

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ECZACILIK FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SHSY-5Y HÜCRELERİNDE GİNGEROL VE  
SHOGAOL'ÜN AMİLOİD-BETA TOKSİSİTESİ  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Hazırlayan  
Mehmet Kaan TİRYAKİ**

**Danışman  
Doç. Dr. M. Betül AYCAN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Ağustos 2013  
KAYSERİ**

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ECZACILIK FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SHSY-5Y HÜCRELERİNDE GİNGEROL VE  
SHOGAOL'ÜN AMİLOİD-BETA TOKSİSİTESİ  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Hazırlayan  
Mehmet Kaan TİRYAKİ**

**Danışman  
Doç. Dr. M. Betül AYCAN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Ağustos 2013  
KAYSERİ**

## **BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK**

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Mehmet Kaan Tiryaki

İmza:

**YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI**

“SHSY-5Y hücrelerinde ginderol ve shogoalün amyloid-beta toksisitesi üzerine etkileri” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

M. Kaan Tiryaki

İmza  


Danışman

Doç. Dr. M. Betül Aycan

İmza  


FARMAKOLOJİ ABD Başkanı

Doç. Dr. M. Betül Aycan


İmza


**KABUL ONAY SAYFASI**

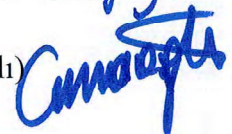
Doç. Dr. M. Betül Aycan danışmanlığında **M. Kaan Tiryaki** tarafından hazırlanan “SHSY-5Y hücrelerinde gingerol ve shogaolün amyloid-beta toksisitesi üzerine etkileri” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalında **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

19 / 08 / 2013

**JÜRİ:**

Danışman : Doç. Dr. M. Betül AYCAN (Farmakoloji Anabilim Dalı) 

Üye : Yrd. Doç. Dr. İ. İpek BOŞELMEZ (F. Toksikoloji Anabilim Dalı) 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ahmet Cumaoglu (Biyokimya Anabilim Dalı) 

**ONAY:**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ..... tarih ve  
..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... / ..... / .....

.....

Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Lisans mezunu olarak geldiğim Farmakoloji Anabilim Dalı'nda her Őeyden önce Anabilim Dalı'na adaptasyonumda, çalıŐmalarımı yönlendirmesinde, araŐtırmalarımın her aŐamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar insani iliŐkilerde de sonsuz desteğiyle gelişmeme katkıda bulunan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Betül Aycan'a, çalıŐmalarım süresince birçok fedakârlıklar gösterip beni destekleyerek her an yanımda olan arkadaşlarıma, yaşamımın her döneminde bana duydukları güven için aileme en derin duygularla teşekkür ederim.

M. Kaan Tiryaki

Kayseri, Ağustos 2013

## SHSY-5Y HÜCRELERİNDE GİNGEROL ve SHOGAOL'ün AMİLOİD-BETA TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

**Mehmet Kaan Tiryaki**  
**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü**  
**Eczacılık Farmakoloji Anabilim Dalı**  
**Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2013**  
**Danışman: Doç. Dr. M. Betül Aycan**

### ÖZET

Alzheimer hastalığı (AH), kronik nörodejeneratif bir hastalıktır. Her yıl dünyada ortalama 5 milyon yeni AH olgusu geliştiği tahmin edilmektedir. 60-65 yaş arasında olan popülasyonda görülme sıklığı yaklaşık %0.1 iken 85 yaşın üzerinde görülme sıklığı %47'ye kadar çıkar. Yaşlanmakta olan dünya nüfusu göz önüne alındığında günümüzün en sık rastlanan hastalıkları arasında yer alan hastalığın fizyopatolojisinden; nörofibriler yumak (NFY) oluşumu, bileşeni amiloid beta proteini (A $\beta$ ) olan senil amiloid plaklar (SP) ve sinaps-nöron kaybının sorumlu olduğu düşünülmektedir. Son çalışmalar hastalığın patolojisinde Glikojen sentaz kinaz-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) enziminin önemli rolü olabileceğini göstermiştir. O nedenle çalışmamızda, *Zingiber officinale* bitkisinin ana saf maddelerinden olan gingerol ve shogaolün A $\beta$  toksisitesindeki koruyucu rolünün ve bu rolünde GSK-3 $\beta$  inhibisyonunun etkisinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

Çalışmada SHSY-5Y nöroblastoma hücrelerinde A $\beta$  oligomerleri ve agregatları ile oluşturulan nörotoksitede 0.01-100 $\mu$ M doz aralığında gingerol ve shogaolün koruyucu etkileri gerçek zamanlı hücre analizörü XCelligence cihazı ile analiz edilmiştir. Ayrıca aynı dozlarda her iki maddenin GSK-3 $\beta$  enzimi inhibisyonu yapıp yapmadıkları luminometrik olarak tayin edilmiştir ve çalışmada sonuçlar, daha önce her iki etkisi de bilinen 4 $\mu$ M ferulik asitin etkileri ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerde SPSS 15.0 programı üzerinden Oneway ANOVA ve *Student-t testi* kullanılmıştır.

Çalışma sonuçlarına göre, hem A $\beta$  agregatı hem de oligomeri ile oluşturulan toksitede gingerol de shogaol de hücre indeksini artırmış ancak gingerol için bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmazken, shogaolün düşük dozları için doza bağımlı ve anlamlı iken yüksek dozlarının toksik olduğu gözlenmiştir. Ayrıca enzim inhibisyonunun yüksek olduğu konsantrasyonlarda hücre indeksi artmış yani maddelerin hücreler üzerindeki

koruyucu etkileri artmış, inhibisyonun az olduğu dozlarda ise hücrelerdeki koruyucu etkinlik azalmış hatta shogaolün yüksek dozlarında toksisiteye neden oldukları gözlenmiştir.

Sonuç olarak, gingerolün bütün dozları için shogaolün de düşük dozları için hem hücre indeksi artışında hem de enzim inhibisyonunda ferulik asitten daha etkili olduğu ve koruyucu etkilerinin enzim inhibisyonu ile ilişkilendirilebileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Gingerol; shogaoll; amiloid beta; ferulik asit ; GSK-3 $\beta$

## THE EFFECTS OF GINGEROL AND SHOGAOL ON THE AMYLOID BETA TOXICITY ON SHSY-5Y CELLS

**Mehmet Kaan Tiryaki**  
**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences**  
**Department of Pharmacology**  
**Master's Thesis, August 2013**  
**Supervisor: Assoc. Prof. M. Betül Aycan**

### ABSTRACT

Alzheimer disease (AD), is a chronic neurodegenerative disease. Every year around 5 million new patients are diagnosed with AD. The prevalence of the disease increases from 0.1% at an age of 60-65 to 47% at the age of 85. Considering the aging population in the world, being one of the most common diseases of nowadays, the neurofibrillary tangles, senile amyloid plaques which is mainly formed by amyloid beta protein and neural loss is thought to be responsible from its pathophysiology. Recent studies have shown GSK-3 $\beta$  enzyme can also have a role in its pathology. For this reason, two main components of *Zingiber Officinale*, gingerol and shogaol were used to see whether they have protective effects on A $\beta$  toxicity and to clarify its relation to their GSK-3 $\beta$  inhibitory effects.

In this study, the protective effects of gingerol and shogaol at a dose range of 0.01-100  $\mu$ M in neurotoxicity formed by A $\beta$  oligomers and aggregates in SHSY-5Y neuroblastoma cell lines were analyzed by real-time cell analyzer XCelligence. Furthermore the GSK-3 $\beta$  inhibitory effects of the two compounds were measured by luminometer and the results were compared by ferulic acid which was shown to have both effects. Statistical analyses were performed by SPSS 15.0 program using Oneway ANOVA ve *Student-t tests*.

According to the results, in the toxicity formed even by A $\beta$  aggregate and oligomers both gingerol and shogaol increased the cell index. However, these results were not significant for gingerol but significant for shogaol's low doses whereas the high doses of shogaol were found to be toxic on these cell line. Furthermore the more the inhibitory effect on GSK-3 $\beta$  increase the more the components increase the cell index. In the

doses of inhibitory effects are low the protection decreases and for high doses of shogaol even it turns to toxicity.

As a result, for all doses of gingerol and low doses of shogaol, they are found to be more potent in improving cell index and inhibiting GSK-3 $\beta$  enzyme as compared to ferulic acid. Their protective effects can also be correlated to their GSK-3 $\beta$  inhibitory effects.

**Keywords:** Gingerol; Shogaol; amyloid beta, ferulic acid; GSK-3 $\beta$

## İÇİNDEKİLER

### SHSY-5Y HÜCRELERİNDE GİNGEROL VE SHOGAOL'ÜN AMILOİD-BETA TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	iii
KABUL ONAY SAYFASI.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET .....	vi
ABSTRACT .....	viii
İÇİNDEKİLER .....	x
KISALTMALAR .....	xii
TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. ALZHEIMER HASTALIĞININ HİSTOPATOLOJİSİ.....	3
2.1.1. Nörofibriler Yumaklar .....	4
2.1.2. Amiloid Plaklar .....	4
2.1.3. Nöron Kaybı.....	8
2.1.4. Kolinergic Kayıp.....	10
2.1.5. Serotonergic Kayıp .....	11
2.1.6. Dopaminergic Kayıp.....	11
2.2. ALZHEIMER HASTALIĞINDA AMİLOİDİN ROLÜ .....	11
2.3. <i>Zingiber officinale</i> .....	12
2.3.1. Kullanım Alanları.....	13
2.3.2. Bileşimi .....	13
2.3.3. Ferulik Asit .....	14
2.4. GLİKOJEN SENTAZ KİNAZ 3-β ENZİMİ (GSK3β).....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	16
3.1. MATERYAL .....	16

