ile ölçüldü. Kısaca, hacim oluşturmak için 100 uL toplam asetilkolinesteraz tahlili; asetilkolinesteraz standardı, 50 uL asetiltiyokololin reaksiyon karışımı, kontrol ve test örneklerinin her birine eklendi. Ardından, reaksiyon oda sıcaklığında ışıktan korunarak 30 dakika inkübe edildi. $\text{OD} = 410 \pm 5 \text{ nm}$ 'de absorbans, mikropłaka okuyucuda ölçüldü.

3.2.7. Toplam antioksidan kapasite (TAK) ve toplam oksidatif durum (TOD) analizi

TAK ve TOD tahlilleri, kit kullanılarak imalatçının tarifine göre (Rel Assay Diagnostics®, Gaziantep, Türkiye) gerçekleştirildi. Numunedeki antioksidanlar koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini renksiz indirgenmiş ABTS formuna indirgemektedir. 660 nm'de absorbans değişikliği, numunenin toplam antioksidan seviyesiyle ilişkilidir. Test geleneksel olarak bir vitamin E analogu olan Trolox Eşdeğeri olarak adlandırılan

dengeli bir antioksidan standart solüsyon ile kalibre edildi. Numunede bulunan oksidanlar demirli iyon çelatlayıcı kompleksini ferrik iyonu oksitlemektedir. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bolca bulunan arttırıcı moleküller tarafından uzatılır. Demir iyonu, asitli bir ortamda kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, numunede bulunan oksidan moleküllerinin toplam miktarı ile ilgilidir. Deney, hidrojen peroksit ile kalibre edildi ve sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri cinsinden ifade edildi ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eşit / L).

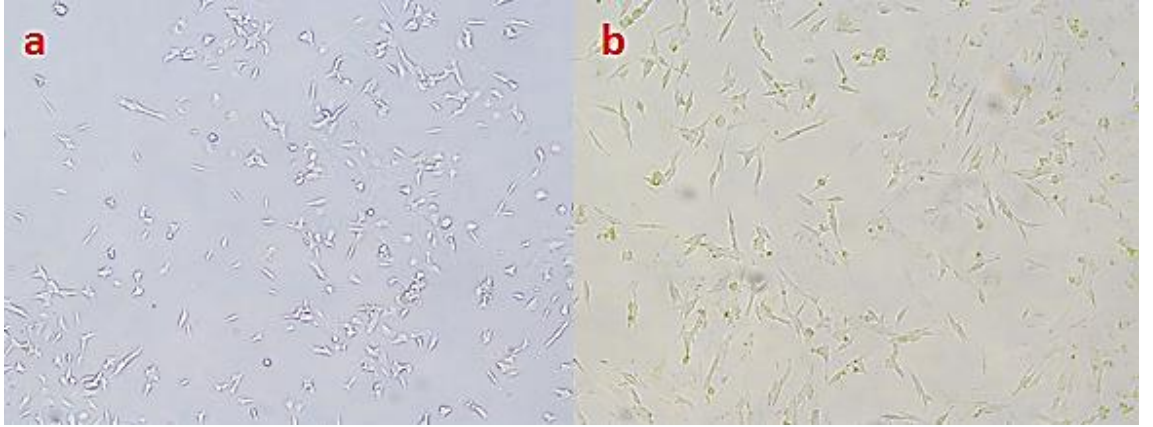
3.2.8. İstatistiksel analiz

Çalışmalardan elde edilen sayısal verilerin istatistiksel analizi, SPSS[®] Sürüm 20.0 ile gerçekleştirildi. Post Hoc LSD testi, İstatistiksel değerlendirme için Tek Yönlü Anova testi kullanılmış ve istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Retinoik asit uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin normal nöron hücrelerine dönüştürülmesi

SH-SY5Y hücreleri T25 flaska ekildi ve konfluene ulaşmak için hücrelere 5 gün inkübe edildi. Bundan sonra nöroblastoma hücre çizgisini nöron benzeri hücre kültürü için 5 gün süresince ayırmak için hücre kültürüne 10 mM all-trans retinoik asit (RA) ilave edildi. Sonuçlara göre hücrelerde belirgin morfolojik değişiklikler belirlendi. Mikroskopta incelendiğinde, hücreler daha düzleşti ve dendrit/akson uzadı gözlemlendi. Hücreler arasındaki temas ve iletişimin arttığı gözlemlendi (Şekil 4.1).

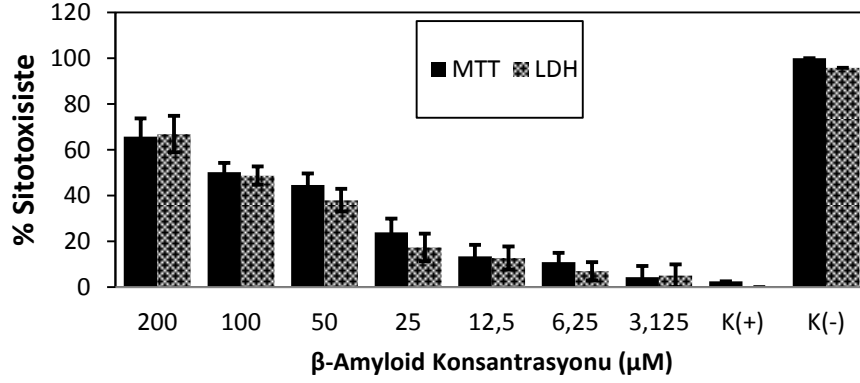


Şekil 4.1: Farklılaşmamış ve farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik yapıları. **a-** RA içermeyen hücre kültürü, **b-** 10 mM RA uygulanmış hücre kültürü (5 gün)

4.2. β -Amiloid uygulamasına karşı hücre canlılığı testleri (MTT ve LDH)

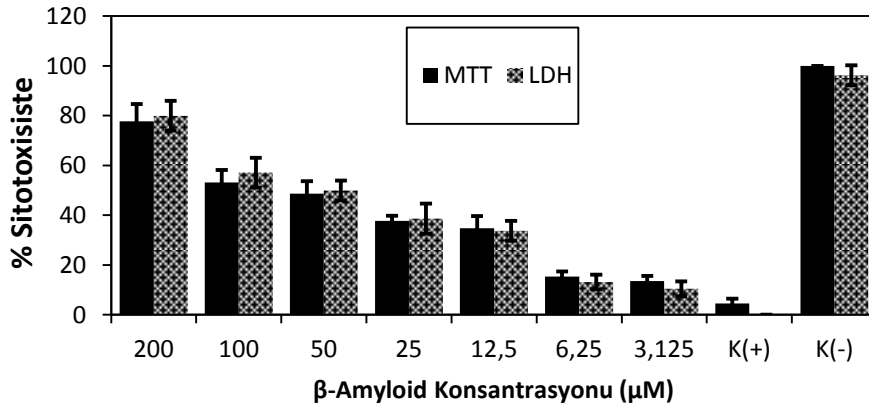
Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin β -amiloid'e karşı IC_{50} değerlerini değerlendirmek için, çeşitli konsantrasyonlar (3.125-200 μ M) hücre kültürü için 24 saat ve 48 saat süresince uygulandı. Sonuç olarak 24 saat süresince 100 μ M β -amiloid ve 48 saat süresince 50 μ M β -amiloidin toplam hücre popülasyonlarının %50,8'ini öldürdüğü analiz edildi (Şekil 4.2 ve 4.3).

SH-SY5Y Hücrelerinin 24 Saatlik β -Amyloid toksisitesi



Şekil 4.2: 24 saat süresince β -Amiloid muamelesinin (3.125-200 μ M) hücre canlılığı üzerine etkisi (K(+): pozitif kontrol (Triton-X), K(-): negatif kontrol)

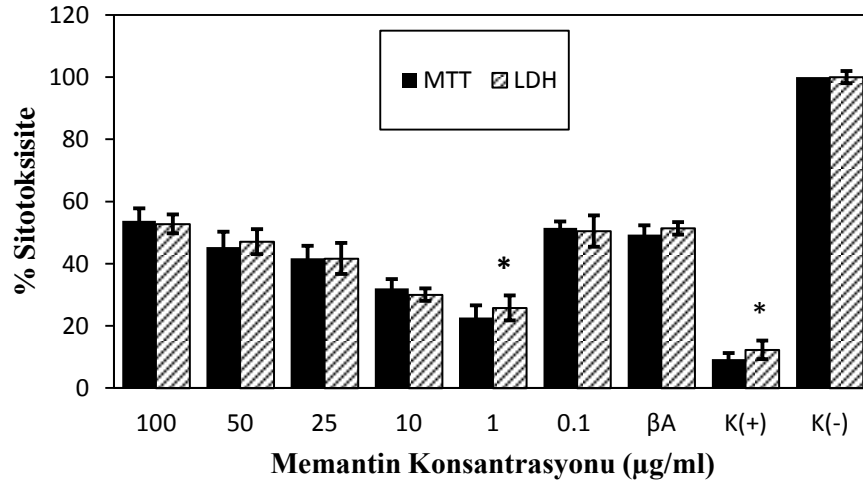
SH-SY5Y Hücrelerinin 48 Saatlik β -Amyloid toksisitesi



Şekil 4.3: 48 saat süresince β -Amiloid muamelesinin (3.125-200 μ M) hücre canlılığı üzerine etkisi

4.3. Memantin'in farklı konsantrasyonlarının nöroprotektif etkisi

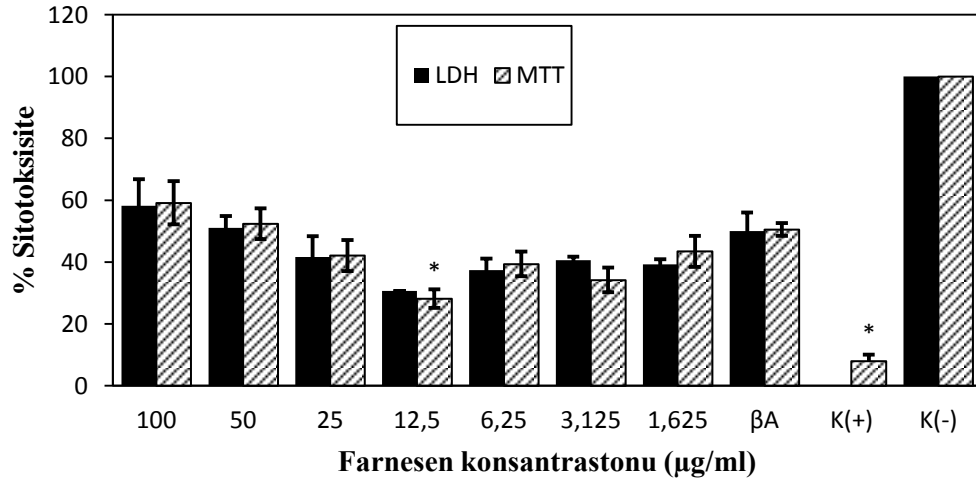
Memantin, Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan birkaç ilaçtan biridir ve bu çalışmada memantin uygulamaları için karşılaştırmalı kontrol olarak kullanıldı. Sonuçlar, 25 µg/ml'lik memantin konsantrasyonunun 24 saat süresince sitotoksitesiteyi düşürdüğünü gösterdi (beraberinde 24 saat süresince 100 µM β-amiloid uygulandı) (p <0.05, Microsoft Excel 2010, Anova: Tek faktör ve regresyon analizi değerleri hesaplamak için kullanıldı).



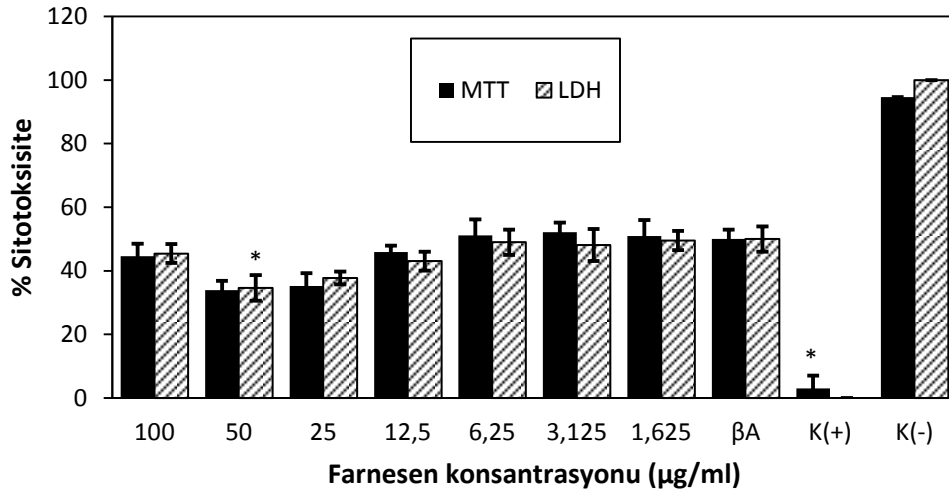
Şekil 4.4: In vitro AD modelinde Memantin muamelesinin nöroprotektif etkisi. Sembol (*), 3.250 µg/ml konsantrasyonda Sitotoksitedeki istatistiksel olarak anlamlı azalmayı temsil eder, p <0.05.

4.4. *In vitro* AD modelinde Farnesen'in nöron koruyucu etkileri

24 saat süresince 100 μ M β -amiloid ve 48 saat süresince 50 μ M β -amiloid uygulacak hücre hatlarına 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 μ g/ml konsantrasyonlarda farnesen ile muamele edilen SH-SY5Y hücre hattında nöron koruyucu etkinin 24 saat için 12,5 μ g/ml ve 48 saat için 50 μ g/ml olduğu belirlendi (Şekil 4.5)



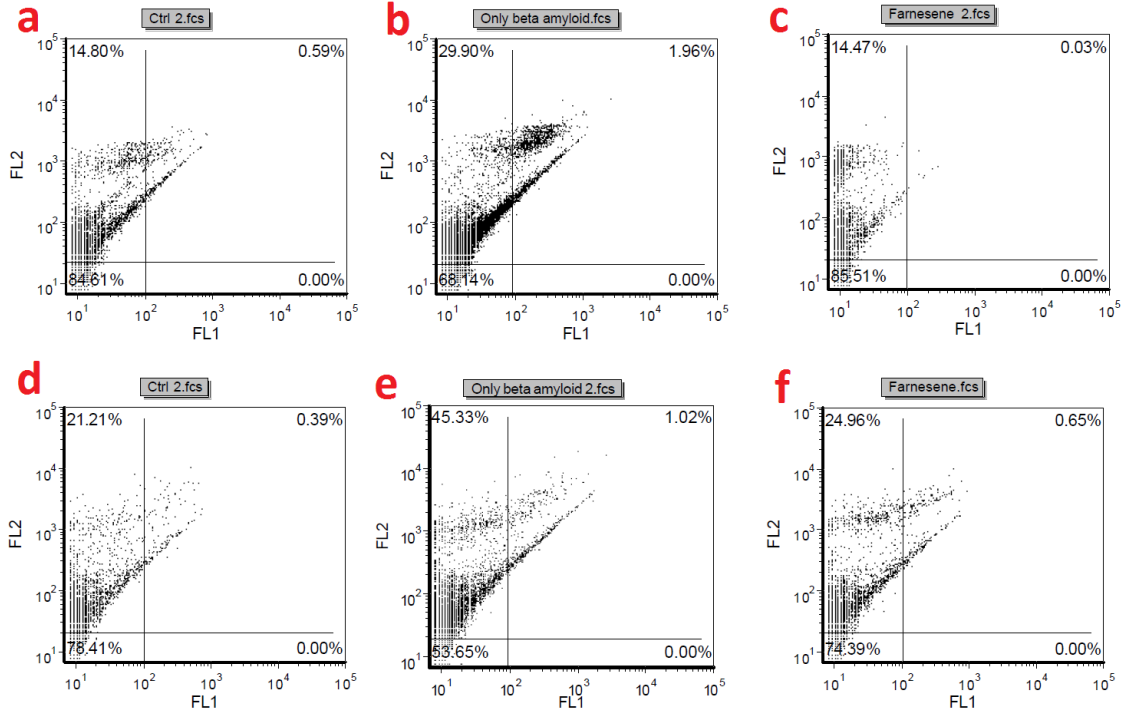
Şekil 4.5: *In vitro* AD modelinde 24 saat süresince Farnesen muamelesinin nöroprotektif etkisi (Kısaltmalar Şekil 4.4'de ki gibidir)



Şekil 4.6: In vitro AD modelinde 48 saat süresince Farnesen muamelesinin nöroprotektif etkisi (Kısaltmalar Şekil 4.4’de ki gibidir)

4.5. β-Amiloid uygulanmış SH-SY5Y hücre hattına karşı farnesenin flov sitometrik sonuçları

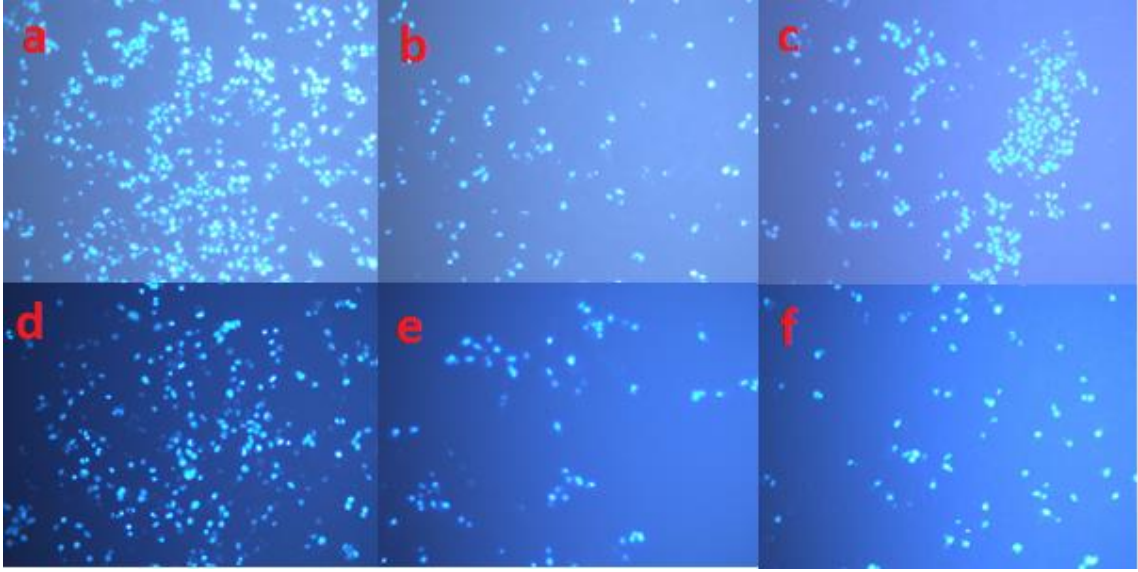
Flov sitometri analizi, β-amiloid peptidin farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerini apoptoza göre nekroz yoluyla daha fazla öldürdüğünü buldu. Bunun yanında farnesen uygulamsıa, 24 saat süresince % 68,14 ile % 85,51 ve 48 saat süresince % 53,65 ile % 74,39 arasında β-amiloid ilavesine karşı hücre yaşayabilirliğini arttırdı. Hem β-amiloid maruziyetinden kaynaklanan nekroz seviyeleri hem 24 saat hem de 48 saat süresince önemli ölçüde azaldı (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: Hücre ölüm türünü araştırmak için Annexin-V / PI flov sitometrisi (CyFlow® Cube 6, Sysmex, Almanya) analizi yapılmıştır. **a-** 24 saat süresince sadece SH-SY5Y hücreleri, **b-** 24 saat süresince sadece β -amiloid (100 uM) içeren hücre kültürü, **c-** 24 saat süresince β -Amiloid (100 uM) + farnesen (12,5 μ g / ml) **d-** 48 saat süresince sadece SH-SY5Y hücre kültürü, **e-** 48 Saat süresince sadece β -Amiloid (50 uM), **f-** 48 saat süresince β -Amiloid (50 uM) + farnesen (50 μ g / ml)

4.6. *In vitro* AD modelinde farnesen uygulamasının Hoechst 33258 floresan boyama sonuçları

B-amiloid ve farnesene maruz bırakılan SH-SY5Y hücrelerinin kromozom bütünlüğünü analiz etmek için Hoechst 33258 fluoressan boyama tekniği kullanıldı. Mikroskopik analiz, β -amiloid uygulamasının hücrelerin çekirdeğini bozduğunu ve sağlıklı hücrelerin sayısını azalttığını gösterdi. Diğer yandan, farnesen ilavesi, 24 saat ve 48 saat süresince β -amiloidin toksik etkisini azaltıpı gözlemlendi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: Hoechst 33258 florasan boyama tekniği kromozom bütünlüğü analizi kullanılmıştır. **a-** 24 saat süresince sadece SH-SY5Y hücreleri, **b-** 24 saat süresince sadece β -amiloid (100 uM) içeren hücre kültürü, **c-** 24 saat süresince β -Amiloid (100 uM) + farnesen (12,5 μ g / ml) **d-** 48 saat süresince sadece SH-SY5Y hücre kültürü, **e-** 48 Saat süresince sadece β -Amiloid (50 uM), **f-** 48 saat süresince β -Amiloid (50 uM) + farnesen (50 μ g / ml).

4.7. *İn vitro* AD modelinde farnesen uygulamasının toplam antioksidan kapasitesi (TAK)/ toplam oksidatif stres (TOD) seviyeleri ve Asetilkolinesteraz aktivitesi üzerine etkileri

Farnesenin nöron koruyucu etkilerinin arkasındaki mekanizmayı anlamak için Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK) ve Toplam Oksidatif Stres (TOD) düzeyleri analiz edildi. Bu çalışmada, sadece farnesen uygulaması sonrasında TAK ve TOD düzeylerinde anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 4.1). Asetilkolinesteraz tahlili, farnesenin 24 saat ve 48 saat süresince β -amiloid etkileşimi sonrasında ACHE düzeylerini yüksek oranda azalttığını göstermektedir. farnesenin β -amiloid toksisitesine karşı nöroprotektif etkisi asetilkolinesteraz aktivitesi ile korelasyon göstermektedir (Tablo 4.2).

Tablo 4.1: Farnesenin 24 ve 48 saat süresince *in vitro* uygulanmasından sonra Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK) ve Toplam Oksidatif Stres (TOD) seviyeleri.

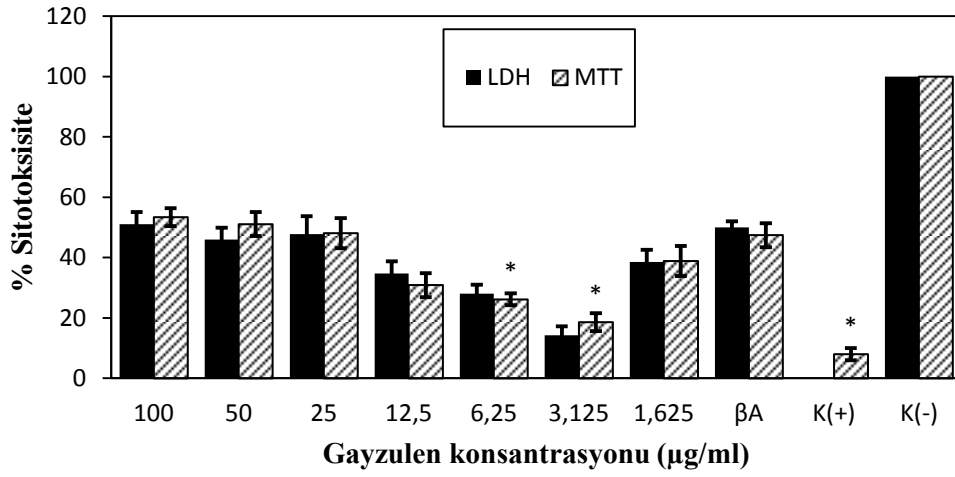
Uygulama	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
	TAK (mmol Trolox Equiv./l)	TAK	TOD (μ mol H ₂ O ₂ Equiv./l)	TOD
Farnesen+ β A	1,08 \pm 0,01	1,69 \pm 0,01	9,11 \pm 0,42	15,78 \pm 0,61
β A	1,009 \pm 0,03	1,42 \pm 0,01	10,75 \pm 0,96	16,57 \pm 0,66
K(-)	0,95 \pm 0,02	1,52 \pm 0,03	9,67 \pm 1,30	15,52 \pm 1,20

Tablo 4.2: 24 ve 48 saat süresince farnesen uygulama sonrasında asetilkolinesteraz Aktivitesi (μ /ml) (Kısaltmalar Şekil 4.4’de ki gibidir)

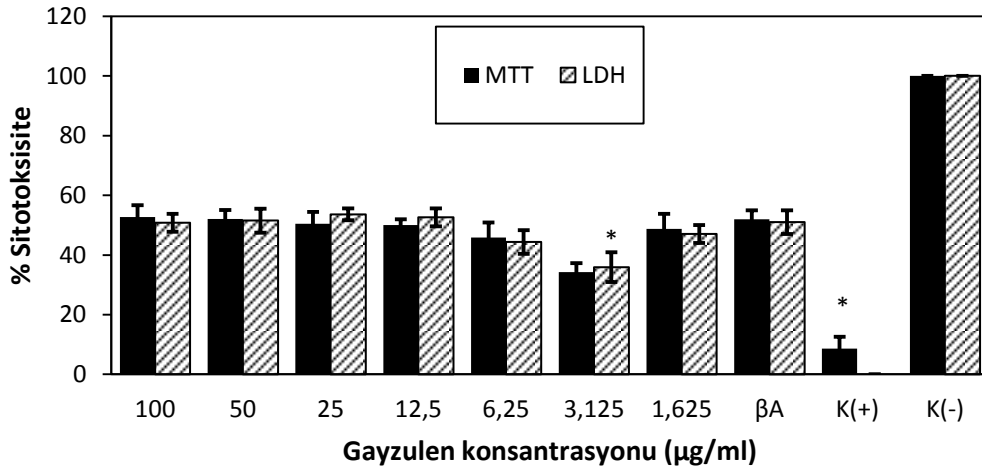
	Asetilkolinesteraz Aktivitesi (μ /ml)	
	24 Saat	48 Saat
Farnesen+ β A	465,20 (\pm 9,8)*	403,33 (\pm 9,8)*
β A	564,20 (\pm4,3)	463,80 (\pm1,4)
K(-)	463,52 (\pm 7,7)*	395,21 (\pm 2,5)*

4.8. In vitro AD modelinde Gayzulen uygulamasının nöron koruyucu etkileri

24 saat süresince 100 μ M β -amiloid ve 48 saat süresince 50 μ M β -amiloid uygulacak hücre hatlarına 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 μ g/ml konsantrasyonlarda gayzulen ile muamele edilen SH-SY5Y hücre hattında nöron koruyucu etkinin 24 saat için 3,125 μ g/ml ve 48 saat için yine 3,125 μ g/ml olduğu belirlendi (Şekil 4.9 ve 4.10)



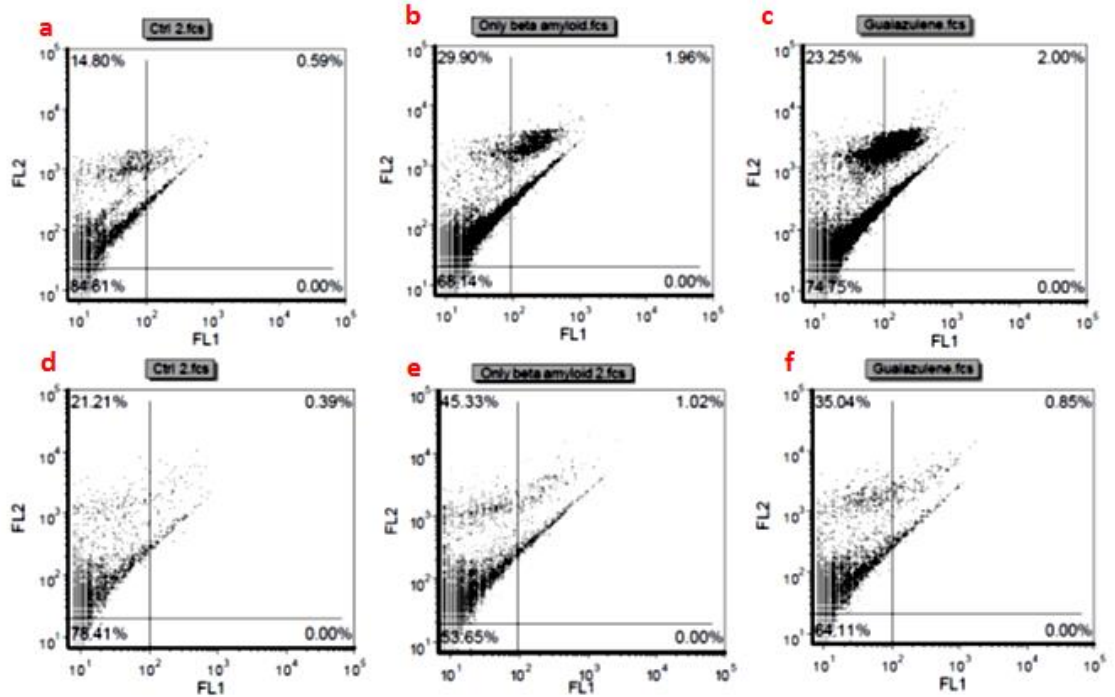
Şekil 4.9: In vitro AD modelinde 24 saat süresince Gayzulen muamelesinin nöroprotektif etkisi (Kısaltmalar Şekil 4.4’de ki gibidir)