3.1.1. Hücre Kültürü.....	16
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	16
3.1.3. Kullanılan Cihazlar .....	17
3.2. METOD .....	18
3.2.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması ve Yapılan İşlemler.....	18
3.2.2. Gerçek Zamanlı Hücre Analizöründe Hücre Sayımı ve Canlılığı Testi .....	18
3.2.3. Amiloid Beta Oligomerlerinin ve Agregatlarının Hazırlanması.....	19
3.2.4. GSK-3 $\beta$ İnhibisyonunun İn Vitro Olarak Değerlendirilmesi.....	19
3.2.5. İstatistiksel analiz.....	20
4. BULGULAR.....	21
4.1. AMİLOİD BETA AGREGATLARININ HÜCRELERE UYGULANMASINDAN SONRA GİNGEROL ve SHOGAOL'ÜN ETKİSİ.....	21
4.1.1. Hücreler Üzerinde Amiloid Beta Toksikitesi Oluşturulmadan Gingerol'ün Etkisi .....	21
4.1.2. Hücreler Üzerinde Amiloid Beta Toksikitesi Oluşturulduktan Sonra Gingerol'ün Etkisi .....	22
4.1.3. Hücreler Üzerinde Amiloid Beta Toksikitesi Oluşturulmadan Shogaol'ün Etkisi .....	25
4.1.4. Hücreler Üzerinde Amiloid Beta Toksikitesi Oluşturulduktan Sonra Shogaol'ün Etkisi .....	26
4.2. AMİLOİD BETA OLİGOMERLERİNİN HÜCRELERE UYGULANMASINDAN SONRA GİNGEROL VE SHOGAOL'ÜN ETKİSİ.....	28
4.2.1. Hücreler Üzerinde Amiloid Beta Toksikitesi Oluşturulmadan Gingerol'ün Etkisi .....	28
4.2.2. Hücreler Üzerinde Amiloid Beta Toksikitesi Oluşturulduktan Sonra Gingerol'ün Etkisi .....	29
4.2.3. Hücreler Üzerinde Amiloid Beta Toksikitesi Oluşturulmadan Shogaol'ün Etkisi .....	31
4.2.4. Hücreler Üzerinde Amiloid Beta Toksikitesi Oluşturulduktan Sonra Shogaol'ün Etkisi .....	32
4.3. GSK-3 $\beta$ İNHİBİSYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	35
6. KAYNAKLAR .....	37

**KISALTMALAR**

<b>AH</b>	: Alzheimer hastalığı
<b>SP</b>	: Senil amiloid plaklar
<b>NFY</b>	: Nörofibriler yumak
<b>A<math>\beta</math></b>	: Amiloid beta proteini
<b>APP</b>	: Amiloid prekürsör protein
<b>TNF</b>	: Tümör nekrozis faktör
<b>TRIAL</b>	: TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand
<b>AchE</b>	: Asetil kolin esteraaz
<b>5-HT-erjik</b>	: Serotonerjik
<b>SSRI</b>	: 5-HT geri alımın blokerleri
<b>NA-erjik</b>	: Noradrenerjik
<b>LC</b>	: Locus ceruleus
<b>Snc</b>	: Substantia nigra pars compacta
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	: Glikojen Sentaz Kinaz 3- $\beta$
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>ATCC</b>	: American Type Culture Collection
<b>EMEM</b>	: Eagle's Minimum Essential Medium
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's Modified Eagle Media
<b>MEM</b>	: Minimum Eagle's Medium

## TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 4.1.** Amiloid beta agregatı uygulanmadan hücreler üzerine gingerol dozlarının etkisi ..... 21
- Şekil 4.2.** Amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra hücreler üzerine gingerol dozlarının etkisi..... 22
- Şekil 4.3.** Gingerol için amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra 24. saatteki sigmoidal doz-cevap eğrisi..... 23
- Şekil 4.4.** Gingerol için amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra 24 saatlik zaman dilimindeki sigmoidal doz-cevap eğrisi ..... 23
- Şekil 4.5.** Amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra gingerol uygulamasının 24. saattinde hücre indeksindeki değişiklikler..... 24
- Şekil 4.6.** Amiloid beta agregatı uygulanmadan hücreler üzerine shogaol dozlarının etkisi ..... 25
- Şekil 4.7.** Amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra hücreler üzerine shogaol dozlarının etkisi..... 26
- Şekil 4.8.** Shogaol için amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra 24. saatteki sigmoidal doz-cevap eğrisi..... 26
- Şekil 4.9.** Shogaol için amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra 24 saatlik zaman dilimindeki sigmoidal doz-cevap eğrisi..... 27
- Şekil 4.10.** Amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra shogaol uygulamasının 24. saatinde hücre indeksindeki değişiklikler..... 27
- Şekil 4.11.** Amyloid beta oligomeri uygulanmadan hücreler üzerine gingerol dozlarının etkisi ..... 28
- Şekil 4.12.** Amyloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra hücreler üzerine gingerol dozlarının etkisi..... 29
- Şekil 4.13.** Amiloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra gingerol uygulamasının 12. saattinde hücre indeksindeki değişiklikler..... 29
- Şekil 4.14.** Gingerol için amiloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra 12. saatteki sigmoidal doz-cevap eğrisi..... 30

<b>Şekil 4.15.</b> Gingerol için amiloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra 12 saatlik zaman dilimindeki sigmoidal doz-cevap eğrisi .....	30
<b>Şekil 4.16.</b> Amiloid beta oligomeri uygulanmadan hücreler üzerine shogaol dozlarının etkisi .....	31
<b>Şekil 4.17.</b> Amiloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra hücreler üzerine shogaol dozlarının etkisi.....	32
<b>Şekil 4.18.</b> Amiloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra shogaol uygulamasının 12. saattinde hücre indeksindeki değişiklikler.....	32
<b>Şekil 4.19.</b> Shogaol için amiloid beta oligomer ile oluşturulan toksisiteden sonra 12. saatteki sigmoidal doz-cevap eğrisi.....	33
<b>Şekil 4.20.</b> Shogaol için amiloid beta oligomer ile oluşturulan toksisiteden sonra 12 saatlik zaman dilimindeki sigmoidal doz-cevap eğrisi .....	33
<b>Şekil 4.21.</b> Gingerol'ün doza bağımlı % inhibisyonu.....	34
<b>Şekil 4.22.</b> Shogaol'ün doza bağımlı % inhibisyonu.....	34

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer hastalığı (AH), kronik nörodejeneratif bir hastalıktır. Her yıl dünyada ortalama 5 milyon yeni AH olgusu geliştiği tahmin edilmektedir. 1907 yılında Alman hekim Alois Alzheimer tarafından klinik ve nöropatolojik özellikleri ile tanımlanmıştır. Hastalığın görülme riski yaşa bağlı bir şekilde logaritmik olarak artar. 60-65 yaş arasında olan popülasyonda görülme sıklığı yaklaşık %0.1 iken 85 yaşın üzerinde görülme sıklığı %47'ye kadar çıkar. 2050 yılında dünya nüfusunun %25'inden fazlasının 65 yaşın üzerinde olacağı tahmin edilmektedir. Bu rakamlar artan yaşlı nüfusu ile birlikte logaritmik oranda artan AH'nin gelecekte en önemli sağlık sorunlarından biri olacağını düşündürmektedir. 1999 yılında ülkemizden bildirilen bir çalışmada Türkiye'deki Alzheimer hastası sayısının 200.000'in üzerinde olduğu tahmin edilmektedir.

Halen kesin fizyopatolojisi ortaya çıkarılamamıştır. Histopatolojik olarak senil amiloid plaklar (SP), nörofibriler yumak (NFY) oluşumu, sinaps-nöron kaybı ve beyinde belirgin bir atrofi mevcuttur. NFY'lerin temel bileşeni hiperfosforile 'tau' proteindir. AH patogeneğinde hiperaktif kinazlar ve/veya hipoaktif fosfatazlar, tau proteininin hiperfosforilasyonuna yol açarak mikrotübüllere bağlanma yeteneğini bozarlar. Bağlanmamış fosforile tau çözölemeyen çift sarmallı filamanlara polimerize olur. Bunlar zaman içinde intranöronal NFY'ler haline gelir. NFY'ler hücre iskeletinin bütünlüğünü ve aksonal transportu bozarak hücre ölümüne neden olur. AH'deki ikinci temel nöropatolojik değişiklik, ana bileşeni amiloid beta proteini (A $\beta$ ) olan, amiloid plaklardır.

$\beta$  amiloid protein, diffüz plaklar halinde agrege olur ve daha sonra yoğun nöritik plaklara dönüşür. Zararsız amiloid  $\beta$  içeren gevşek plakların nasıl  $\beta$  kıvrımlı zararlı yoğun plaklara dönüştüğü net açıklanamamıştır. Gevşek plaklarda amiloid  $\beta$  birikimi oksidatif stres ve serbest radikallerin oluşumuna, bu faktörler de plakların fiziksel değişimine yol açıyor olabilir. Nöritik plak oluştuktan sonra, inflamasyon, eksitotoksisite ve muhtemelen apoptozisten oluşan sekonder kaskad ek hasar oluşmasına aracılık eder. Erken demansı olan olguların beyin dokuları ve beyin omurilik sıvısında artmış amiloid  $\beta$ 42 ve amiloid  $\beta$  oligomerleri bulunur ve bu düzeyler kognitif azalma ile ilişkilidir. Lipid peroksidasyonunun da AH'de anlamlı rolü olabilir. AH'deki kognitif kötüleşmenin ciddiyeti amiloid depozisyonundan ziyade NFY miktarı ile koreledir. Bazı çalışmalar primer nörotoksik oluşumun NFY'den ziyade mutant tau proteini olduğunu düşündürmektedir. Öte yandan hem NFY'ler hem de amiloid plakları, AH patogenezinin mediatörleri değil sonuç ürünleri de olabilir. AH ile ilişkili tüm risk faktörleri ve patolojik ürünler, nöroplastisiteyi bozuyor olabilir. Plastisite sağlanamazsa, serbest tau polimerlerinden NFY oluşumu ve A $\beta$ 'nin gevşek plaklarda birikmesi ve sonrasında katı plaklara dönüşmesi artacaktır.

Daha önce yapılan bazı çalışmalarda AH üzerinde gingerol ve shogaol'e yapıca benzeyen ferulik asitin amiloid  $\beta$  toksisitesinde koruyucu rolü olabileceği gösterilmiştir.

Bu çalışmada; Alzheimer hastalığının fizyopatolojisinde önemli bir rol oynayan Amiloid  $\beta$  toksisitesinde zencefil bitkisinde (*Zingiber officinale*) yüksek konsantrasyonlarda bulunan gingerol ve shogaolün koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır. Bu iki madde ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. ALZHEİMER HASTALIĞININ HİSTOPATOLOJİSİ

AH'de beyin dokusunun histopatolojik olarak değerlendirilmesi kesin tanı için gerekli olsa da bugün modern radyolojik yöntemlerle %90'ın üzerinde tanı konulabilmektedir. Makroskopik olarak beyin ağırlığı ortalama 900-1200 gr arasındadır. Serebral giruslarda düzleşme ve sulkuslarda genişleme gözlenir. AH'de genel olarak temporal lob (özellikle hipokampus), daha az olarak da frontal ve parietal loblar etkilenir. Oksipital lob ve motor korteks ise genellikle sağlamdır. Ancak bu atrofi paterni AH için spesifik bir olay değildir. Fikse beyinden alınan örneklerde kortikal örtü oldukça incelmış görülür. Beyaz madde normal görünüm ve yapıdadır, ancak hacminde azalma izlenir. Parankim kaybına ikincil olarak ventriküler sistemde özellikle de lateral ventriküllerin temporal boynuzlarında genişleme oluşur (1). Orta beyinde substansia nigra normal pigmentasyonunu korur. Lokus Serulosus ise sıklıkla normalden daha soluk görünümündedir (2). Mikroskopik olarak AH birkaç morfolojik anomalinin varlığı ile karakterizedir. Ancak bunlardan hiçbiri AH için spesifik tanı kriteri değildir. Gözlenen ana patolojik değişikliklerden biri plak adı verilen spesifik amiloid depolanmasıdır. Bu normal bir nöronal membran proteini olan amiloid prekürsör proteinden (APP) proteolitik yıkımla meydana gelen A $\beta$  peptid yapısında bir amiloiddir. İkinci ana patolojik değişiklik nörofibriler yumak adı verilen intranöronal filamentöz inklüzyonlardır (3).

### 2.1.1. Nörofibriler Yumaklar

Nörofibriler yumaklar NFY'lerin temel bileşeni hiperfosforile 'tau' proteindir. Tau 17. kromozom tarafından kodlanan mikrotübül ilişkili protein ailesinden bir proteindir. Tau proteini mikrotübüllerin stabilizasyonunda, hücre iskeletinin bütünlüğünde ve aksonal transportta önemli bir rol alır. AH patogenezinde hiperaktif kinazlar ve/veya hipoaktif fosfatazlar tau proteininin hiperfosforilasyonuna yol açarak mikrotübüllere bağlanma yeteneğini bozarlar. Bağlanmamış fosforilize tau çözölemeyen çift sarmallı filamanlara polimerize olur (3). Bunlar zaman içinde intranöronal NFY'ler haline gelir. Bu sürecin yıllar süren uzun bir dönem olduğu düşünülmektedir. Bu süreçte tau hedefli tedavi stratejilerinin, çözölemeyen çift sarmallı filamanların NFY şeklinde çökmesini azaltması ile AH progresyonunu azaltabileceği düşünülmektedir. NFY; hücre iskeletinin bütünlüğünü ve aksonal transportu bozarak nihayetinde hücre ölümüne neden olur. Hücre ölümüyle ortaya çıkan ekstraselüler NFY'a "hayalet yumak" adı verilir. AH'deki kognitif kötüleşmenin ciddiyeti amiloid depozisyonundan ziyade NFY miktarı ile koreledir (2,3). Fareler üzerinde yapılan çalışmalar primer nörotoksik oluşumun NFY'den ziyade mutant tau proteini olduğunu düşündürmektedir (4,5). Bu nedenle hem NFY'ler hem de amiloid plakları, AH patogenezinin mediatörleri değil sonuç ürünleri olabilir. Bununla beraber beyinde tau oluştuğu zaman, doğrudan nörodejenerasyona sebep olduğu gösterilmiştir (6). Yaşlılık sürecinde NFY sayısı ile kronolojik yaş arasında korelasyon gösterilmiştir. AH'de NFY'ler entorhinal korteksten önce paralimbik alanlara, sonra heteromodal neokortikal alanlara yayılırlar. Patolojik olarak NFY'lerin bu bölgesel yayılımı, klinikte normal yaşlanma, hafif ve ağır demans evrelerine karşılık gelir. Tau depozitleri AH dışında, progresif supranükleer palsy, kortikobazal ganglionik dejenerasyon, Pick hastalığı, argirofilik grain hastalığı ve Guam'ın Parkinson-Demans kompleksi gibi diğer bazı nörodejeneratif hastalıklarda da bulunur (2). AH dışındaki hiçbir tau patolojisinde amiloid  $\beta$  depozitleri yoktur (5).

### 2.1.2. Amiloid Plaklar

AH'deki sekonder nöropatolojik değişiklik olan amiloid plaklar farklı morfolojik yapılarda olabilir ancak ana bileşeni amiloid beta proteindir ( $A\beta$ ).  $A\beta$ , amiloid 40-42 aminoasitten oluşan bir proteindir. Daha büyük bir transmembran protein olan, 19. kromozomda kodlanan ve işlevi tam olarak anlaşılamamış bir transmembran protein

olan amiloid prekürsör protein (APP)'den proteolitik yolla oluşur (7,8). Buradan da çıkarabileceğimiz gibi, Amiloid  $\beta$ , APP'nin metabolizma ürünlerindedir. APP geninin yok edildiği transjenik farelerde (APP knock-out mice) anlamlı bir mortalite ya da morbidite gözlenmemiştir. APP'nin nörotrofik ve nöroprotektif aktivitesi olabilir. A $\beta$ 'nin normal fonksiyonu ise tam olarak bilinmemektedir (7). Çözünmüş amiloid fibrillerinin oluşması, AH'deki ilk patolojik olay olabilir ve bu olay nöritik plakları meydana getirebilir. Bütün transmembran proteinlerde olduğu gibi APP'nin de hücre içi karboksi ucu, membran içinde seyreden 28 aminoasitlik bölümü ve hücre dışı amino ucu vardır. Amiloid  $\beta$ , APP'nin membran içi 28 aminoasitlik bölgesini de içeren bir parçasıdır (8). APP bir dizi proteolitik enzimle kesilerek metabolize edilir. Bu enzimlere  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  sekretaz adları verilir.  $\alpha$ -sekretaz APP'yi Amiloid  $\beta$ 'nin ortasından keser. Bu kesim sonunda çözülebilir Amiloid  $\beta$  yerine APP ya da sAPP adı verilen ekstraselüler yeni protein oluşur. Bu molekülün hücre kültüründe, nöronlar üzerine olumlu nörotrofik etkileri gösterilmiştir. Ancak diğer iki enzim ( $\beta$  ve  $\gamma$ -sekretaz- lar), APP'yi amino ucundan ( $\beta$ -sekretaz) veya karboksi ucundan ( $\gamma$ -sekretaz) böler. Bu bölünme sonucunda ürün olarak amiloid  $\beta$  oluşur. Oluşan Amiloid  $\beta$ 'ler 40 veya 42 aminoasit uzunluğundadır. Bunlardan daha fazla amiloidojenik olanı 42 aminoasitlik yapısal uzunluğundadır ve ilk çöken de budur (9). Hemen sonrasında amiloid  $\beta$  diffüz plaklar halinde agrege olur ve yoğun nöritik plaklar dönüşür (10). A $\beta$  amiloid'in serebral arteriollerde birikmesi "amiloid anjiyopati" olarak adlandırılır ve serebral lobe kanamalara sebep olabilir. AH'li olguların beyinlerinde de meningeal kan damarlarında Amiloid  $\beta$  tespit edilmiştir. Erken demansı olan olguların beyin dokuları ve beyin omurilik sıvısında artmış Amiloid  $\beta$ 42 ve Amiloid  $\beta$  oligomerleri bulunur ve bu düzeyler kognitif azalma ile korelidir (11). Bu bulgular, AH'deki nörotoksitenin mediatörlerinin amiloid plakların değil, küçük amiloid  $\beta$  oligomerlerinin olduğu hipotezini desteklemektedir (12,13). Bununla beraber Amiloid  $\beta$  normalde de oluşan bir üründür (14). Bu durum henüz anlaşılmamış da olsa onun fizyolojik bir fonksiyonu olduğunu düşündürmektedir. APP mutasyonları ya toplam amiloid  $\beta$  üretimini ya da daha amiloidojenik form olan amiloid  $\beta$  42 üretimini artırır (15,16). AH'de  $\alpha$ -sekretaz yolu baskılanırken, dengenin  $\beta$  ve  $\gamma$ -sekretaz yollarına saptığı ileri sürülmektedir. Son yıllarda  $\beta$ - sekretazın geni bulunarak karakterize edilmiş ve BACE (beta-site APP cleaving enzyme) adı verilmiştir.  $\gamma$ -sekretazın ise presenilin (ile aynı şey) mi olduğu yoksa presenilinle aktive edilen bir proteaz mı olduğu tartışmaları halen devam

etmektedir (17). AH'nin bilinen bütün genetik mekanizmaları amiloid  $\beta$  oluşumunu artırmaktadır. Genetik mekanizmalar neticesinde ya substrat olan APP miktarında artış olması ile (Down sendromu) ya da APP'den amiloid  $\beta$  üreten  $\beta$ -sekretaz veya  $\gamma$ -sekretaz aktivasyonuna bağlı aşırı üretim olması sebebi ile "amiloid  $\beta$  miktarı" artar. Ancak, tau proteini genindeki mutasyonlar AH dışı dejenerasyonlara neden olmaktadır. Normal bireylerde APP işlenmesinde bu 3 yolda kullanılırken, büyük ölçüde 60 yaşından itibaren, ileride demans geliştirecek olsun olmasın, herkeste  $\beta$  ve  $\gamma$ -sekretaz ürünü amiloid  $\beta$  temizlenemeyip plaklarda birikmeye başlar. İlk birikim NFY'lerin aksine limbik sistemde değil, neokortekste olur ve gevşek plaklar halindedir. Bunlar, lokal nörotoksik etkilere sahip olan  $\beta$  kıvrımlı transforme olmuş amiloid değildir. Zararsız amiloid  $\beta$  içeren gevşek plakların  $\beta$  kıvrımlı zararlı yoğun plaklara dönüşümünü açıklayan bir dizi teori vardır. Gevşek plaklarda amiloid  $\beta$  birikimi oksidatif stres ve serbest radikallerin oluşumuna, bu faktörler de plakların fiziksel değişimine yol açıyor olabilir. Bununla birlikte, gliosis ve mikroglial aktivasyon ile oluşan inflamatuvar değişiklikler de plakların yoğunlaşmasına sebep olabilir (15). AH tedavisinde denenen serbest radikal önleyici ajanların (E vitamini, selegilin, *Ginkgo biloba*) ve anti-inflamatuvarların bu mekanizmalara etki edeceği düşünülmüştür. Nöritik olmayan katı plaklar demanssız beyinlerde de görülebilir. Katı plakların lokal nörotoksitesi, hücre ölümü ve nöritik dejenerasyona neden olur. Bu aşamadan sonra dejenere nöritler içeren katı plaklara "nöritik plaklar" adı verilir (2). Nöritik plaklar, nöritik olmayan katı plakların aksine, yalnızca demanslı beyinlerde görülür. Nöritik plaklarda A $\beta$  amiloid, proteoglikanlar, ApoE4,  $\alpha$  1 antikimotripsin ve diğer proteinlerden oluşan merkezi bölge vardır. Nöritik bileşen, sinaptik artık ve nörofilamanlardan oluşur ve çoğu aynı zamanda tau için de pozitif immünreaksiyon gösterir. Tau (+) plaklarda nöritik bileşenin NFY içeren nöronların kalıntıları olduğu söylenebilir. Böylelikle bölgesel olarak farklı başlangıç yatkınlıklarına sahip olan NFY ve SP'ler hastalığın seyri içinde tau (+) plaklar halinde yan yana gelmiş olurlar. Nöritik plak oluştuktan sonra, inflamasyon, eksitotoksiste ve muhtemelen apoptozisten oluşan ikincil yolak, ek hasar oluşmasına aracılık eder (16). Hem amnestik MCI'de (sıklıkla AH'nin prodromal evresini temsil eder) hem de ileri AH olgularında benzer lipid peroksidasyon bulgularının olması, lipid peroksidasyonunun AH'de anlamlı etyolojik rolü olduğunu düşündürmektedir (18). Amiloid ile NFY'ler arasındaki bağlantıyı anlamak AH patogenezi anlamak için kesinlikle gereklidir ve muhtemelen AH