Şekil 4.10: In vitro AD modelinde 48 saat süresince Gayzulen muamelesinin nöroprotektif etkisi (Kısaltmalar Şekil 4.4’de ki gibidir)

4.9. β -Amiloid uygulanmış SH-SY5Y hücre hattına karşı gayzulenin flov sitometrik sonuçları

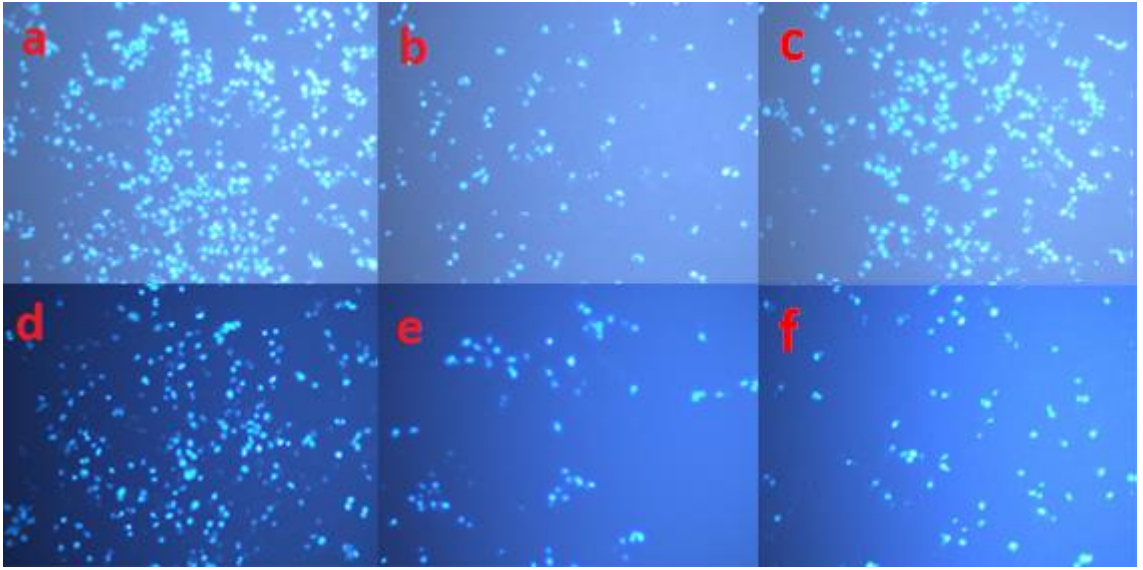
Bunun yanında gayzulen uygulamsıa, 24 saat süresince % 68,14 ile % 74,75 ve 48 saat süresince % 53,65 ile % 64,11 arasında β -amiloid ilavesine karşı hücre yaşayabilirliğini arttırdı. Hem β -amiloid maruziyetinden kaynaklanan nekroz seviyeleri hem 24 saat hem de 48 saat süresince önemli ölçüde azaldı (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Hücre ölüm türünü araştırmak için Annexin-V/PI flov sitometrisi (CyFlow® Cube 6, Sysmex, Almanya) analizi yapılmıştır. **a-** 24 saat süresince sadece SH-SY5Y hücreleri, **b-** 24 saat süresince sadece β -amiloid (100 uM) içeren hücre kültürü, **c-** 24 saat süresince β -Amiloid (100 uM) + gayzulen (12,5 μ g/ml) **d-** 48 saat süresince sadece SH-SY5Y hücre kültürü, **e-** 48 Saat süresince sadece β -Amiloid (50 uM), **f-** 48 saat süresince β -Amiloid (50 uM) + gayzulen (50 μ g/ml)

4.10. *In vitro* AD modelinde gayzulen muamelesinin Hoechst 33258 floresan boyama sonuçları

B-amiloid ve gayzulen maruz bırakılan SH-SY5Y hücrelerinin kromozom bütünlüğünü analiz etmek için Hoechst 33258 floresan boyama tekniği kullanıldı. Mikroskopik analiz, β -amiloid uygulamasının hücrelerin çekirdeğini bozduğunu ve sağlıklı hücrelerin sayısını azalttığını gösterdi. Diğer yandan, gayzulen ilavesi, 24 saat ve 48 saat süresince β -amiloidin toksik etkisini azaltıpı gözlemlendi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: Hoechst 33258 floresan boyama tekniği kromozom bütünlüğü analizi kullanılmıştır. **a-** 24 saat süresince sadece SH-SY5Y hücreleri, **b-** 24 saat süresince sadece β -amiloid (100 uM) içeren hücre kültürü, **c-** 24 saat süresince β -Amiloid (100 uM) + gayzulen (12,5 μ g / ml) **d-** 48 saat süresince sadece SH-SY5Y hücre kültürü, **e-** 48 Saat süresince sadece β -Amiloid (50 uM), **f-** 48 saat süresince β -Amiloid (50 uM) + gayzulen (50 μ g / ml).

4.11. *In vitro* AD modelinde gayzulenin muamelesinin toplam antioksidan kapasitesi (TAK)/ toplam oksidatif stres (TOD) seviyeleri ve Asetilkolinesteraz aktivitesi üzerine etkileri

Gayzulenin nöron koruyucu etkilerinin arkasındaki mekanizmayı anlamak için Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK) ve Toplam Oksidatif Stres (TOD) düzeyleri analiz

edilmiştir. Bu çalışmada, sadece gayzulen uygulaması sonrasında TAK ve TOD düzeylerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 4.3). Asetilkolinesteraz tahlili, gayzulenin 24 saat ve 48 saat süresince β -amiloid etkileşimi sonrasında ACHE düzeylerini yüksek oranda azalttığını göstermektedir. gayzulenin β -amiloid toksisitesine karşı nöroprotektif etkisi asetilkolinesteraz aktivitesi ile korelasyon gösterdi (Tablo 4.4).

Tablo 4.3: Gayzulenin 24 ve 48 saat süresince *in vitro* uygulanmasından sonra Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK) ve Toplam Oksidatif Stres (TOD) seviyeleri.

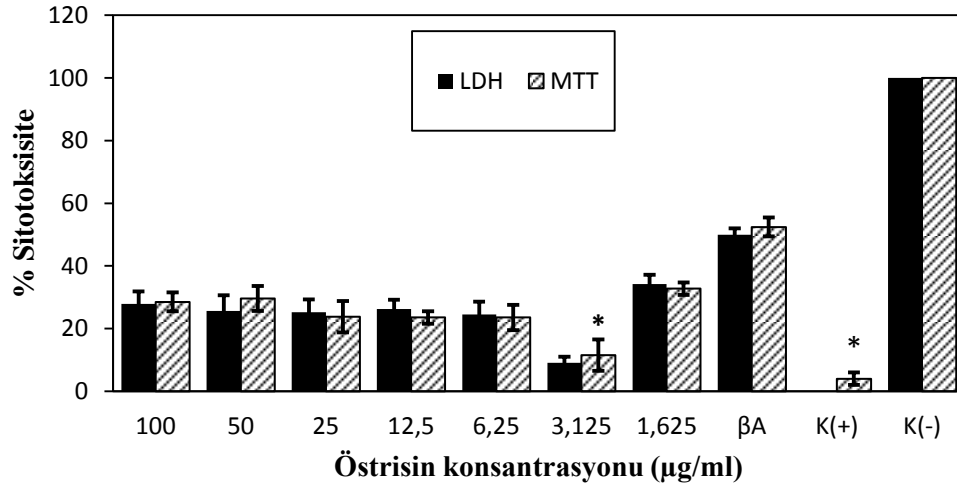
Uygulama	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
	TAK (mmol Trolox Equiv./l)	TAK	TOD (μ mol H ₂ O ₂ Equiv./l)	TOD
Gayzulen+ β A	0,96 \pm 0,07	1,5 \pm 0,09	9,12 \pm 0,91	15,26 \pm 1,42
β A	1,009 \pm 0,03	1,42 \pm 0,01	10,75 \pm 0,96	16,57 \pm 0,66
K(-)	0,95 \pm 0,02	1,52 \pm 0,03	9,67 \pm 1,30	15,52 \pm 1,20

Tablo 4.4: 24 ve 48 saat süresince gayzulen uygulama sonrasında asetilkolinesteraz Aktivitesi (μ /ml) (Kısaltmalar Şekil 4.4’de ki gibidir)

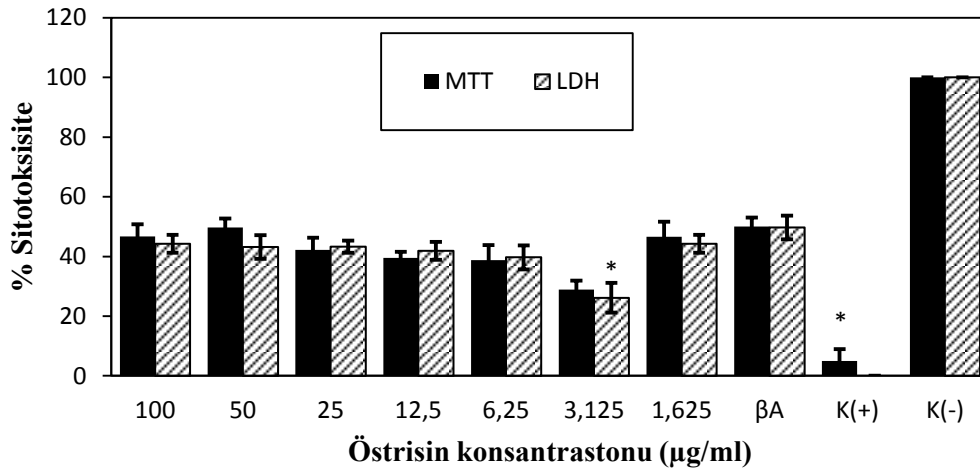
	Asetilkolinesteraz Aktivitesi (μ /ml)	
	24 Saat	48 Saat
Gayzulen+ β A	497,31 (\pm 8,2)*	401,92 (\pm 4,2)*
β A	564,22 (\pm4,3)	463,81 (\pm1,4)
K(-)	463,53 (\pm 7,7)*	395,23 (\pm 2,5)*

4.16. *In vitro* AD modelinde Östrisin muamelesinin nöron koruyucu etkileri

24 saat süresince 100 μ M β -amiloid ve 48 saat süresince 50 μ M β -amiloid uygulacak hücre hatlarına 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 μ g/ml konsantrasyonlarda östrisin ile muamele edilen SH-SY5Y hücre hattında nöron koruyucu etkinin 24 saat ve 48 saat için yine 3,125 μ g/ml olduğu belirlendi (Şekil 4.13 ve 4.14).



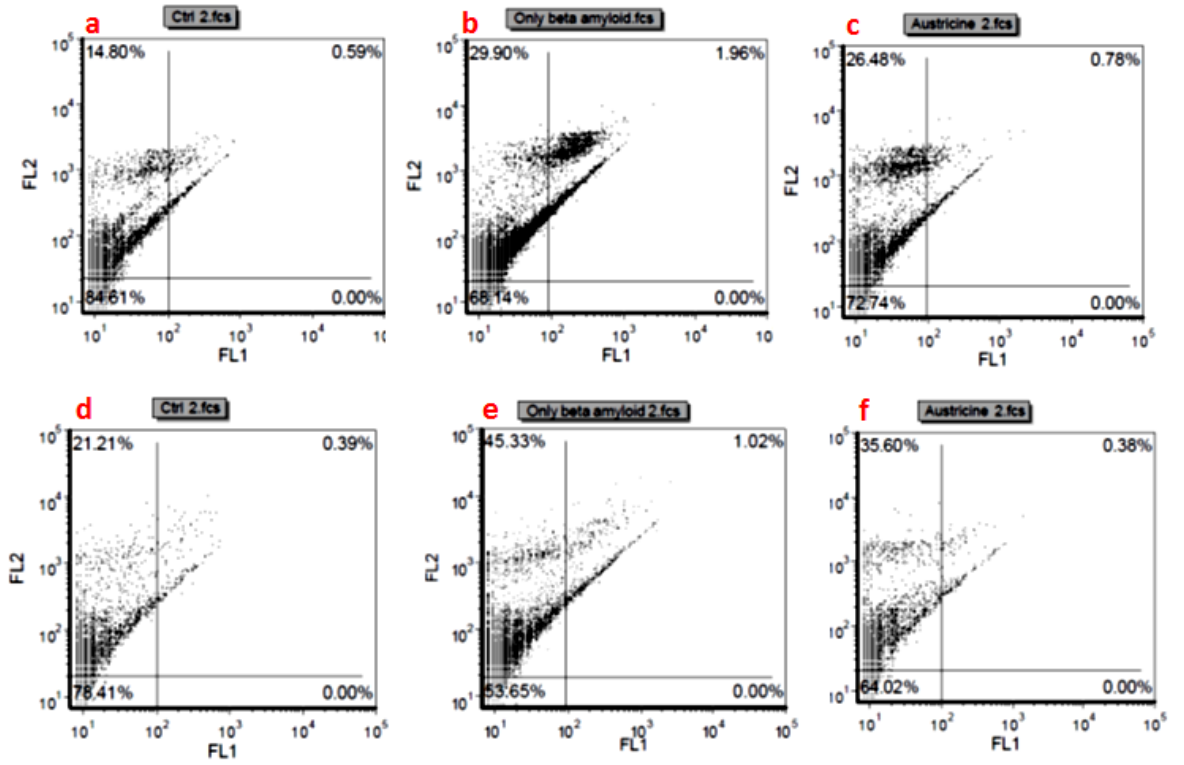
Şekil 4.13: In vitro AD modelinde 24 saat süresince Östrisin muamelesinin nöroprotektif etkisi (Kısaltmalar Şekil 4.4’de ki gibidir)



Şekil 4.14: In vitro AD modelinde 48 saat süresince Östrisin muamelesinin nöroprotektif etkisi (Kısaltmalar Şekil 4.4’de ki gibidir)