fizyopatolojisindeki en büyük bilinmezi oluşturmaktadır (19). Varsayılan bağlantılardan biri, apoptoz başlatıcıları olan sistein aspartil proteazlarını içermektedir. Giderek artan kanıtlar A $\beta$  protein birikiminin kaspazların aktivasyonunu tetiklediği, böylelikle tau'nun kaspaz tarafından indüklenen bölünmesine sebep olduğunu ve bu işlemin erken AH'de olduğunu düşündürmektedir. Tau'nun bölünmesi NFY oluşmasında kritik olay gibi görünmektedir. Hem amiloidin hem de tau patolojisinin birbirinden bağımsız olduğu, muhtemelen NFY'lerin plaklardan önce ortaya çıktığı düşünülmektedir. Ancak ileri evrelerde, neokortekste yaygın amiloid beta depozisyonunun ciddi NFY patolojisinden önce görüldüğü bildirilmiştir (20). Bu bulguya göre, amiloid beta depozisyonu yaşla ilişkili tau patolojisini artırıyor olabilir. Bu hipotez, APP gen mutasyonlu olgularda da görülen amiloid  $\beta$ 42 üretiminin tau disfonksiyonuna öncülük ettiği bulgusu ile de uyumludur. Tau'daki mutasyonlar ise NFY oluşumuna, nörodejenerasyona ve demansa sebep olurken, amiloid beta depozisyonuna yol açmaz. Bir başka hipoteze göre NFY ve SP'ler birbirinden bağımsız oluşumlar olup sonuç bulgularıdır. Bu hipoteze göre AH, genetik ve çevresel etkilerle yaşam boyunca artarak biriken plastisite yükünün artık kaldırılamaz olması neticesinde normal yaşlanmadan sapmanın sonuçlarıdır (17). Gelişimsel dönemde bir hemisferektomiye tolere edebilecek durumda olan merkezi sinir sistemi (MSS), erişkinliğe ulaştıktan sonra bir hemisferin çok daha sınırlı bir alanındaki hasar sonucu ağır düzeyde sakatlanabilir. Bununla birlikte, nöroplastisite erişkin dönemle birlikte tümünden durmaz. Yeni öğrenme, aşınma ve hasar onarımı amaçlı olarak MSS'nin belli bölgelerinde daha belirgin olmak üzere devam eder (19). Bunlar aksonal tomurcuklanma, dendritik dallanma, yeni sinaps oluşumu (sinaptogenez) ve varolan sinapsın yeniden şekillenmesi (sinaptik "remodeling") ve uzun süreli potensiyasyon (LTP) şeklindedir. AH ile ilişkili tüm risk faktörleri ve patolojik ürünler, nöroplastisiteye müdahale ediyor olabilir. Nöroplastisite potansiyeli, AH'de NFY oluşumunun yayılımı ile benzer şekilde en yüksek limbik sistemde iken, azalan sırayla paralimbik yapılar, asoiasiyon neokorteksi ve en az da primer sensoryel motor kortekslerdedir (20). Özellikle plastisite yükünün yüksek olduğu bölgelerde kinaz-fosfataz dengesinin bozulması, fosforillenmiş tau'nun defosforilizasyonunun sağlanamayarak patolojik katlanmasına ve oligomerlere dönüşmesine neden olmaktadır. APP ise nöroplastisitedeki rolü deneysel olarak gösterilmiş bir membran proteindir. APP proteolizi sonucunda  $\alpha$ -sekretaz ile kesilen ürün olan sAPP'nin de nörit büyümesi

ve LTP'deki rolü bilinmektedir. Buna karşılık,  $\beta$  ve  $\gamma$ -sekretazlarla alternatif kesim sonucu oluşan A $\beta$  fragmanı nörotoksiktir, aksonal tomurcuklanma ve LTP'yi inhibe eder. PSN1'in, Notch proteini ile etkileşimin erişkin beyninde plastisite yükseltici etkileri gösterilmiştir. PSN1 ve PSN2 mutasyonları APP proteolizini A $\beta$  yoluna kaydırmanın yanı sıra Notch ile etkileşim gösteremeyen bozuk ürünlere yol açarak da plastisite potansiyelini baskılıyor olabilir (18). Kolesterol ve fosfolipidlerin transselüler naklinde rol oynayan ve dolayısıyla aksonal büyüme ve sinaptogeneze katkıda bulunduğu düşünülebilecek ApoE de plastisite ile ilişkilidir. Buna göre ApoE- $\epsilon$ 4 plastisiteyi baskımlarken, ApoE- $\epsilon$ 3 ve  $\epsilon$ 2 yükseltici etki göstermektedir. Yine östrojenin nörotrofik etkileri bilinmektedir (19). Yaş AH için temel risk faktörüdür. Uzun ömür aşınma, yıpranma ve hasarlanmanın artmasıyla kompensatuar plastisite ihtiyacını artırmaktadır. Yaşla artan bu ihtiyacı karşılamak için gerek tau fosforilasyonunda ve gerekse de APP ekspresyonundaki adaptif artışla plastisite korunabilirse AH'den korunulabilir. Plastisite sağlanamazsa, serbest tau polimerlerinden NFY oluşumu ve A $\beta$ 'nin gevşek plaklarda birikmesi ve sonrasında katı plaklara dönüşmesi artıyor olabilir (17).

### 2.1.3. Nöron Kaybı

AH'de nöron kaybı korteksten başlar. Limbik sistemi takiben superior temporal sulkusta tespit edilir. Nöron kaybının zaman içinde ilerleme ve anatomik yatkınlık tarzı genel anlamda NFY'nin tarzına benzer. NFY ile nöron sayılarının arasında anlamlı negatif korelasyon vardır. Bununla birlikte nöron ölümünden tek başına NFY'ler sorumlu tutulamaz. Subkortikal çekirdekler gibi NFY'lerin bulunduğu bölgelerde mutlaka nöron kaybının olması gerekmez. Öte yandan, NFY'lerin az sayıda olduğu ya da hiç bulunmadığı bölgelerde ağır nöron kaybı görülebilir. Amiloid nörotoksitesisi ve transsinaptik dejenerasyon, hücre ölümünde rol oynadığı düşünülen diğer etkenlerdir. Hücre ölümünün bir başka mekanizması olarak da apoptozis ya da programlanmış hücre ölümü üzerinde durulmaktadır (17).

Sinaps kaybı kortikal biyopsi örneklerinde klinik demans ağırlığıyla en yüksek korelasyon gösteren yapısal değişikliklerin başında gelir. Sinaptofizin gibi sinaptik proteinlerin miktarlarının demans ağırlığıyla korelasyonu gösterilmiştir. Sinaps kaybı daha çok NFY ve nöron ölümünün anterograd Wallerian dejenerasyon sonucu sekonder

etkisi ile açıklanır. Ancak primer hasarın sinapslarda olması ve bozukluğun retrograd olarak hücre gövdesine taşınarak, NFY oluşumu ve nihayetinde hücre ölümüne yolaçması da olasıdır (17).

Gliozis ve inflamasyon NFY ve amiloid plaklara, astroglial ve mikroglial aktivasyonun eşlik etmesi ve plakların çevresinde akut faz proteinleri, sitokinler, kompleman elemanları ve proteazlar gibi inflamasyon sürecine katılan birçok maddenin varlığının saptanmış olması AH'de inflamatuvar süreçlerin ve glial aktivasyonun da patojenik sürecin bir parçası olduğunu ya da en azından hastalığın ilerlemesine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (21). Amiloid  $\beta$  birikiminin mikroglial ve astroglial hücreleri aktive ettiği anlaşılmaktadır. Öne sürülen patojenik mekanizmalardan biri amiloid peptid ve inflamatuvar uyaranlarla aktive olan mikroglial hücrelerden sitokinlerin salgılanması, akut faz reaktanları ve komplemanın aktive edilmesiyle inflamasyon oluşması, salınan proinflamatuvar sitokinlerin ve nörotoksinlerin nöronal hasara yol açması ya da şiddetlendirmesidir (20). AH'de inflamatuvar süreçlerin katkısını destekleyen bulgulardan biri de antiinflamatuvar tedavi yaklaşımlarının bu hastalıkta kısmen yarar göstermesidir. İnflamasyonun, serbest radikallerin ortaya çıkışı, oksidatif stres, kalsiyum homeostazı ve mitokondriyal membranda bozulmalar ile birlikte gittiği düşünülmektedir. Non-steroid anti-inflamatuvar ilaç (NSAİİ) kullanımının AH'li beyinde toplam Amiloid  $\beta$  sayısına etki etmezken, aktive mikroglia sayısını azalttığı saptanmıştır (21). Öte yandan, mikroglial hücrelerin diğer monosit-makrofaj soyundan hücrelere benzer biçimde yüzeylerinde eksprese ettikleri hücre ölüm reseptörü ligandları aracılığıyla da hedef hücre ölümünü tetiklemesi olasıdır. Tümör nekrozis faktör (TNF) ailesinden olan "TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand" (TRAIL) bunlardan biridir. Mikroglial hücrelerin aynı soydan olduğu periferik mononükleer fagositer hücreler, yukarıda belirtilen salgılanma ürünleri yanısıra immün yanıtta, yüzeylerinde eksprese ettikleri ve inflamasyon koşullarında ekspresyonu artan TRAIL gibi hücre ölüm ligandları aracılığıyla da katılmaktadır. Benzeri bir mekanizma glial hücreler için de geçerli olabilir. Gerçekten de astroglial hücrelerde interlökin-1 ve TNF-a ile indüksiyon sonucunda TRAIL mRNA ekspresyonun arttığı bildirilmiştir. Mikroglial hücrelerde TRAIL ekspresyonu varlığı da gösterilmiştir (22).

#### 2.1.4. Kolinerjik Kayıp

Asetil kolin (Ach) hipokampusu serebral kortekse bağlayan nörotransmitterdir. Kolin ve asetil koA'dan 'asetil transferaz' enzimi ile 'asetil kolin' oluşur. AH'de primer defisit beyindeki kolinerjik sistemin, özellikle öğrenme ve bellek ile ilgili bölgelerde bozulmasıdır (23). Ach sentezinden sorumlu olan kolin asetil transferaz seviyesi, hipokampus ve neokortekste %58-90 azalmıştır. Asetil kolin presinaptik nöronlardaki veziküllerden salınır ve postsinaptik reseptörlere bağlanır. Sinaptik aralıkta difüzyonla ilerleyen Ach postsinaptik membranda nikotinik reseptörlere bağlanarak doğrudan, muskarinik reseptörlere bağlanarak G-proteini ilişkili ikincil mesajcılar üzerinden etkisini gösterir (22,23). Nikotinik etkilerin hücrenin uyarılabilirliğini artırarak dikkat tonusunun sağlanmasında rol oynadığı, muskarinik etkilerin ise kalıcı sinaptik değişikliklerle yeni bilginin depolanması şeklindeki nöroplastisite mekanizmalarının unsuru olduğu bilinmektedir. Hem nikotinik, hem de muskarinik stimülasyon kaybının A $\beta$  oluşumunun artması ve A $\beta$  nörotoksitesinin artması şeklinde *in vitro* etkileri gösterilmiş, A $\beta$ 'nin sentez, salınım ve postsinaptik etkinliğini azaltabileceği de ortaya konmuştur. Asetil kolin esteraz (AchE) enzimi Ach'yi "asetat" ve "kolin"e hidrolize ederek Ach'nin post-sinaptik aktivitesini durdurur (23). Kolinesterazların iki formu bulunur: asetil kolinesteraz (daha çok beyinde bulunur) ve butiril kolinesteraz (daha çok periferde bulunur). Buna göre, AH'de kolinerjik kaybın kendisi de amiloid plak oluşumuna katkıda bulunan özelliklerdendir. A $\beta$  da muhtemelen kolinerjik kaybı artırarak bir kısır döngü ortaya çıkarmaktadır. Östrojen limbik nöronlarda sinaptogeneze katkıda bulunup nöroplastisitede rol oynarken, Meynert'te Ach üretimine de katkıda bulunur. Ek olarak, bazal ön beyinde kolinerjik nöron dejenerasyonu olur. Bu nedenle, Ach üretiminde ilerleyici bir düşüş görülür (23,24). Bütün korteksin kolinerjik innervasyonu temel limbik yapılardan biri olan bazal ön beyindeki Meynert çekirdeğinden sağlanır. Bu innervasyon dikkat ve bellek işlevlerinin optimal sürdürülebilmesi açısından büyük önem taşır. Tau hiperfosforilasyonunun ilk görüldüğü alanlardan biri de Meynert çekirdeğidir. AH'de limbik alanlardaki yaygın NFY formasyonu ve nöron kaybı Meynert çekirdeğini de etkiler. Kolinerjik aksonların kaybı diğer patolojik özellikler gibi bir bölgesel yatkınlık gösterir. Lokal internöronlardan sağlanan striatal kolinerjik innervasyon ve talamusun beyin sapı pedinkülopontin çekirdek kaynaklı kolinerjik innervasyonu etkilenmezken, Meynert kaynaklı kolinerjik

innervasyonda etkilenir. Kortekste en fazla etkilenen bölgeler limbik ve asosiasyon korteksleri iken, primer sensoryel ve motor korteksler görelî olarak salim kalırlar (24).

### **2.1.5. Serotonerjik Kayıp**

AH'de serotonerjik (5-HT-erjik) dorsal raphe çekirdeğinde Meynert düzeyinde olmasa bile kayda değer nöron kaybı ve kalan nöronlarda NFY'ler görülür. Kortikal 5-HT-erjik akson terminallerinde serotoninin (5-HT) salımı ve geri alımı ciddi düzeyde bozulmuştur. AH'de 5-HT-erjik kayıpla depresyon ve saldırgan davranışın korelasyonu bildirilmektedir. Selektif serotonin geri alım blokerlerinin (SSRI) AH'deki depresyon ve agresyonun tedavisindeki rasyoneli bu gözlemlere dayanmaktadır (17).

Noradrenerjik kayıp beyin sapındaki noradrenerjik (NA-erjik) çekirdek olan "locus ceruleus"ta (LC) da dorsal raphe benzeri bir nöronal kayıp ve NFY oluşumu gözlenir. LC'deki patoloji seçici yatkınlığa uygun biçimde LC'nin kortikal projeksiyonları olan anterior ve medial bölümlerini etkilerken spinal ve serebellar projeksiyonları içeren kaudal ve lateral bölümleri salim kalır. NA-erjik kaybın klinik karşılığı iyi belirlenmemiştir (17).

### **2.1.6. Dopaminerjik Kayıp**

AH ileri evrelerinde parkinsonizm sıra dışı bir olgu değildir. Bu olguların patolojik karşılığı büyük sıklıkla "substantia nigra pars compacta" dopaminerjik (DA-erjik) nöronlarında kayıp ve Lewy cisimcikleridir (17).

## **2.2. ALZHEİMER HASTALIĞINDA AMİLOİDİN ROLÜ**

AH'de depolanan A $\beta$  amiloid, büyük APP molekülünden köken alır. APP; transmembran yerleşimli, hücre yüzeyinde eksprese olan bir proteindir. 19. kromozomda lokalize geni vardır. APP'nin ana yapısı hücre içi, transmembran ve büyük ekstrasellüler alan olmak üzere 3 alan içerir. Fonksiyonu tam olarak bilinmemekle beraber hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkisinde rolü olduğu düşünülmektedir. Suda çözülmüş halde bulunan APP; hücre yüzeyinden  $\alpha$ -sekretaz enzimi ile ayrılır (22). Proteolitik enzim  $\alpha$ -sekretaz; APP'nin A $\beta$  bölgesini ortasından ayırır. Böylece A $\beta$  fragmanlarını arttırmaz. Bununla birlikte yüzey APP hücre içine alınabilir ve farklı sellüler komponentlerin yapısında çeşitli formlarda bulunabilir. Bu formlarda APP, N

ucundan A $\beta$  peptid transmembran bölge hemen üzerinden  $\beta$ -sekretaz ile parçalanır. Transmembran bölgedeki bölüm ise  $\gamma$ - sekretaz ile ayrılır. Bu proteoliz sonucu 39/40 ve 42/43 aminoasitlik iki predominant A $\beta$  peptid yapısı oluşur (20). Vasküler alanlarda biriken amiloid genellikle A $\beta$ 39/40 iken plaklardaki A $\beta$  peptit formu 42/43 aminoasitlik fragmanlardan oluşur. A $\beta$ 39/40 peptidinin damar duvarında birikmesinin olası mekanizması kesin olmamakla birlikte A $\beta$ 39/40 endositozisi, kan damarlarına selektif transportu ve putative dekarboksil transferaz ile A $\beta$ 42/43 proteolizi sonucu A $\beta$ 39/40'a indirgenmesidir. *In vitro* olarak A $\beta$  ve bunun agregatlarının nörotoksitesisi demansın patogeneğinde bunların rol oynayabileceğinin düşünülmesine yol açmıştır (23).

Genetik araştırmalar AH'nin küçük bir bölümünü oluşturan ailesel AH'de APP ve A $\beta$  peptidlerinin patogeneğinde sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Erken başlangıçlı AH'de 21. kromozomda çeşitli mutasyonlara rastlanmıştır. Londra mutasyonu 717. kodonda meydana gelen bir nokta mutasyonudur. İsveç mutasyonu ise 670 ve 671. kodonlarda meydana gelen çiftli mutasyondur. A $\beta$  peptidinin sellüler sekresyonunda artışa rastlanır. Flaman mutasyonunda 692. kodonda nokta mutasyonu vardır. Bu mutasyon erken başlangıçlı ailesel demansta izlenir (2).

Hollanda mutasyonu 693. kodonda meydana gelen bir nokta mutasyonudur. Amiloid içeren herediter serebral kanama hastalığında gözlenir. Damar duvarlarında hızlı amiloid birikimi ile karakterizedir (2).

Geç başlangıçlı Alzheimer mutasyonu 665. kodonda saptanan bir nokta mutasyonudur. Bu yalnızca bir akrabalıkta kaydedilmiştir (3).

### **2.3. *Zingiber officinale***

Taze ve kuru olarak tüketilebilen zencefil, rizom köklerinden meydana gelmektedir. İngiliz botanikçi William Roscoe (1753-1831) 1807 yılında zencefili tanımladı ve *Zingiber officinale* adını verdi. Zencefilin vatanı Güney Asya olmakla beraber asıl orjin merkezi tam olarak bilinmemektedir. Subtropikal ve özellikle tropikal bölgelerde tarımı yapılmaktadır (25).

Zencefil, *Zingiberaceae* familyasına dahil bir türdür. Bu familya 24 kadar cinsi ve 300 civarında türü kapsar. Zingiber cinsi de 20 kadar türe sahiptir. *Zingiber officinale* çok

yıllık yumru veya rizom köklere sahiptir. Bitki 60-90cm yüksekliğinde dik, koyu yeşil yapraklı tek yıllık sap (yalancı gövde) oluşturur. Sapları, saptan ayrılan düz kınla kaplıdır. Gövde üzerinde iki sıralı 8-12 yaprak bulunur. Yapraklar uzun kınlı, alternat (almaşık), mızraksı, şeritsi-mızraksı, sivri uçlu, düz ve sapsız kınlı, 10-21 cm uzunluğunda, 2-2.5 cm genişliğindedir. Çiçek kümesi kökten tek başına küçük bir sap ile yükselir. Çiçek kümesinin yerden yüksekliği 12-30 cm dir. Kınlarla sarılmış bir kafa şeklindedir. En sondaki kın, katlanarak ayrılır. Çiçek kümesi aşağı yukarı bir baş parmak büyüklüğündedir. Çiçekler küçük ve soluk sarı renklidir. Anterler çift, taçlı uzun, ince kumlu, oluklu ve boynuz şeklindedir. Ovaryum oval, üç hücreli her birinde pek çok yumurta ile iplikçik biçimli, stigma huni biçimli, sınırsal tüylü ve zirvenin hemen altında boynuz şeklinde anter vardır (26).