4.17. In vitro AD modelinde östrisin mumelesinin flov sitometrik sonuçları

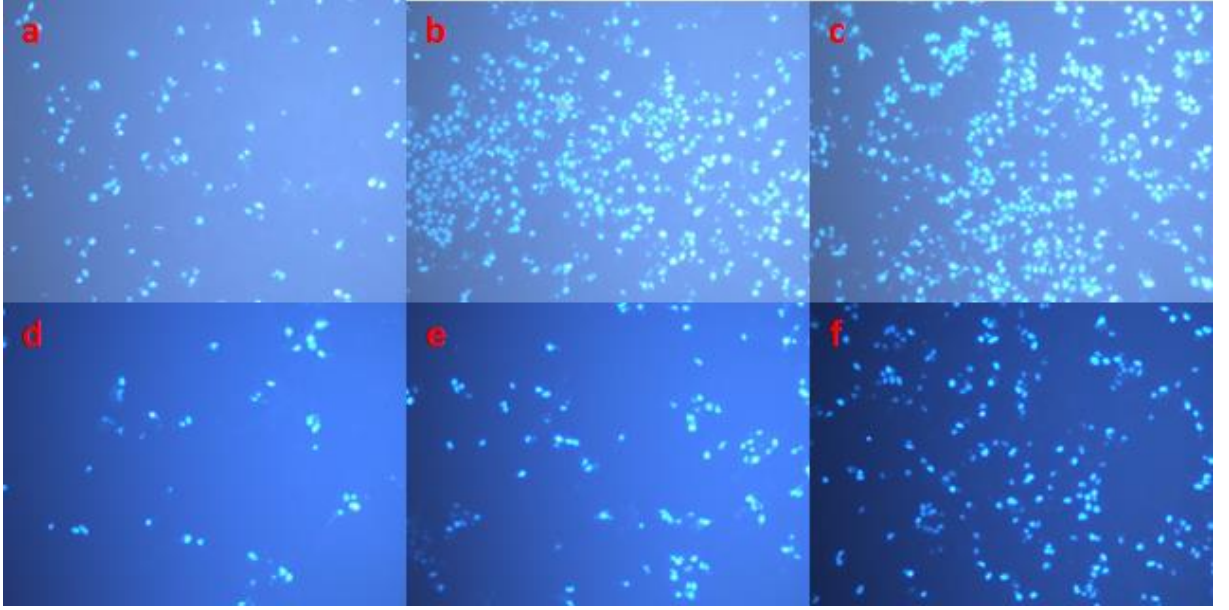
Östrisin uygulamsıa, 24 saat süresince % 68,14 ile % 72,74 ve 48 saat süresince % 53,65 ile % 64,02 arasında β -amiloid ilavesine karşı hücre yaşayabilirliğini arttırdı. Hem β -amiloid maruziyetinden kaynaklanan nekroz seviyeleri hem 24 saat hem de 48 saat süresince önemli ölçüde azaldı (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: Hücre ölüm türünü araştırmak için Annexin-V/PI flov sitometrisi (CyFlow® Cube 6, Sysmex, Almanya) analizi yapılmıştır. **a-** 24 saat süresince sadece SH-SY5Y hücreleri, **b-** 24 saat süresince sadece β -amiloid (100 uM) içeren hücre kültürü, **c-** 24 saat süresince β -Amiloid (100 uM) + östrisin (12,5 μ g / ml) **d-** 48 saat süresince sadece SH-SY5Y hücre kültürü, **e-** 48 Saat süresince sadece β -Amiloid (50 uM), **f-** 48 saat süresince β -Amiloid (50 uM) + östrisin (50 μ g / ml)

4.18. *In vitro* AD modelinde östrisin mumaesinin Hoechst 33258 floresan boyama sonuçları

B-amiloid ve östrisin maruz bırakılan SH-SY5Y hücrelerinin kromozom bütünlüğünü analiz etmek için Hoechst 33258 floresan boyama tekniği kullanıldı. Mikroskopik analiz, β -amiloid uygulamasının hücrelerin çekirdeğini bozduğunu ve sağlıklı hücrelerin sayısını azalttığını gösterdi. Diğer yandan, östrisin ilavesi, 24 saat ve 48 saat süresince β -amiloidin toksik etkisini azaltıpı gözlemlendi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16: Hoechst 33258 floresan boyama tekniği kromozom bütünlüğü analizi kullanılmıştır. **a-**24 saat süresince sadece β -amiloid (100 uM) içeren hücre kültürü, **b-** 24 saat süresince β -Amiloid (100 uM) + östrisin (12,5 μ g/ml) , **c-**24 saat süresince sadece SH-SY5Y hücreleri, **d-** 48 saat süresince β -Amiloid (50 uM) + östrisin (50 μ g/ml), **e-** 48 Saat süresince sadece β -Amiloid (50 uM), **f-** saat süresince sadece SH-SY5Y hücreleri.

4.19. *In vitro* AD modelinde östrisin muamelesi sonucunda toplam antioksidan kapasitesi (TAK)/toplam oksidatif stres (TOD) seviyeleri ve Asetilkolinesteraz aktivitesi üzerine etkileri

Östrisinin nöron koruyucu etkilerinin arkasındaki mekanizmayı anlamak için Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK) ve Toplam Oksidatif Stres (TOD) düzeyleri analiz edildi. Bu çalışmada, sadece östrisin uygulaması sonrasında TAK ve TOD düzeylerinde anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 4.5). Asetilkolinesteraz tahlili, östrisinin 24 saat ve 48 saat süresince β -amiloid etkileşimi sonrasında ACHE düzeylerini yüksek oranda azalttığını gösterdi. Östrisinin β -amiloid toksisitesine karşı nöroprotektif etkisi asetilkolinesteraz aktivitesi ile korelasyon gösterdi (Tablo 4.6).

Tablo 4.5: Östrisinin 24 ve 48 saat süresince *in vitro* uygulanmasından sonra Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK) ve Toplam Oksidatif Stres (TOD) seviyeleri.

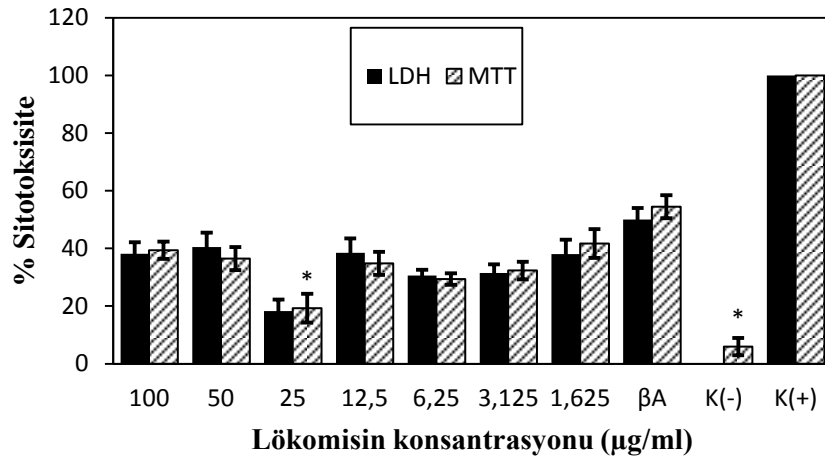
Uygulama	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
	TAK (mmol Trolox Equiv./l)	TAK	TOD (μ mol H ₂ O ₂ Equiv./l)	TOD
Östrisin+ β A	0,988 \pm 0,28	1,67 \pm 0,18	9,39 \pm 1,23	15,63 \pm 1,64
β A	1,009 \pm 0,032	1,42 \pm 0,01	10,75 \pm 0,96	16,57 \pm 0,66
K(-)	0,95 \pm 0,026	1,52 \pm 0,03	9,67 \pm 1,30	15,52 \pm 1,20

Tablo 4.6: 24 ve 48 saat süresince östrisin uygulama sonrasında asetilkolinesteraz Aktivitesi (μ /ml) (Kısaltmalar Şekil 4.4'de ki gibidir)

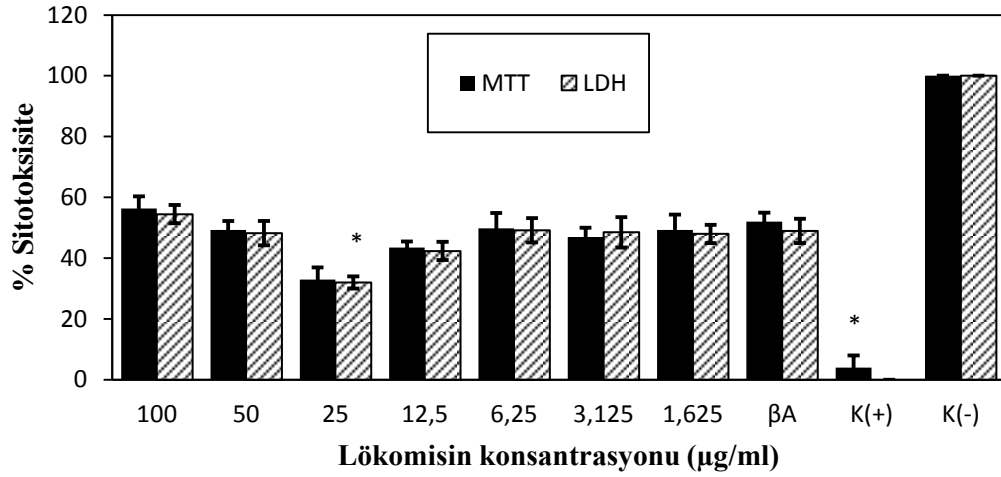
	Asetilkolinesteraz Aktivitesi (μ /ml)	
	24 Saat	48 Saat
Östrisin+ β A	474,81 (\pm 13,7) *	413,82 (\pm 4,5) *
β A	564,22 (\pm4,3)	463,83 (\pm1,4)
K(-)	463,53 (\pm 7,7)*	395,21 (\pm 2,5)*

4.20. İn vitro AD modelinde Lökominin muamelesinin nöron koruyucu etkileri

24 saat süresince 100 μ M β -amiloid ve 48 saat süresince 50 μ M β -amiloid uygulacak hücre hatlarına 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 μ g/ml konsantrasyonlarda Lökominin ile muamele edilen SH-SY5Y hücre hattında nöron koruyucu etkinin 24 saat ve 48 saat için yine 25 μ g/ml olduğu belirlendi (Şekil 4.17 ve 4.18)



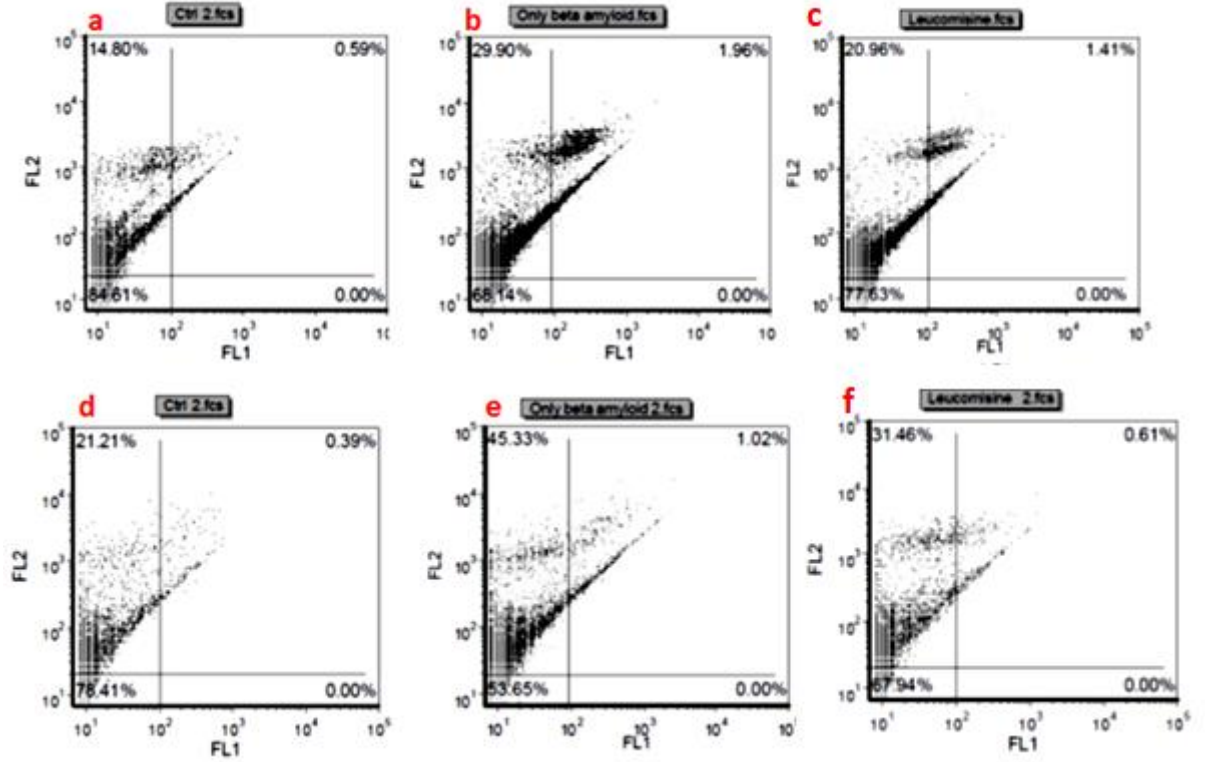
Şekil 4.17: 24 saat süresince Lökominin'in β -Amiloid uygulamasına karşı farklı konsantrasyonlarının nöroprotektif etkisi (Kısaltmalar Şekil 4.4'de ki gibidir)



Şekil 4.18: 48 saat süresince Lökomisin'in β -Amiloid uygulamasına karşı farklı konsantrasyonlarının nöroprotektif etkisi (Kısaltmalar Şekil 4.4'de ki gibidir)

4.21. β -Amiloid uygulanmış SH-SY5Y hücre hattına karşı Lökomisin'in flow sitometrik sonuçları

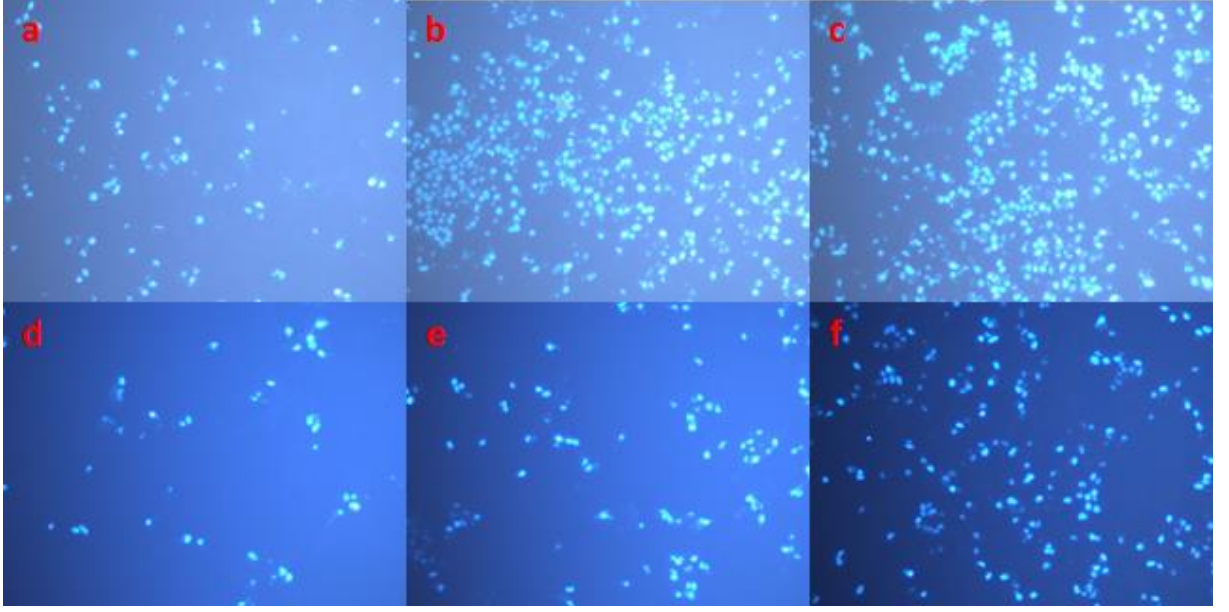
Lökomisin uygulaması, 24 saat süresince % 68,14 ile % 77,63 ve 48 saat süresince % 53,65 ile % 67,94 arasında β -amiloid ilavesine karşı hücre yaşayabilirliğini arttırdı. Hem β -amiloid maruziyetinden kaynaklanan nekroz seviyeleri hem 24 saat hem de 48 saat süresince önemli ölçüde azaldı (Şekil 4.19).