### 2.3.1. Kullanım Alanları

Geleneksel Hint tıbbında, pıhtılaşmayı ve kolesterolü önleyici, mafsallı iltihabını tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Arap kültüründe kullanım şekli afrodisyak şeklindedir. Ayrıca bazı Afrikalılar zencefil düzenli olarak yedikleri zaman sivrisineği uzaklaştırdığına inanmaktadırlar. Afrika'da diğer bir kullanım şekli ise gaz giderici (carminative) ve baharat şeklindedir (27). *Epstein-Barr* virus enfeksiyonu kanser nedenleri arasındadır. Zencefilin bu virus enfeksiyonunu durdurarak kanseri önlediği bildirilmektedir. Ayrıca, zencefilin aktif maddelerinden, 6- gingerol ve 6-paradol bileşimlerinin promyelotik lösemiye durdurma etkisi vardır. Bu da, kanser hücresi DNA sentezini bozarak etkileme şeklindedir. Antiemflamatuar etkisi ile artrit ve baş ağrısını tedavi edici etkisi vardır. Zencefil ekstrelerinin bakteri önleyici etkileri için kullanıldığı zaman gram pozitif ve gram negatif bakteri suşlarına (*Clostridium*, *Listeria*, *Enterococcus* ve *Staphylococcus*) karşı etkiye sahip olduğu fakat bu etkinin pişirildiği zaman kaybolduğu bildirilmektedir. Mantar önleyici etkisinin de olduğu, fakat bu etkiyi sadece laboratuvar ortamında gösterdiği bildirilmiştir. Zencefilin insanlar üzerindeki direkt etkisi, mide bağırsak sisteminde, mide bulantısını azaltıcı şekildedir (27).

### 2.3.2. Bileşimi

Kurutulmuş zencefil rizomları buharda damıtıldığında %2-3 oranında uçucu yağ elde edilir. Rizomlar ayrıca ortalama %9 protein, %6 sabit yağ, %70 karbon hidratlı maddeler, %6 ham selüloz ve %4.5 kadar da ham kül ihtiva eder. Zencefil rizomlarının

ağız ve burunda oluşturduğu tat ve koku iki farklı kimyasal gruptan gelir. Bunlardan uçucu yağlar; terpenoidlerle karışık olup zencefillin özel tat ve kokusunu veren maddelerdir. Ağzımızda sıcaklık hissi veren ve uçucu yağ olmayan acı maddeler ise gingerol ve zingeron'dur. Zencefillin potansiyel aktif madde içeriği; **shogaol, gingerol**, bisapolen, zingiberen, zingiberol, sesquifellanden, kurkumin, 6- dehidrogingerdion, galanolakton, gigesulfonik asid, geraniol, neral, monoasidigalaktosilikerd gingerslikolipid 'dir. Başlıca aktif haldeki madde; bisapolen, zingiberen ve zingiberol'dur (28). Zencefillin aktif maddeleri farklı fizyolojik etkiye sahiptir. Örnek olarak gingerol'ün in vitro ve hayvanlar üzerinde yapılan denemelerinde, ağrı kesici, yatıştırıcı, ateş düşürücü ve bakteri önleyici özelliği olduğu tespit edilmiştir (28).

### 2.3.3. Ferulik Asit

Bitkiler metabolik faaliyetleri sırasında hayati fonksiyonları için gerekli olmayan ve "sekonder metabolitler" olarak adlandırılan çok sayıda yan ürünler sentezlemektedir. Bu klasik tanımdan da anlaşıldığı gibi önceleri bu ürünler, bitkiler tarafından oluşturulan ve bitkide hiçbir işlevi olmayan ara maddeler olarak kabul edilmekteydi (26). Ancak bugün bu metabolitlerin, savunma, korunma, ortama uyum sağlama, hayatta kalma ve soyunu sürdürmek için bitkiler tarafından geliştirilmiş oldukça karmaşık mekanizmaların ürünleri olduğu anlaşılmıştır. Bitki sekonder ürünlerinin önemli bir sınıfını fenolik bileşikler oluşturmaktadır. Bu bileşikler arasında ferulik asitte yer almaktadır.

Ferulik asit kahve, elma, yer fıstığı, portakal, ananas, enginar gibi birçok bitkinin yaprak ve tohumlarında bulunur, fakat en çok tahıllarda özellikle kahverengi pirinç, buğday ve yulafta bulunur. Ferulik asit, hidroksisinnamik asit ailesine mensup sarı renkte bir tozdur. Allelopatik kimyasallar arasında yer almaktadır (26).

### 2.4. GLİKOJEN SENTAZ KİNAZ 3- $\beta$ ENZİMİ (GSK3 $\beta$ )

GSK3- $\beta$  enzimi, adını substratı olan glikojen sentaz enziminden alır. Bu enzim erişkin ve embriyonik dönemde birçok sinyal yolunda görev alan Serin/Treonin kinazdır. Diğer bir ifade ile Serin ve Treonin rezidülerini fosforillemektedir. İlk olarak 1980 yılında saptanan bu enzimin  $\alpha$  ve  $\beta$  olmak üzere iki izoformu vardır. İlişkili oldukları molekküller birbirinden farklı olmasına rağmen bu iki izoformun kinaz aktivitesine sahip bölgeleri birbiri ile % 97 oranında homoloji gösterir (29). Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal

yolunda bu enzimin GSK3 $\beta$  izoformu görev yapar. GSK3 $\beta$  yaklaşık olarak 47 kDa moleköl ağırlığında ve 420 aminoasit uzunluğundadır (30).

Bu enzim  $\beta$ -katenin proteininin fosforilenmesinden sorumludur (31). GSK3- $\beta$  enzimi Wnt/  $\beta$ -katenin sinyal yolundaki bu görevinin yanısıra inflamasyon, osteojenez, kondrojenez, adipojenez ve mitokondri bağımlı apoptoz mekanizmalarında rol alan birçok kritik biyomolekölün fosforillenmesinden de sorumludur (32).

Aynı zamanda bu molekülde meydana gelen bozuklukların diyabet, bipolar mental bozukluk, Alzheimer hastalığı ve çeşitli kanserlere neden olduğu da son yıllarda yapılan çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır. GSK3 $\beta$  enziminin, Alzheimer hastalığının oluşumunu uyardığı ve demansı etkilediği ileri sürülmüştür. Bu biyomolekölün aktivitesinin ortadan kaldırılması ile Alzheimer hastalığının tedavi edilebileceği yönünde çalışmalar mevcuttur (33).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Hücre kültürü ile ilgili deneyler, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında bulunan hücre kültürü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

#### **3.1. MATERYAL**

##### **3.1.1. Hücre Kültürü**

Çalışmada SHSY-5Y (ATCC Cat No CRL-2266™ ) hücreleri kullanıldı. Hücreler, hücre kültürü laboratuvarında % 5 CO<sub>2</sub> içeren CO<sub>2</sub>' li etüvde 37 °C' de culture alınıp yaşatıldı ve çoğaltıldı. Hücrelerin çoğaltılma işlemi için American Type Culture Collecton (ATCC) prosedürlerine göre Dulbecco Eagle's Minimum Essential Medium ve F12 Medium'un 1:1'lik karışımı (Catalog No. Sigma D6421) kullanıldı. Yüzeye tutunan hücre olmaları nedeniyle sayım ve belirli sayıda plakalara ekim sırasında hücreler taze hazırlanmış % 0.25 tripsin (Catalog no. Sigma T4049), 0.53 mM EDTA (Catalog No. Sigma E5134) çözeltisi ile muamele edildi.

##### **3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

DMEM + F12 Medium' un 1:1'lik karışımı (Catalog No. Sigma D6421)

Tripsin (Catalog No. Sigma T4049)

EDTA (Catalog No. Sigma E5134)

Fetal bovine serum (FBS) (Catalog No. Sigma F7524)

Penisilin/Streptomisin (Catalog No.Multicell 450-201-KL)

L-Glutamin (Catalog No. Sigma D6421)

$\beta$ -Amiloid 1-42 (Catalog No. Anaspec. 20276-1 mg)

Kinase-Glo Luminescent Kinase assay (Catalog No. Promega V6711)

Gingerol (Catalog No. Sigma 84696-15-1)

Shogaol (Catalog No. Sigma 39303)

Ferulik asit (Catalog No. Sigma 537-98-4)

Hücre besiyerleri +4°C'de, FCS, L-glutamin, antibiyotik solüsyonları-20°C'de, hemen kullanılacak hücre stokları, -80°C'de muhafaza edildi.

### 3.1.3. Kullanılan Cihazlar

- İvert mikroskop (NIKON ECLIPSE TS 100)
- Su banyosu (NÜVE ST402)
- Soğutmalı santrifüj (NÜVE NF 1200R)
- CO<sub>2</sub>'li inkübatör (NEW BRUNSWICK GALAXY 170 R)
- Güvenlik kabini (INFO KIMYA- SAFE FAST ELİTE)
- Deiyonize su cihazı (MILLIPORE- ELIX5)
- Distile su cihazı (NÜVE NS 112)
- xCELLigence real-time hücre analizörü ( )
- Etüv (NÜVE FN120)
- Otomatik pipetler (EPPENDORF)
- Hassas Terazi (OHAUS PIONEER)

- Buzdolabı (SIEMENS)

## 3.2. METOD

### 3.2.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması ve Yapılan İşlemler

Bu çalışmada SHSY-5Y hücreleri kullanıldı. Hücreler, hücre kültürü laboratuvarında 5% CO<sub>2</sub> içeren CO<sub>2</sub>'li etüvde 37 °C' de yaşatıldı ve çoğaltıldı. Hücrelerin çoğaltılma işlemi için ATCC prosedürlerine göre Dulbecco Eagle's Minimum Essential Medium ve F12 Medium'un 1:1'lik karışımı kullanıldı. Çalışmamızda antibiyotik seçimi olarak penisilin-streptomisin kombinasyonu kullanıldı. Hücreler haftada iki veya üç kez besi yeri değiştirilerek beslendi.