Şekil 4.19: Hücre ölüm türünü araştırmak için Annexin-V/PI flow sitometrisi (CyFlow® Cube 6, Sysmex, Almanya) analizi yapılmıştır. **a-** 24 saat süresince sadece SH-SY5Y hücreleri, **b-** 24 saat süresince sadece β -amiloid (100 uM) içeren hücre kültürü, **c-** 24 saat süresince β -Amiloid (100 uM) + Lökominisin (12,5 μ g / ml) **d-** 48 saat süresince sadece SH-SY5Y hücre kültürü, **e-** 48 Saat süresince sadece β -Amiloid (50 uM), **f-** 48 saat süresince β -Amiloid (50 uM) + Lökominisin (50 μ g / ml)

4.22. *In vitro* AD modelinde Lökominisin muamelesinin Hoechst 33258 floresan boyama sonuçları

B-amiloid ve Lökominisin maruz bırakılan SH-SY5Y hücrelerinin kromozom bütünlüğünü analiz etmek için Hoechst 33258 fluoressan boyama tekniği kullanıldı. Mikroskopik analiz, β -amiloid uygulamasının hücrelerin çekirdeğini bozduğunu ve sağlıklı hücrelerin sayısını azalttığını gösterdi. Diğer yandan, Lökominisin ilavesi, 24 saat ve 48 saat süresince β -amiloidin toksik etkisini azaltıpı gözlendi (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: Hoechst 33258 florasan boyama tekniği kromozom bütünlüğü analizi kullanılmıştır. **a-**24 saat süresince sadece β -amiloid (100 uM) içeren hücre kültürü, **b-** 24 saat süresince β -Amiloid (100 uM) + Lökömisin (12,5 μ g/ml) , **c-**24 saat süresince sadece SH-SY5Y hücreleri, **d-** 48 saat süresince β -Amiloid (50 uM) + Lökömisin (50 μ g/ml), **e-** 48 Saat süresince sadece β -Amiloid (50 uM), **f-** saat süresince sadece SH-SY5Y hücreleri.

4.23. *In vitro* AD modelinde Lökömisinin mumelesinin toplam antioksidan kapasitesi (TAK)/toplam oksidatif stres (TOD) seviyeleri ve Asetilkolinesteraz aktivitesi üzerine etkileri

Lökömisinin nöron koruyucu etkilerinin arkasındaki mekanizmayı anlamak için Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK) ve Toplam Oksidatif Stres (TOD) düzeyleri analiz edildi. Bu çalışmada, sadece Lökömisin uygulaması sonrasında TAK ve TOD düzeylerinde anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 4.7). Asetilkolinesteraz tahlili, Lökömisinin 24 saat ve 48 saat süresince β -amiloid etkileşimi sonrasında ACHE düzeylerini yüksek oranda azalttığını göstermektedir. Lökömisinin β -amiloid toksisitesine karşı nöroprotektif etkisi asetilkolinesteraz aktivitesi ile korelasyon göstermektedir (Tablo 4.8).

Tablo 4.7: Lökominin 24 ve 48 saat süresince *in vitro* uygulanmasından sonra Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK) ve Toplam Oksidatif Stres (TOD) seviyeleri.

Uygulama	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
	TAK (mmol Trolox Equiv./l)	TAK	TOD (μ mol H ₂ O ₂ Equiv./l)	TOD
Lökomin+ β A	0,994 \pm 0,05	1,48 \pm 0,04	9,63 \pm 1,60	16,32 \pm 1,98
β A	1,009 \pm 0,032	1,42 \pm 0,01	10,75 \pm 0,96	16,57 \pm 0,66
K(-)	0,95 \pm 0,026	1,52 \pm 0,03	9,67 \pm 1,32	15,52 \pm 1,23

Tablo 4.8: 24 ve 48 saat süresince Lökomin uygulama sonrasında asetilkolinesteraz Aktivitesi (μ /ml) (Kısaltmalar Şekil 4.4’de ki gibidir)

	Asetilkolinesteraz Aktivitesi (μ /ml)	
	24 Saat	48 Saat
Lökomin+ βA	479,32 (\pm 2,3)*	413,14 (\pm 3,1)*
Sadece βA	564,20(\pm4,3)	463,82 (\pm1,4)
K(-)	463,57 (\pm 7,7)*	395,21 (\pm 2,5)*

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Her ne kadar seskiterpen laktonlar karakteristik terpenoid bileşik olsalar da, bazı gymnospermlerin yanı sıra diğer anjiyosperm bitki ailelerinden de bilinirler. Şimdiye kadar keşfedilen seskiterpenler çok çeşitli kimyasal yapıları ve çeşitli biyolojik faaliyetleri ile bilinmektedir. Sitotoksik, anti-tümörjenik, anti-bakteriyel ve anti-fungal özelliklere sahip olan bileşikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Çeşitli seskiterpen laktonlarının insan ve hayvan parazitleri, böcekler ve omurgalılara toksik olduğu bilinmektedir. Bu bileşiklerin veya bunları içeren bitkilerin çoğunda insanlarda alerjik kontakt dermatitin oluşturmaktadır, ancak birçok farmakolojik aktivite için de kullanılmışlardır. Seskiterpen laktonlar ayrıca bitki büyüme düzenleyicileri olarak görev yaparlar ve birçok bitkinin alelopatik özelliklerinden sorumludurlar. Seskiterpen laktonların çeşitli aktiviteleri, bitkilerde otoburalara ve anti-fungal, anti-bakteriyel alelopatik ajanlara karşı caydırıcılık olarak evrimsel önemini göstermektedir (Akiyama, Matsuzaki, and Hayashi 2005; Knight 1995; Rodriguez, Towers, and Mitchell 1976; Sladić and Gašić 2006).

Alzheimer hastalığı, dünyada en az 30 milyon kişiyi etkilerken, erken başlangıçlı ve genetik faktörlere bağlı hastaların yalnızca % 5'ini oluştururken hastaların çoğunluğu sporadik ve geç başlangıçlıdır (65 yaş ve üzeri). Hastalık, yüz yılı aşkın bir süre önce Alois Alzheimer tarafından 1906 yılında keşfedilmiştir. Başlangıçta kısa süreli hafıza kaybı Alzheimer hastalığının başlıca belirtilerinden biridir. Aslında kısa süreli hafıza kaybı mekansal belleğe bağlıyken bu hastalarda entorinal kortekste çok sayıda hücre kaybı gözlemlenmektedir. Hastalık daha sonra konuşma zorluklarına, motor apraksiye, uzun süreli hafıza kaybına, kendine ya da kendine bakma yeteneğinde azalmaya ve nihayet hastaların kişilik, mod, davranış ve yargı değişikliklerine yol açan beynin çeşitli bölümlerine ilerlemektedir. Günümüze kadar çalışmaların birçoğu, olası hastalık etiyolojilerinin, hastalık mekanizmasının açıklığa kavuşturulmasını sağladığını ileri sürmektedir. Etiyoloji örneklerinin arasında; (1) Amiloid öncü protein kaynaklı hücre ölüm reseptörü, sinapslarda zararlı ve etkide bulunabilmektedir. (2) Asetilkolin eksikliği hücre iletimini bozdu ve kolinerjik hipotezi oluşturmaktadır. (3) Oksidatif stres, nöronal sağkalım üzerinde global etki yaratmaktadır. (4) Çinko ve bakır için metalik fazlalık

veya eksiklik de rol oynayabilmektedir. (5) Son on yılda, Alzheimer başlangıcında nöroinflamatuvar değişiklikler rolü daha fazla dikkat çekmiştir (Geula and Mesulam 1994; Masters vd. 1985; Schenk vd. 1999; Wimo vd. 2013).

Bu çalışmada, seskiterpenin nöron koruyucu etkisi SH-SY5Y farklılaşmış hücre hattı üzerinde araştırılmıştır. Ölümsüzleştirilen ve proliferatif hücre hattı SH-SY5Y, sinirbilimi ve nöroblastoma araştırmasında en sık kullanılan hücre dizilerinden biridir. Bununla birlikte, farklılaşmamış SH-SY5Y hücreleri olgun nöronlarla farklı özellikler paylaşmaktadır. Bu çalışmada, SH-SY5Y için optimize edilmiş nöronal farklılaşma protokolünü sunmaktayız, bu sadece iki adımda ve 6 gün gerektirmektedir. Farklılaştıktan sonra, hücreler artmış ATP ve plazma membran aktiviteleri seviyelerini gösterirken, enerjisel stres tepki genlerinin azaltılmasına neden olmuştur. Ayrıca, farklılaşma mitokondriyal membran potansiyelinin azalmasına ve 6-hidroksidopamin ile pertürbasyonlara karşı sağlamlığın azalmasına neden olmaktadır (Cheung vd. 2009). Öncelikle hücre canlılığı, iki bağımsız sitotoksikite testi (MTT ve LDH) ile analiz edilmiştir. Sonuçlara göre farnesene, gayzulen, östrisin ve lökomisin sırasıyla 12.5, 3.125, 3.125 ve 25 µg/ml konsantrasyonda 24 saat için koruyucu etki göstermişlerdir. Bunun yanında farnesene, gayzulen, östrisin ve lökomisin sırasıyla 50, 3.125, 3.125 ve 25 µg/ml konsantrasyonda 48 saat süresince β-amiloid toksisitesini azaltmaktadır. Farklı çalışmalarda, Compositae ailesinden vahşi bir bitkisel özü ve dört farklı seskiterpenin petazit japonicası'nın, Commiphora myrrha reçinesinden K-N (1-4) mrhterpenoidlerin izole edildiği nöroprotektif etkilere sahip olduğu da gösterilmektedir (S. Wang vd. 2013; Xu vd. 2012).

Flov sitometrisi araştırmaları, β-amiloid peptidinin nekrotik özelliklerini ortaya koymuştur. Ayrıca yakın tarihli çalışmalarda, β-amiloid toksisitesinin apoptotik bir yoldan ziyade nekrotik bir yolla oluştuğunu ve astrosit iNOS'un Aβ uyarımının kısmen IL-1β ve TNFα aracılık ettiğini ve nekroz için TRAF6-, TRAF2- ve NIK'e bağlı sinyal mekanizmasını içerdiğini göstermektedir (Akama and Van Eldik 2000; Behl vd. 1994). Seskiterpen uygulamalarının, β-amiloid uygulanan SH-SY5Y hücre kültüründe nekrozu % 5 ile % 11 oranında 24 ve 48 saatte azaltabileceği gösterilmiştir. Seskiterpenlerin Nekroz önleme ve kromozom bütünlüğünü koruma etkileri Hoechst

33258 florasan boyama ile test edilmiş ve sonuçlar, sağlıklı hücreler ve sağlam çekirdek yapılarında önemli ölçüde artışın gerçekleştiğini gözler önüne sermektedir.

Ayrıca bu çalışmada seskiterpenlerde TAK/TOD düzeyleri ve asetilkolinesteraz aktivitesini üzerine etkileri ve nöron koruyucu etkisi arasındaki bağlantılı mekanizmanın anlaşılması amaçlanmıştır. Hücre kültürü seskiterpenlere maruz kaldıktan sonra TAK düzeyi belirgin şekilde artmış ancak β -amiloid uygulanan hücre kültürü ile karşılaştırıldığında TOD düzeylerinde anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Bu sonuçlar, seskiterpenin koruma mekanizmasını anlamak için yeterli gelmemiştir; bu yüzden hücre canlılığının korumasını sağlayan mekanizma hakkında daha fazla bilgi edinmek için asetilkolinesteraz aktivitesi incelenmiştir. Sonuçlara göre, β -amiloid uygulaması kültürde asetilkolinesteraz aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmektedir. Öte yandan, β -amiloid ve östrik hücre kültürüne uygulandığında asetilkolinesteraz aktivitesi azaldığı ve neredeyse negatif kontrole yaklaştığı belirlenmiştir. Farklı çalışmalar, çeşitli seskiterpenin asetilkolinesteraz aktivitesini inhibe edebileceğini de göstermektedir (Miyazawa vd. 1998; Sharma and Gupta 2007). Ayrıca birçok analiz, çeşitli seskiterpenlerde antioksidan ve antialzheimer/nöroprotektif özellikleri göstermiştir ve bu çalışmalar bizim sonuçlarımızı doğrular niteliktedirler (Asbaghan vd. 2011; Howes, Perry, and Houghton 2003; M. 2014; Ruberto and Baratta 2000).

Sonuç olarak, seskiterpenlerin β -amiloid toksisitesine nöroprotektif etkilerinin bulunduğu sonucuna varılmaktadır. Farklılaşmış SH-SY5Y hücre kültüründe β -amiloid peptitlerin sitotoksitesini önemli ölçüde azalttığını belirledik ve ayrıca, β -amiloidden kaynaklanan nekroz, seskiterpen kullanımı ile azaltılabileceğini göstermiş olduk. Kromozom bütünlüğü, antioksidan seskiterpen uygulaması ile toksisiteden korunduğunu ve daha da önemlisi, Alzheimer hastalığında artan asetilkolinesteraz aktivitesi seskiterpen uygulaması ile inhibe edilebileceği gösterilmiştir. Her ne kadar memantin gibi anti-alzheimer ilaçları, hücre yaşayabilirliğinde seskiterpenlere kıyasla daha yüksek etkinlik gösteriyorsa da, bu çalışmamızda seskiterpenlerin Alzheimer hastaları için takviye besin kaynağı olarak kullanımının yüksek bir potansiyele sahip olduğu ilk kez önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- AA, Duah, Nsiah K, and Agyeman-Duah E. 2017. "Using Various Serological Markers to Characterize Hepatitis B - Infected Patients Who Visit Clinical Analysis Laboratory, KNUST." *Archives of Microbiology & Immunology* 1(2): 50–57.
- Abbott, Robert D. 2004. "Walking and Dementia in Physically Capable Elderly Men." *JAMA* 292(12): 1447.
<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.292.12.1447>.
- Aberle, S W vd. 2001. "Comparison of Sequence Analysis and the INNO-LiPA HBV DR Line Probe Assay for Detection of Lamivudine-Resistant Hepatitis B Virus Strains in Patients under Various Clinical Conditions." *Journal of clinical microbiology* 39(5): 1972–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11326026> (June 30, 2017).
- Adams, Ralf H., and Rüdiger Klein. 2000. "Eph Receptors and Ephrin Ligands: Essential Mediators of Vascular Development." *Trends in Cardiovascular Medicine* 10(5): 183–88.
- Akama, K T, and L J Van Eldik. 2000. "B-Amyloid Stimulation of Inducible Nitric-Oxide Synthase in Astrocytes Is Interleukin-1b- and Tumor Necrosis Factor-a (TNFa)-Dependent, and Involves a TNFa Receptor-Associated Factor- and NF-kB-Inducing Kinase-Dependent Signaling Mechanism." *Journal of Biological Chemistry* 275(11): 7918–24.
- Akhtar, M. Waseem vd. 2012. "In Vivo Analysis of mef2 Transcription Factors in Synapse Regulation and Neuronal Survival." *PLoS ONE* 7(4): e34863.
- Akiyama, Kohki, Ken-ichi Matsuzaki, and Hideo Hayashi. 2005. "Plant Sesquiterpenes Induce Hyphal Branching in Arbuscular Mycorrhizal Fungi." *Nature* 435(7043): 824–27.
- Apostolova, L G vd. 2006. "Conversion of Mild Cognitive Impairment to Alzheimer Disease Predicted by Hippocampal Atrophy Maps." *Arch Neurol* 63(5): 693–99.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16682538>.

- Arias, Jos? M. vd. 1987. "Microbial Transformations of Sesquiterpenoids: Conversion of Deoxyvulgarin by *Rhizopus Nigricans* and *Aspergillus Ochraceus*." *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (0): 471–74. <http://xlink.rsc.org/?DOI=P19870000471> (June 30, 2017).
- Arnaiz, E vd. 2001. "Impaired Cerebral Glucose Metabolism and Cognitive Functioning Predict Deterioration in Mild Cognitive Impairment." *Neuroreport* 12(4): 851–55.
- Arvanitakis, Z. vd. 2006. "Diabetes Is Related to Cerebral Infarction but Not to AD Pathology in Older Persons." *Neurology* 67(11): 1960–65.
- Asbaghian, Shiva vd. 2011. "Comparison of Volatile Constituents, and Antioxidant and Antibacterial Activities of the Essential Oils of *Thymus Caucasicus*, *T. Kotschyanus* and *T. Vulgaris*." *Natural product communications* 6(1): 137–40.
- Bader, Ammar vd. 2015. "Modulation of Cox-1, 5-, 12- And 15-Lox by Popular Herbal Remedies Used in Southern Italy against Psoriasis and Other Skin Diseases." *Phytotherapy Research* 29(1): 108–13.
- Barabash, A. vd. 2009. "APOE, ACT and CHRNA7 Genes in the Conversion from Amnestic Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging* 30(8): 1254–64.
- Barceloux, Donald G. 2008. "Review of Medical Toxicology of Natural Substances . Foods , Fungi , Medicinal Herbs , Plants and Venomous Animals." : 2001539.
- Bateman, Randall J vd. 2011. "Autosomal-Dominant Alzheimer's Disease: A Review and Proposal for the Prevention of Alzheimer's Disease." *Alzheimer's research & therapy* 3(1): 1.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21211070>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3109410>.
- Behl, C, J B Davis, F G Klier, and D Schubert. 1994. "Amyloid Beta Peptide Induces Necrosis rather than Apoptosis." *Brain Research* 645(0006–8993 (Print)): 253–64.
- Bismoussa, Abdoullah vd. 2015. "Crystal Structure of (1R,3S,8R,11R)-11-Acetyl-3,7,7-Trimethyl-10-oxatricyclo[6.4.0.01,3]dodecan-9-One." *Acta Crystallographica*

Section E: Crystallographic Communications 71(Pt 12): o1013-4.

- Braak, H., and E. Braak. 1991. "Neuropathological Staging of Alzheimer-Related Changes." *Acta Neuropathologica* 82(4): 239–59.
<http://link.springer.com/10.1007/BF00308809>.
- Brahmachari, Goutam. *Bioactive Natural Products : Chemistry and Biology*.
- Breitner, J. C. S. vd. 1994. "APOE-epsilon4 Count Predicts Age When Prevalence of AD Increases, Then Declines: The Cache County Study." *Neurology* 53(July 1999): 321–31.
- Buerger, Katharina vd. 2003. "Differentiation of Geriatric Major Depression from Alzheimer's Disease with CSF Tau Protein Phosphorylated at Threonine 231." *American Journal of Psychiatry* 160(2): 376–79.
- . 2006. "CSF Phosphorylated Tau Protein Correlates with Neocortical Neurofibrillary Pathology in Alzheimer's Disease." *Brain* 129(11): 3035–41.
- Butterfield, D A vd. 2002. "Vitamin E and Neurodegenerative Disorders Associated with Oxidative Stress." *Nutr Neurosci* 5(4): 229–39.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12168685>.
- Calder, P C, and R F Grimble. 2002. "Polyunsaturated Fatty Acids, Inflammation and Immunity." *European journal of clinical nutrition* 56 Suppl 3(3): S14-9.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12142955>.
- Cao, Huan, and Paul R. Crocker. 2011. "Evolution of CD33-Related Siglecs: Regulating Host Immune Functions and Escaping Pathogen Exploitation?" *Immunology* 132(1): 18–26.
- Carlson, Michelle C. vd. 2008. "Midlife Activity Predicts Risk of Dementia in Older Male Twin Pairs." *Alzheimer's and Dementia* 4(5): 324–31.
- Cataldo, Janine K, Judith J Prochaska, and Stanton A Glantz. 2010. "Cigarette Smoking Is a Risk Factor for Alzheimer's Disease: An Analysis Controlling for Tobacco Industry Affiliation." *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 19(2): 465–80.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2906761&tool=pmcent>

rez&rendertype=abstract.

- Chadwick, Martin, Harriet Trewin, Frances Gawthrop, and Carol Wagstaff. 2013. "Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to Plants and People." *International Journal of Molecular Sciences* 14(6): 12780–805.
- Chan, Sharon L. vd. 2008. "ATP-Binding Cassette Transporter A7 Regulates Processing of Amyloid Precursor Protein in Vitro." *Journal of Neurochemistry* 106(2): 793–804.
- Chao, L L vd. 2005. "Reduced Medial Temporal Lobe N-Acetylaspartate in Cognitively Impaired but Nondemented Patients." *Neurology* 64: 282–89.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1851679&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Chaturvedi, Devdutt vd. 2010. "Artemisinin and Its Derivatives: A Novel Class of Anti-Malarial and Anti-Cancer Agents." *Chem. Soc. Rev.* 39(2): 435–54.
- Chételat, G. vd. 2005. "Using Voxel-Based Morphometry to Map the Structural Changes Associated with Rapid Conversion in MCI: A Longitudinal MRI Study." *NeuroImage* 27(4): 934–46.
- Cheung, Yuen Ting vd. 2009. "Effects of All-Trans-Retinoic Acid on Human SH-SY5Y Neuroblastoma as in Vitro Model in Neurotoxicity Research." *NeuroToxicology* 30(1): 127–35.
- Choi, Jung-Hye vd. 2002. "Costunolide Induces Differentiation of Human Leukemia HL-60 Cells." *Archives of Pharmacal Research* 25(4): 480–84.
<http://link.springer.com/10.1007/BF02976606> (June 30, 2017).
- Christensen, Kaare vd. 2013. "Physical and Cognitive Functioning of People Older than 90 Years: A Comparison of Two Danish Cohorts Born 10 Years Apart." *The Lancet* 382(9903): 1507–13.
- Cote, Patrick, Dean E. McLaughlin, Judith G. Cohen, and John P. Blakeslee. 2003. "Dynamics of the Globular Cluster System Associated with M49 (NGC 4472): Cluster Orbital Properties and the Distribution of Dark Matter." *The Astrophysical*

- Journal* 591(2): 850–77. <http://stacks.iop.org/0004-637X/591/i=2/a=850>.
- Crehan, Helen vd. 2012. “Complement Receptor 1 (CR1) and Alzheimer’s Disease.” *Immunobiology* 217(2): 244–50.
- Cundiff, Paige E, and Stewart A Anderson. 2011. “Impact of Induced Pluripotent Stem Cells on the Study of Central Nervous System Disease.” *Current opinion in genetics & development* 21(3): 354–61.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959437X11000128> (August 5, 2015).
- Dashjamts, Tuvshinjargal vd. 2011. “Simultaneous Arterial Spin Labeling Cerebral Blood Flow and Morphological Assessments for Detection of Alzheimer’s Disease.” *Academic Radiology* 18(12): 1492–99.
- Davis, E M, and R Croteau. 2000. “Cyclization Enzymes in the Biosynthesis of Monoterpenes, Sesquiterpenes, and Diterpenes.” *Topics in Current Chemistry* 209: 53–95.
- Deane, Rashid, Zhenhua Wu, and Berislav V. Zlokovic. 2004. “RAGE (Yin) versus LRP (Yang) Balance Regulates Alzheimer Amyloid ??-Peptide Clearance through Transport across the Blood-Brain Barrier.” In *Stroke*, , 2628–31.
- DeMattos, Ronald B vd. 2004. “ApoE and Clusterin Cooperatively Suppress A?? Levels and Deposition: Evidence That ApoE Regulates Extracellular A?? Metabolism In Vivo.” *Neuron* 41(2): 193–202.
- Denk, Andrea. 2001. “Activation of NF-Kappa B via the Ikappa B Kinase Complex Is Both Essential and Sufficient for Proinflammatory Gene Expression in Primary Endothelial Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 276(30): 28451–58.
- Dishman, Rod K. vd. 2006. “Neurobiology of Exercise*.” *Obesity* 14(3): 345–56.
<http://doi.wiley.com/10.1038/oby.2006.46>.
- Duffy, Shannon L. vd. 2008. “Generation and Characterization of EphA1 Receptor Tyrosine Kinase Reporter Knockout Mice.” *Genesis* 46(10): 553–61.
- Dustin, Michael L vd. 1998. “A Novel Adaptor Protein Orchestrates Receptor

- Patterning and Cytoskeletal Polarity in T-Cell Contacts.” *Cell* 94(5): 667–77.
- Efferth, Thomas vd. 2002. “Antiviral Activity of Artesunate towards Wild-Type, Recombinant, and Ganciclovir-Resistant Human Cytomegaloviruses.” *Journal of Molecular Medicine* 80(4): 233–42.
- Elias, Penelope K., Merrill F. Elias, Michael A. Robbins, and Marc M. Budge. 2004. “Blood Pressure-Related Cognitive Decline: Does Age Make a Difference?” *Hypertension* 44(5): 631–36.
- Emery, C F, R L Schein, E R Hauck, and N R MacIntyre. 1998. “Psychological and Cognitive Outcomes of a Randomized Trial of Exercise among Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease.” *Health psychology : official journal of the Division of Health Psychology, American Psychological Association* 17(3): 232–40. [papers://a160a322-7748-499f-b1e5-c793de7b7813/Paper/p10700](https://doi.org/10.1037/0278-6133.17.3.232).
- Engelhart, M J vd. 2002. “Diet and Risk of Dementia: Does Fat Matter?: The Rotterdam Study.” *Neurology* 59(12): 1915–21.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12499483>.
- Fagan, Anne M. vd. 2006. “Inverse Relation between in Vivo Amyloid Imaging Load and Cerebrospinal Fluid Aβ₄₂ in Humans.” *Annals of Neurology* 59(3): 512–19.
- Farrer, Lindsay A. 1997. “Effects of Age, Sex, and Ethnicity on the Association Between Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease.” *JAMA* 278(16): 1349.
- Farris, Wesley vd. 2003. “Insulin-Degrading Enzyme Regulates the Levels of Insulin, Amyloid Beta-Protein, and the Beta-Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain in Vivo.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(7): 4162–67.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12634421>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12634421>.
- Ferini-Strambi, L. vd. 1990. “Clinical and Epidemiological Aspects of Alzheimer’s Disease with Presenile Onset: A Case Control Study.” *Neuroepidemiology* 9(1):

39–49.

- Ferri, Cleusa P vd. 2005. “Global Prevalence of Dementia: A Delphi Consensus Study.” *Lancet (London, England)* 366(9503): 2112–17.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16360788><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2850264>.
- Festa, Andreas vd. 2006. “The Natural Course of β -Cell Function in Nondiabetic and Diabetic Individuals: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study.” *Diabetes* 55(4): 1114–20.
- Fleisher, Adam S. vd. 2009. “Resting-State BOLD Networks versus Task-Associated Functional MRI for Distinguishing Alzheimer’s Disease Risk Groups.” *NeuroImage* 47(4): 1678–90.
- Fleminger, S. 2003. “Head Injury as a Risk Factor for Alzheimer’s Disease: The Evidence 10 Years On; a Partial Replication.” *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 74(7): 857–62. <http://jnnp.bmj.com/cgi/content/abstract/74/7/857>.
- François, Guido, and Claus M. Passreiter. 2004. “Pseudoguaianolide Sesquiterpene Lactones with High Activities against the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum*.” *Phytotherapy Research* 18(2): 184–86.
- François, Guido, Claus M Passreiter, Herman J Woerdenbag, and M Van Looveren. 1996. “Antiplasmodial Activities and Cytotoxic Effects of Aqueous Extracts and Sesquiterpene Lactones from *Neurolaena Lobata*.” *Planta medica* 62(2): 126–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8657743>.
- Franz, G vd. 2003. “Amyloid Beta 1-42 and Tau in Cerebrospinal Fluid after Severe Traumatic Brain Injury.” *Neurology* 60(9): 1457–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12743231>.
- Fukuda, Keiichi. 2001. “Development of Regenerative Cardiomyocytes from Mesenchymal Stem Cells for Cardiovascular Tissue Engineering.” *Artificial Organs* 25(3): 187–93. <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1525-1594.2001.025003187.x> (June 30, 2017).