Deneylerde gingerol ve shogaolün 0.01 µM, 0.1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM'lık dozları kullanıldı. Gingerol ve shogaolde toplamda 400 µM'lık bir ana stok hazırlandı. Yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğru dilüsyon işlemi yapılarak, kuyucuklara uygulanacak esas konsantrasyon elde edildi ve önceden belirlenmiş kuyucuklara 50 µL içinde gerekli doz ilave edildi.

Çalışmamızda ferulik asit için belirlenen doz 4µM'dır. Ferulik asit için de 250 µL'lik ana stok hazırlandı. Önceden belirlenmiş kuyucuklara 50 µL içinde gerekli doz ilave edildi.

### 3.2.2. Gerçek Zamanlı Hücre Analizöründe Hücre Sayımı ve Canlılığı Testi

SHSY-5Y hücrelerinde  $\beta$ -Amiloid fragmanı 1-42 ( $A\beta$ 42) ile oluşturulan nörotoksisitede, saf maddelerin koruyucu etkileri altın plate canlılık ve sayım testi kullanılarak Xcelligence cihazında gerçek zamanlı olarak incelendi. İlk olarak  $5 \times 10^4$  hücre/ kuyucuk yoğunluğunda hücre alınıp steril 96 altın plate içine ekildi. Altın plate'in kuyucuklarına yerleşim şemasına göre hazırladığımız miktarda besiyeri, hücre, amiloid beta, gingerol, shogaol ve ferulik asit ilave edildi. Cihazda hücrelerin yüzeye tutunmaları sırasında oluşan kompedansa göre hesaplanan hücre indeksi (Cell Index) üzerinden maddelerin hücre çoğalması üzerine etkileri incelendi.  $A\beta$  agregatı ile toksisite oluşturulduğunda gingerol ve shogaol'ün EC<sub>50</sub> değerlerinin en kararlı seyrettiği saat 24. Saat,  $A\beta$  oligomeri ile oluşturulan toksisitede ise 12. Saat olarak belirlendi ve bu zaman dilimindeki EC<sub>50</sub> değerleri kullanıldı.

### 3.2.3. Amiloid Beta Oligomerlerinin ve Agregatlarının Hazırlanması

Deney için temin edilen  $\beta$ -Amiloid 1-42 (Catalog No. Anaspec. 20276) fraksiyonu peptit ile beraber gelen protokole uygun olarak hazırlandı. Bu protokole göre; 1 mg peptit %1  $\text{NH}_4\text{OH}$  içeren PBS ile muamele edildi. Elde ettiğimiz çözeltilerden bir ana stok hazırlandı.

Amiloid beta oligomerini hazırlamak için elde ettiğimiz ana stoktan deney için gerekli hacimde 22  $\mu\text{M}$  dozunda çözeltiler hazırlandı. Amiloid beta oligomeri, altın platede daha öncesinden yerini belirlediğimiz kuyucuklara muamele edildi ve toksisite oluşturması için 24 saat inkübasyona alındı.

Amiloid beta agregatlarını hazırlamak için amiloid beta oligomerlerinden hesaplanan hacimde alındı ve besi yeri içerisinde 72 saat 37 °C inkübatörde bekletilerek agregat şekline getirildi.

### 3.2.4. GSK-3 $\beta$ İnhibisyonunun In Vitro Olarak Değerlendirilmesi

Ekstre, ana fraksiyon ve saf maddelerin GSK-3 $\beta$  inhibisyon düzeyleri ölçümü, Kinase-Glo Luminescent Kinase Assay (Promega) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde göre inhibitör aktivitesi denenecek olan test maddesi DMSO'da 10 mM olacak şekilde çözüldü ve istenen konsantrasyonlara analiz tamponu (50 mM 4- (2-hidroksietil) piperazin-1-etansülfonik asit (HEPES, pH 7,5), 15 mM magnezyum asetat, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA) ile seyreltildi. 10  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{M}$ ) test çözeltisi daha sonra 96'lık siyah (amber) renkli plakalarda 10  $\mu\text{L}$  (20 ng) GSK-3 $\beta$  enzimi, 25  $\mu\text{M}$  substrat ve 1  $\mu\text{M}$  ATP içeren 20  $\mu\text{L}$  analiz çözeltisiyle karıştırıldı ve 30°C'de 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon 40  $\mu\text{L}$  Kinase-Glo reaktifi ilave edilerek durduruldu. 30°C'de 10 dakikalık inkübasyondan sonra multifonksiyonel mikroplaka okuyucuda lüminesans değerleri okundu. Negatif kontrol olarak standart GSK-3 $\beta$  inhibitörü, pozitif kontrol olarak da herhangi bir inhibitör madde taşımayan test çözeltisi kullanıldı ve % inhibisyon değeri, aşağıdaki formülle hesaplandı:

% inhibisyon=  $100 \times \frac{(\text{inhibitör test çözeltisinin lüminesansı} - \text{ortalama pozitif kontrol lüminesansı})}{(\text{ortalama negatif kontrol lüminesansı} - \text{ortalama pozitif kontrol lüminesansı})}$

Tüm test çözümleri en az iki bağımsız denemede her konsantrasyon için üç defa tekrarlanarak hesaplandı.

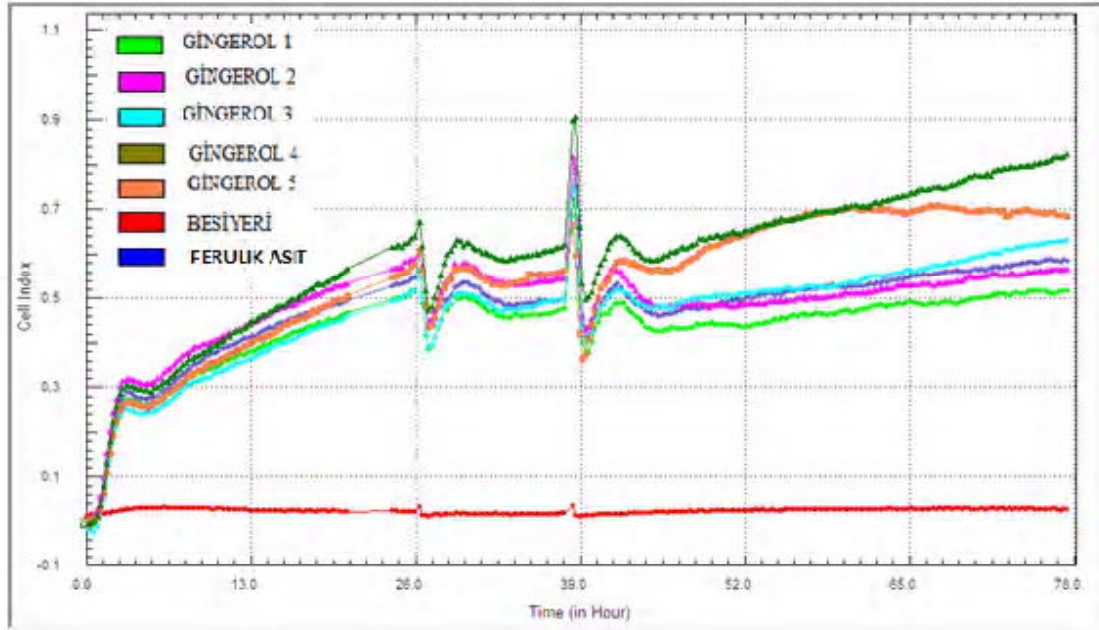
### **3.2.5.İstatistiksel Analiz**

Çalışmada SPSS 15.0 istatistik bilgisayar yazılımı kullanılarak gruplar arası farklar için One-Way-ANOVA ve grup içi farklılıklar için *Student-t testi* kullanılmıştır. ( $p < 0.05$  anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir.)

## 4. BULGULAR

### 4.1. AMİLOİD BETA AGREGATLARININ HÜCRELERE UYGULANMASINDAN SONRA GİNGEROL ve SHOGAOL'ÜN ETKİSİ

#### 4.1.1. Hücreler Üzerinde Amiloid Beta Toksikitesi Oluşturulmadan Gingerol'ün Etkisi

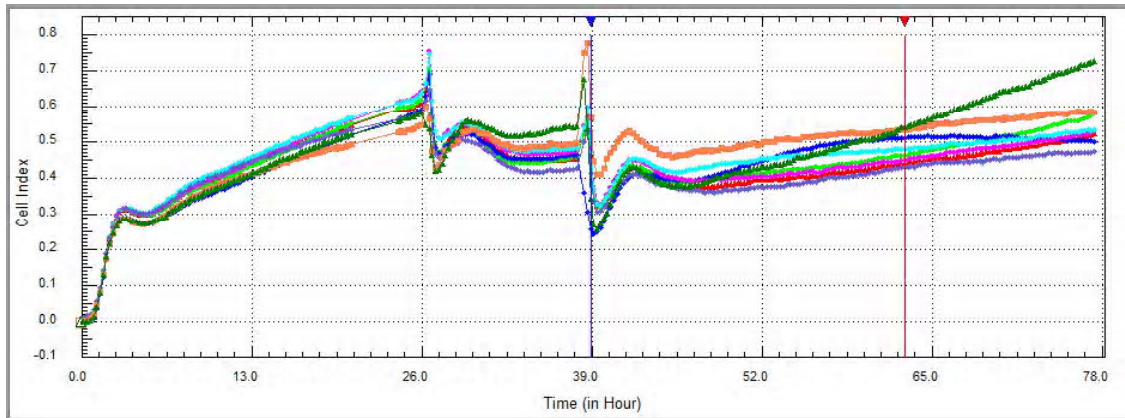


(Gingerol 1 0.01  $\mu$ M; Gingerol 2 0.1  $\mu$ M; Gingerol 3 1  $\mu$ M; Gingerol 4 10  $\mu$ M; Gingerol 5 100  $\mu$ M)

Şekil 4.1. Amiloid beta agregatı uygulanmadan hücreler üzerine gingerol dozlarının etkisi

Gingerol'ün hücre indeksi üzerindeki etkileri incelendiğinde hücre indeksini artırdığı ancak bu artışın doza bağımlı olmadığı ve istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı belirlendi. Bununla birlikte, gingerolün belirli dozlarında (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) hücre indeksini ferulik asitten daha fazla arttırdığı gözlemlendi.