- Fukumoto, Hiroaki vd. 2003. "Age but Not Diagnosis Is the Main Predictor of Plasma Amyloid β -Protein Levels." *Archives of Neurology* 60(7): 958.
<http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archneur.60.7.958>.
- Geula, C, and MM Mesulam. 1994. "Cholinergic Systems and Related Neuropathological Predilection Patterns in Alzheimer's Disease." In *Alzheimer Disease*, , 263–91.
- Ghisalberti, Emilio L. 2002. 26 Studies in Natural Products Chemistry *Bioactive Natural Products*. Elsevier,.
- Goveas, Joseph S. vd. 2011. "Recovery of Hippocampal Network Connectivity Correlates with Cognitive Improvement in Mild Alzheimer's Disease Patients Treated with Donepezil Assessed by Resting-State fMRI." *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 34(4): 764–73.
- Gustafson, D. R. vd. 2009. "Adiposity Indicators and Dementia over 32 Years in Sweden." *Neurology* 73(19): 1559–66.
- Ha, Tae Joung vd. 2003. "Cytotoxic Effects of Sesquiterpene Lactones from the Flowers of *Hemisteptia Lyrata* B." *Archives of pharmacal research* 26(11): 925–28.
- Harold, Denise vd. 2009. "Genome-Wide Association Study Identifies Variants at *CLU* and *PICALM* Associated with Alzheimer's Disease." *Nature Genetics* 41(10): 1088–93.
- Hartman, R E vd. 2002. "Apolipoprotein E4 Influences Amyloid Deposition but Not Cell Loss after Traumatic Brain Injury in a Mouse Model of Alzheimer's Disease." *J Neurosci* 22(23): 10083–87.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12451108.
- Holen, H. L., K. Nustad, and H-C Aasheim. 2010. "Activation of EphA Receptors on CD4+CD45RO+ Memory Cells Stimulates Migration." *Journal of leukocyte biology* 87(6): 1059–68.

- Hollingsworth, Paul vd. 2011. "Common Variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP Are Associated with Alzheimer's Disease." *Nature Genetics* 43(5): 429–35.
- Howes, Melanie Jayne R, Nicolette S L Perry, and Peter J Houghton. 2003. "Plants with Traditional Uses and Activities, Relevant to the Management of Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders." *Phytotherapy Research* 17(1): 1–18.
- Jagust, William J. vd. 2009. "Relationships between Biomarkers in Aging and Dementia." *Neurology* 73(15): 1193–99.
- Jankowsky, Joanna L. vd. 2004. "Mutant Presenilins Specifically Elevate the Levels of the 42 Residue ??-Amyloid Peptide in Vivo: Evidence for Augmentation of a 42-Specific ?? Secretase." *Human Molecular Genetics* 13(2): 159–70.
- John T. Romeo. 2003. 37 ELSEVIER SCIENCE Ltd *Recent Advances in Phytochemistry : Integrative Phytochemistry: From Ethnobotany to Molecular Ecology*. Pergamon.
- Josephs, Keith a vd. 2004. "Correlation between Antemortem Magnetic Resonance Imaging Findings and Pathologically Confirmed Corticobasal Degeneration." *Archives of neurology* 61(12): 1881–84.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15596608>.
- Kalaria, Raj N. 2010. "Vascular Basis for Brain Degeneration: Faltering Controls and Risk Factors for Dementia." *Nutrition Reviews* 68(SUPPL. 2).
- Kang, Jae Hee vd. 2015. "A Randomized Trial of Vitamin E Supplementation and Cognitive Function in Women." *Archives of internal medicine* 166(22): 2462–68.
- Katon, Wayne vd. 2015. "Effect of Depression and Diabetes Mellitus on the Risk for Dementia: A National Population-Based Cohort Study." *JAMA psychiatry* 98195: 1–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25875310>.
- Kempema, Aaron M vd. 2015. "Synthesis and Antileukemic Activities of C1-C10-Modified Parthenolide Analogues." *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 23(15): 4737–45.

- Kim, Suk Hee, Seong Hee Kang, and Bo Sun Kang. 2016. "Therapeutic Effects of Dihydroartemisinin and Transferrin against Glioblastoma." *Nutrition Research and Practice* 10(4): 393–97.
- Kivipelto, M vd. 2001. "Midlife Vascular Risk Factors and Late-Life Mild Cognitive Impairment: A Population-Based Study." *Neurology* 56(12): 1683–89.
- Knight, David W. 1995. "Feverfew: Chemistry and Biological Activity." *Natural Product Reports* 12(3): 271–76.
- Kraft, Carola vd. 2003. "In Vitro Antiplasmodial Evaluation of Medicinal Plants from Zimbabwe." *Phytotherapy Research* 17(2): 123–28.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12601673> (June 30, 2017).
- Kuo, Yu-Min vd. 1998. "Elevated Low-Density Lipoprotein in Alzheimer's Disease Correlates with Brain A β 1–42 Levels." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 252(3): 711–15.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X98996528>.
- Kuusisto, J vd. 1994. "Association of Apolipoprotein E Phenotypes with Late Onset Alzheimer's Disease: Population Based Study." *BMJ (Clinical research ed.)* 309(6955): 636–38.
- Lai, Henry, and Narendra P Singh. 1995. "Selective Cancer Cell Cytotoxicity from Exposure to Dihydroartemisinin and Holotransferrin." *Cancer Letters* 91(1): 41–46.
- Lambert, Jean-Charles vd. 2013. "Meta-Analysis of 74,046 Individuals Identifies 11 New Susceptibility Loci for Alzheimer's Disease." *Nature Genetics* 45(12): 1452–58.
- Lee, Joseph H. vd. 2011. "Identification of Novel Loci for Alzheimer Disease and Replication of CLU, PICALM, and BIN1 in Caribbean Hispanic Individuals." *Archives of Neurology* 68(3): 320–28.
- Lee, Wonyoung, and Dong Gun Lee. 2014. "Lycopene-Induced Hydroxyl Radical Causes Oxidative DNA Damage in Escherichia Coli." *Journal of Microbiology*

- and Biotechnology* 24(9): 1232–37.
- Lehtonen, Sanna, Fang Zhao, and Eero Lehtonen. 2002. “CD2-Associated Protein Directly Interacts with the Actin Cytoskeleton.” *American journal of physiology. Renal physiology* 283(4): F734-43.
- De Leon, Mony J. vd. 2007. “Imaging and CSF Studies in the Preclinical Diagnosis of Alzheimer’s Disease.” In *Annals of the New York Academy of Sciences*, , 114–45.
- Lifongo, Lydia L vd. 2014. “A Bioactivity Versus Ethnobotanical Survey of Medicinal Plants from Nigeria, West Africa.” *Natural Products and Bioprospecting* 4(1): 1–19.
- Luchsinger, José Alejandro. 2008. “Adiposity, Hyperinsulinemia, Diabetes and Alzheimer’s Disease. An Epidemiological Perspective.” *European Journal of Pharmacology* 585(1): 119–29.
- Lyss, G vd. 1998. “The Anti-Inflammatory Sesquiterpene Lactone Helenalin Inhibits the Transcription Factor NF-kappaB by Directly Targeting p65.” *The Journal of biological chemistry* 273(50): 33508–16.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9837931> (June 30, 2017).
- Lyss, G, T J Schmidt, I Merfort, and H L Pahl. 1997. “Helenalin, an Anti-Inflammatory Sesquiterpene Lactone from Arnica, Selectively Inhibits Transcription Factor NF-kappaB.” *Biological chemistry* 378(September): 951–61.
- M., Mathew. 2014. “In Vitro Evaluation of Anti-Alzheimer Effects of Dry Ginger (*Zingiber Officinale* Roscoe) Extract.” *Indian Journal of Experimental Biology* 52(6): 606–12.
- Makena Ntimi, Carolindah, Rozita Rosli, Aishah Adam, and Norshariza Nordin. 2013. “An Overview of in Vitro Research Models for Alzheimer’s Disease (AD).” *Regenerative Research*. <http://psasir.upm.edu.my/29707/> (August 6, 2015).
- Makiyi, Edward F vd. 2009. “Iso-Seco-Tanapartholides: Isolation, Synthesis and Biological Evaluation.” *European Journal of Organic Chemistry* 2009(33): 5711–15.

- Marles, Robin J vd. 1995. "Sesquiterpene Lactones Revisited." *Phytochemistry of Medicinal Plants* 6: 333–56.
- Martin, Diane M, Jonathan Gershenzon, and Jörg Bohlmann. 2003. "Induction of Volatile Terpene Biosynthesis and Diurnal Emission by Methyl Jasmonate in Foliage of Norway Spruce." *Plant Physiology* 132(3): 1586–99.
- Masters, CL vd. 1985. "Amyloid Plaque Core Protein in Alzheimer Disease and Down Syndrome." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82: 4245–49.
- Matthews, Fiona E vd. 2013. "A Two-Decade Comparison of Prevalence of Dementia in Individuals Aged 65 Years and Older from Three Geographical Areas of England: Results of the Cognitive Function and Ageing Study I and II." *The Lancet* 382(9902): 1405–12.
- Mattsson, N vd. 2009. "CSF Biomarkers and Incipient Alzheimer Disease in Patients with Mild Cognitive Impairment." *Jama* 302(4): 385–93.
http://jama.jamanetwork.com/data/Journals/JAMA/4473/joc90069_385_393.pdf.
- Mayeux, R vd. 1995. "Synergistic Effects of Traumatic Head Injury and Apolipoprotein- Epsilon 4 in Patients with Alzheimer's Disease 1550." *Neurology* 45(3 Pt 1): 555–57.
- Mayeux, Richard vd. 1999. "Plasma Amyloid β -Peptide 1-42 and Incipient Alzheimer's Disease." *Annals of Neurology* 46(3): 412–16.
- McGeer, P L, and J Rogers. 1992. "Anti-Inflammatory Agents as a Therapeutic Approach to Alzheimer's Disease." *Neurology* 42(2): 447–49.
- McKhann, G vd. 1984. "Clinical Diagnosis of Alzheimer's Disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the Auspices of the Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease." *Neurology* 34(7): 939–44.
- Meschia, J. F. vd. 2014. "Guidelines for the Primary Prevention of Stroke: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association." *Stroke* 45(12): 3754–3832.

- <http://stroke.ahajournals.org/content/45/12/3754.abstract>.
- Miyazawa, Mitsuo, Hitomi Watanabe, Kazuyasu Umemoto, and Hiromu Kameoka. 1998. "Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Essential Oils of Mentha Species." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 3431–3434.
- Modzelewska, Aneta, Surojit Sur, Srinivas K Kumar, and Saeed R Khan. 2005. "Sesquiterpenes: Natural Products That Decrease Cancer Growth." *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents* 5: 477–99.
- Mohammadinejad, Reza, Samaneh Karimi, Siavash Iravani, and Rajender S. Varma. 2015. "Plant-Derived Nanostructures: Types and Applications." *Green Chem.* 18: 20–52. <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5GC01403D>.
- Moreira, Paula vd. 2005. "Alzheimers Disease and Oxidative Stress: The Old Problem Remains Unsolved." *Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents* 5(1): 51–62.
<http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmccnsa/2005/00000005/00000001/art00007> (August 6, 2015).
- Musarrat, J., Aqil, F., Ahmad, I. 2006. *Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs*. Wiley-VCH.
- Myers, R H vd. 1996. "Apolipoprotein E epsilon4 Association with Dementia in a Population-Based Study: The Framingham Study." *Neurology* 46(3): 673–77.
- Nagano, Seiichi vd. 2004. "Peroxidase Activity of Cyclooxygenase-2 (COX-2) Cross-Links β -Amyloid ($A\beta$) and Generates $A\beta$ -COX-2 Hetero-Oligomers That Are Increased in Alzheimer's Disease." *Journal of Biological Chemistry* 279(15): 14673–78.
- Nguyen, Truong LX vd. 2010. "Neuroprotection Signaling Pathway of Nerve Growth Factor and Brain-Derived Neurotrophic Factor against Staurosporine Induced Apoptosis in Hippocampal H19-7 Cells." *Experimental and Molecular Medicine* 42(8): 583. <http://dx.doi.org/10.3858/emm.2010.42.8.060> (June 29, 2015).
- Nuutinen, Tapio, Tiina Suuronen, Anu Kauppinen, and Antero Salminen. 2009.

- “Clusterin: A Forgotten Player in Alzheimer’s Disease.” *Brain Research Reviews* 61(2): 89–104. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165017309000794> (July 4, 2017).
- Ohhini, M vd. 1997. “Anthraceneinduced Hamster Cheek Pouch Carcinogenesis.” *Jpn. J. Cancer Res.*
- Okello, A. vd. 2009. “Microglial Activation and Amyloid Deposition in Mild Cognitive Impairment: A PET Study.” *Neurology* 72(1): 56–62.
- Osborne, Colin P, and David J Beerling. 2006. “Nature’s Green Revolution: The Remarkable Evolutionary Rise of C4 Plants.” *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 361(1465): 173–94. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16553316> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1626541>.
- Pant, Saumya vd. 2009. “AMPH-1/Amphiphysin/Bin1 Functions with RME-1/Ehd1 in Endocytic Recycling.” *Nature Cell Biology* 11(12): 1399–1410.
- Park, C R. 2001. “Cognitive Effects of Insulin in the Central Nervous System.” *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 25(4): 311–23. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11445137.
- Park, Kyung Won vd. 2002. “Chemical and Electronic Effects of Ni in Pt/Ni and Pt/Ru/Ni Alloy Nanoparticles in Methanol Electrooxidation.” *Journal of Physical Chemistry B* 106(8): 1869–77.
- Phytochemical Society of Europe., and Phytochemical Society of North America. 2003, *Phytochemistry*. Pergamon Press.
- Picman, Anna K, Eloy Rodriguez, and G. H N Towers. 1979. “Formation of Adducts of Parthenin and Related Sesquiterpene Lactones with Cysteine and Glutathione.” *Chemico-Biological Interactions* 28(1): 83–89.
- Pierpoint, W S. 1994. “Salicylic Acid and Its Derivatives in Plants: Medicines, Metabolites and Messenger Molecules.” *Advances in Botanical Research* Volume

- 20: 163–235.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065229608602177>.
- Plassman, B. L. vd. 2000. “Documented Head Injury in Early Adulthood and Risk of Alzheimer’s Disease and Other Dementias.” *Neurology* 55(8): 1158–66.
<http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/WNL.55.8.1158>.
- Portelius, Erik, Ann Westman-Brinkmalm, Henrik Zetterberg, and Kaj Blennow. 2006. “Determination of ??-Amyloid Peptide Signatures in Cerebrospinal Fluid Using Immunoprecipitation-Mass Spectrometry.” *Journal of Proteome Research* 5(4): 1010–16.
- Raffaitin, Christelle vd. 2009. “Metabolic Syndrome and Risk for Incident Alzheimer’s Disease or Vascular Dementia: The Three-City Study.” *Diabetes care* 32(1): 169–74.
- Rasul, Azhar, Saima Parveen, and Tonghui Ma. 2012. “Costunolide: A Novel Anti-Cancer Sesquiterpene Lactone.” *Bangladesh Journal of Pharmacology* 7(1): 6–13.
- Reitz, Christiane vd. 2013. “Variants in the ATP-Binding Cassette Transporter (ABCA7), Apolipoprotein E ϵ 4, and the Risk of Late-Onset Alzheimer Disease in African Americans.” *JAMA* 309(14): 1483.
- Ringman, J. M. vd. 2008. “Biochemical Markers in Persons with Preclinical Familial Alzheimer Disease.” *Neurology* 71(2): 85–92.
- Robles, Mario, Manuel Aregullin, Jan West, and Eloy Rodriguez. 1995. “Recent Studies on the Zoopharmacognosy, Pharmacology and Neurotoxicology of Sesquiterpene Lactones*.” *Planta Medica* 61(3): 199–203. <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2006-958055>.
- Rocca, Walter A. vd. 2011. “Trends in the Incidence and Prevalence of Alzheimer’s Disease, Dementia, and Cognitive Impairment in the United States.” *Alzheimer’s & Dementia* 7(1): 80–93.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1552526010025045> (July 4, 2017).
- Rodriguez, E, GHN Towers, and JC Mitchell. 1976. “Biological Activities of

- Sesquiterpene Lactones.” *Phytochemistry* 15: 1573–80.
- Rogaeva, Ekaterina vd. 2007. “The Neuronal Sortilin-Related Receptor SORL1 Is Genetically Associated with Alzheimer Disease.” *Nature Genetics* 39(2): 168–77.
- Romero, Marta R. vd. 2005. “Effect of Artemisinin/artesunate as Inhibitors of Hepatitis B Virus Production in An ‘in Vitro’ replicative System.” *Antiviral Research* 68(2): 75–83.
- Rowe, Christopher C. vd. 2007. “Imaging Beta-Amyloid Burden in Aging and Dementia.” *Neurology* 68(20): 1718–25.
<http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/01.wnl.0000318046.06992.24%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17502554>.
- Ruberto, Giuseppe, and Maria T Baratta. 2000. “Antioxidant Activity of Selected Essential Oil Components in Two Lipid Model Systems.” *Food chemistry* 69.
- Sakamoto, A vd. 2011. “Expression Profiling of the Ephrin (EFN) and Eph Receptor (EPH) Family of Genes in Atherosclerosis-Related Human Cells.” *The Journal of international medical research* 39(2): 522–27.
- Salehi, Ahmad, Jean-Dominique Delcroix, and William C Mobley. 2003. “Traffic at the Intersection of Neurotrophic Factor Signaling and Neurodegeneration.” *Trends in neurosciences* 26(2): 73–80.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166223602000383> (August 5, 2015).
- Scarmeas, Nikolaos vd. 2009. “Mediterranean Diet and Mild Cognitive Impairment.” *Archives of Neurology* 66(2).
<http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archneurol.2008.536>.
- Scarmeas, Nikolaos, Yaakov Stern, Richard Mayeux, and Jose A. Luchsinger. 2006. “Mediterranean Diet, Alzheimer Disease, and Vascular Mediation.” *Archives of Neurology* 63(12): 1709.
<http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archneur.63.12.noc60109>.

- Schenk, D vd. 1999. "Immunization with Amyloid-Beta Attenuates Alzheimer-Disease-like Pathology in the PDAPP Mouse." *Nature* 400(6740): 173–77.
- Schrijvers, E. M. C. vd. 2012. "Is Dementia Incidence Declining? Trends in Dementia Incidence since 1990 in the Rotterdam Study." *Neurology* 78(19): 1456–63.
- Schupf, N vd. 2001. "Elevated Plasma Amyloid Beta-Peptide 1-42 and Onset of Dementia in Adults with Down Syndrome." *Neurosci Lett* 301(3): 199–203.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11257432.
- Selkoe, Dennis J. 2008. "Soluble Oligomers of the Amyloid Beta-Protein Impair Synaptic Plasticity and Behavior." *Behavioural brain research* 192(1): 106–13.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432808000831> (February 25, 2015).
- Sells, M A, M L Chen, and George Acs. 1987. "Production of Hepatitis B Virus Particles in Hep G2 Cells Transfected with Cloned Hepatitis B Virus DNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(4): 1005–9.
- Sharma, Rashmi, and Rajendra Gupta. 2007. "Cyperus Rotundus Extract Inhibits Acetylcholinesterase Activity from Animal and Plants as Well as Inhibits Germination and Seedling Growth in Wheat and Tomato." *Life Sciences* 80(24–25): 2389–92.
- Sheehan, Maeve vd. 2002. "Parthenolide, an Inhibitor of the Nuclear Factor-kappaB Pathway, Ameliorates Cardiovascular Derangement and Outcome in Endotoxic Shock in Rodents." *Molecular pharmacology* 61(5): 953–63.
- Sheline, Yvette I., and Marcus E. Raichle. 2013. "Resting State Functional Connectivity in Preclinical Alzheimer's Disease." *Biological Psychiatry* 74(5): 340–47.
- Shen, Yong vd. 2006. "Distinct Destructive Signal Pathways of Neuronal Death in Alzheimer's Disease." *Trends in molecular medicine* 12(12): 574–79.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471491406002231> (August 5, 2015).

- SHEP. 1991. "Prevention of Stroke by Antihypertensive Drug Treatment in Older Persons with Isolated Systolic Hypertension: Final Results of the Systolic Hypertension in the Elderly Program (Shep)." *JAMA* 265(24): 3255–64.
<http://dx.doi.org/10.1001/jama.1991.03460240051027>.
- Shi, Yichen vd. 2012. "A Human Stem Cell Model of Early Alzheimer's Disease Pathology in Down Syndrome." *Science translational medicine* 4(124): 124ra29.
<http://stm.sciencemag.org/content/4/124/124ra29.short> (August 6, 2015).
- Shin, Hyun-Mo vd. 2004. "Inhibitory Action of Novel Aromatic Diamine Compound on Lipopolysaccharide-Induced Nuclear Translocation of NF- κ B without Affecting I κ B Degradation." *FEBS Letters* 571(1–3): 50–54.
<http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2004.06.056> (June 30, 2017).
- Shin, Jonghan, Vladimir Kepe, Jorge R. Barrio, and Gary W. Small. 2011. "The Merits of FDDNP-PET Imaging in Alzheimer's Disease." *Advances in Alzheimer's Disease* 2: 265–75.
- Skaltsa, H vd. 2000. "Sesquiterpene Lactones from *Centaurea Thessala* and *Centaurea Attica*. Antifungal Activity." *Phytochemistry* 55(8): 903–8.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11140522> (June 30, 2017).
- Sladić, Dušan, and Miroslav J. Gašić. 2006. "Reactivity and Biological Activity of the Marine Sesquiterpene Hydroquinone Avarol and Related Compounds from Sponges of the Order Dictyoceratida." *Molecules* 11(1): 1–33.
- Slooter, A J vd. 1998. "Risk Estimates of Dementia by Apolipoprotein E Genotypes from a Population-Based Incidence Study: The Rotterdam Study." *Archives of neurology* 55(7): 964–68.
- Sperling, Reisa. 2011. "Potential of Functional MRI as a Biomarker in Early Alzheimer's Disease." *Neurobiology of aging* 32 Suppl 1(Suppl 1): S37-43.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197458011003460%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22078171%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3233699>.
- Stoppelkamp, Sandra vd. 2011. "In Vitro Modelling of Alzheimer's Disease:

- Degeneration and Cell Death Induced by Viral Delivery of Amyloid and Tau.” *Experimental neurology* 229(2): 226–37.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001448861100032X> (July 31, 2015).
- Sun, Kai Hui, Yolanda De Pablo, Fabien Vincent, and Kavita Shah. 2008. “Deregulated Cdk5 Promotes Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction.” *Journal of Neurochemistry* 107(1): 265–78.
- Tanaka, Nobukiyo, Sumiko Abe-Dohmae, Noriyuki Iwamoto, and Shinji Yokoyama. 2011. “Roles of ATP-Binding Cassette Transporter A7 in Cholesterol Homeostasis and Host Defense System.” *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 18(4): 274–81.
- Tannenbaum, S R. 1989. “Preventive Action of Vitamin C on Nitrosamine Formation.” *International journal for vitamin and nutrition research. Supplement = Internationale Zeitschrift fur Vitamin- und Ernährungsforschung. Supplement* 30: 109–13.
- Tebar, F, S K Bohlander, and A Sorkin. 1999. “Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid Leukemia (CALM) Protein: Localization in Endocytic-Coated Pits, Interactions with Clathrin, and the Impact of Overexpression on Clathrin-Mediated Traffic.” *Molecular biology of the cell* 10(8): 2687–2702.
- Teipel, Stefan J. vd. 2003. “Relation of Corpus Callosum and Hippocampal Size to Age in Nondemented Adults with Down’s Syndrome.” *American Journal of Psychiatry* 160(10): 1870–78.
- Thies, William, and Laura Bleiler. 2013. “2013 Alzheimer’s Disease Facts and Figures.” *Alzheimer’s & dementia : the journal of the Alzheimer’s Association* 9(2): 208–45.
- Traber, M G, der van V, A Z Reznick, and C E Cross. 2000. “Tobacco-Related Diseases. Is There a Role for Antioxidant Micronutrient Supplementation?” *Clin Chest Med* 2000 Mar;2(1): 173–87.
- Uchi, Hiroshi vd. 2002. “The Sesquiterpene Lactone Parthenolide Inhibits LPS- but Not

- TNF- α -Induced Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells by Inhibition of the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 110(2): 269–76.
- Veenman, L, and M Gavish. 2000. “Peripheral-Type Benzodiazepine Receptors: Their Implication in Brain Disease.” *Drug Development Research* 50(3–4): 355–70.
- Vitale, C vd. 1999. “Engagement of p75/AIRM1 or CD33 Inhibits the Proliferation of Normal or Leukemic Myeloid Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(26): 15091–96.
- Voko, Z vd. 2003. “Dietary Antioxidants and the Risk of Ischemic Stroke: The Rotterdam Study.” *Neurology* 61(9): 1273–75.
- Vongvanich, Namphung vd. 2006. “Antiplasmodial, Antimycobacterial, and Cytotoxic Principles from Camchaya Calcareo.” *Planta Medica* 72(15): 1427–30.
- Wang, C X vd. 2006. “Cyclin-Dependent Kinase-5 Prevents Neuronal Apoptosis through ERK-Mediated Upregulation of Bcl-2.” *Cell Death and Differentiation* 13(7): 1203–12.
- Wang, Shaonan vd. 2013. “Isolation, Characterization, and Neuroprotective Activities of Sesquiterpenes from *Petasites Japonicus*.” *Food Chemistry* 141(3): 2075–82.
- Watson, G S vd. 2003. “Insulin Increases CSF A-beta42 Levels in Normal Older Adults 131.” *Neurology* 60(12): 1899–1903.
<http://www.neurology.org/content/60/12/1899.abstract>.
- Wen, Yi vd. 2007. “Cdk5 Is Involved in NFT-like Tauopathy Induced by Transient Cerebral Ischemia in Female Rats.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1772(4): 473–83.
- Wenshu Wang, and Kun Gao, and Zhongjian Jia*. 2002. “New Eremophilanolides from *Ligulariopsis Shichuana*.” <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np0105351> (June 30, 2017).
- Whitmer, R. A. vd. 2008. “Central Obesity and Increased Risk of Dementia More than Three Decades Later.” *Neurology* 71(14): 1057–64.

- Wiat, Christophe. 2012. *Medicinal Plants of China, Korea, and Japan : Bioresources for Tomorrow's Drugs and Cosmetics*. CRC Press.
- Wimo, Anders vd. 2013. "The Worldwide Economic Impact of Dementia 2010." *Alzheimer's and Dementia* 9(1): 1–11.
- Wollmer, M. Axel vd. 2007. "Association Study of Cholesterol-Related Genes in Alzheimer's Disease." *Neurogenetics* 8(3): 179–88.
- Wong, Hector R., and Ingrid Y. Menendez. 1999. "Sesquiterpene Lactones Inhibit Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Expression in Cultured Rat Aortic Smooth Muscle Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 262(2): 375–80.
- WRIGHT, PATRICK M. vd. 2001. "MEASUREMENT ERROR IN RESEARCH ON HUMAN RESOURCES AND FIRM PERFORMANCE: ADDITIONAL DATA AND SUGGESTIONS FOR FUTURE RESEARCH." *Personnel Psychology* 54(4): 875–901.
- Xu, J vd. 2012. "Four New Sesquiterpenes from Commiphora Myrrha and Their Neuroprotective Effects." *Fitoterapia*.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X12000822> (July 2, 2017).
- Yagi, Takuya vd. 2011. "Modeling Familial Alzheimer's Disease with Induced Pluripotent Stem Cells." *Human molecular genetics* 20(23): 4530–39.
<http://hmg.oxfordjournals.org/content/20/23/4530.short> (July 1, 2015).
- Yamazaki, T. vd. 2009. "EphA1 Interacts with Integrin-Linked Kinase and Regulates Cell Morphology and Motility." *Journal of Cell Science* 122(2): 243–55.
- Zhang, Li vd. 2010. "Neuroprotective Effects of Salidroside against Beta-Amyloid-Induced Oxidative Stress in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells." *Neurochemistry international* 57(5): 547–55.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018610002160> (August 5, 2015).

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Eleşkirt'te doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini İzmir'de tamamladı. 2011 yılında İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Programını başarı ile bitirdi. 2011 yılında İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde başladığı Yüksek Lisans Eğitimini, 2013 yılında tamamladı. Doktora eğitimine Erzurum Teknik Üniversitesi'nde 2014 yılında başlamıştır.