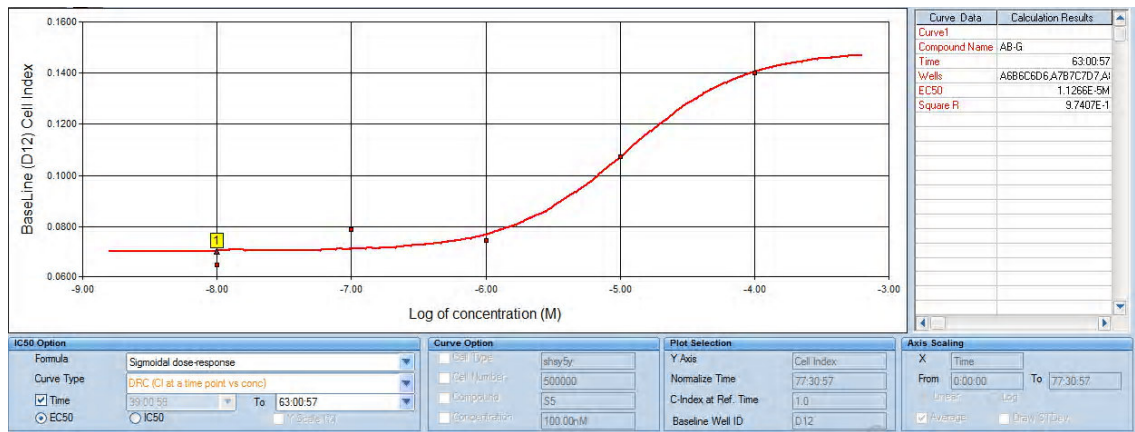
#### 4.1.2. Hücreler Üzerinde Amiloid Beta Toksisitesi Oluşturulduktan Sonra Gingerol'ün Etkisi



(Gingerol 1 0.01  $\mu$ M; Gingerol 2 0.1  $\mu$ M; Gingerol 3 1  $\mu$ M; Gingerol 4 10  $\mu$ M; Gingerol 5 100  $\mu$ M)

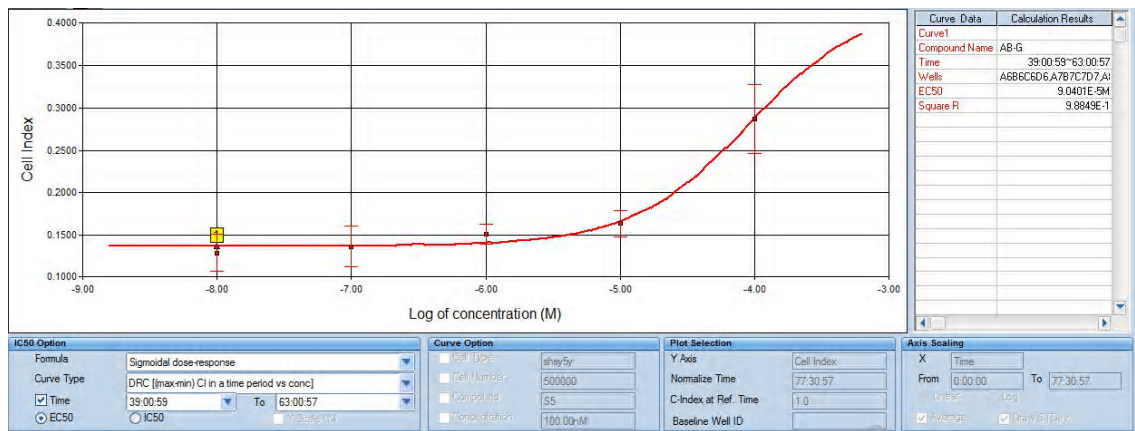
**Şekil 4.2.** Amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra hücreler üzerine gingerol dozlarının etkisi

Hücre indeksi artarken uyguladığımız amyloid beta agregatı, oluşturduğu toksisite nedeniyle hücre indeksini anlamlı bir şekilde düşürmüştür. Gingerol'ün sırayla 0,01-0,1-1-10-100 mikromolarlık dozları papalel olarak uygulandığında hücre indeksinde en fazla artışın 100  $\mu$ M dozda olduğu gözlemlenmiştir. Artış hızı en yavaş olan kuyucuk ise, 0.01  $\mu$ M dozda gingerolün uygulandığı kuyucuktur. Bu durumda gingerolün uygulanan dozu ile hücre indeksine etkisi açısından aralarında doğru orantı vardır. Ayrıca amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisitede ferulik asit, hücre indeksini en çok artıran madde olmuştur.



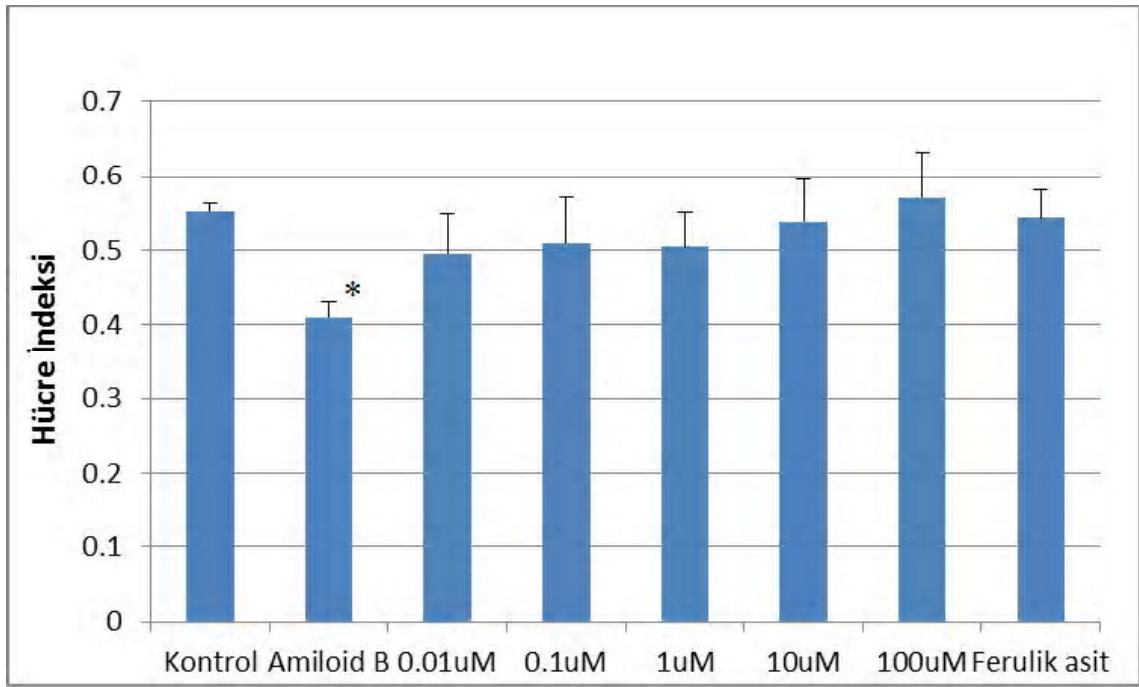
**Şekil 4.3.** Gingerol için amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra 24. saatteki sigmoidal doz-cevap eğrisi

Amiloid beta agregatı ile toksisite oluşturulduktan sonra 24. saatte gingerolün doz yanıt eğrisi üzerinde  $EC_{50}$  11.2  $\mu$ M olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 4.4.** Gingerol için amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra 24 saatlik zaman dilimindeki sigmoidal doz-cevap eğrisi

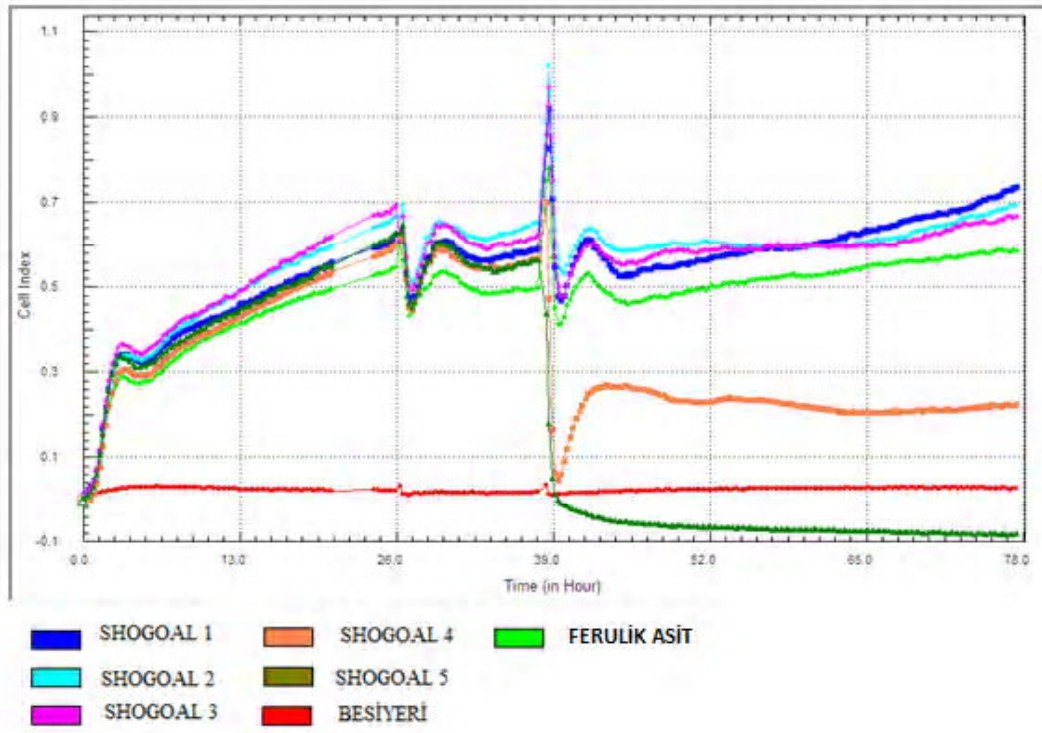
Amiloid beta agregatı ile toksisite oluşturulduktan sonra 24 saatlik zaman dilimindeki gingerolün doz yanıt eğrisi üzerinde  $EC_{50}$  90.4  $\mu$ M olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 4.5.** Amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra gingerol uygulamasının 24. saatinde hücre indeksindeki değişiklikler (\*Kontrole göre  $p < 0,05$ )

Amiloid beta agregatı uygulanması ile hücre indeksinde kontrole göre belirgin bir düşüş gözlemlendi ( $p < 0,05$ ). Gingerol uygulamasından sonra 24. saatte gingerolün uygulanan bütün dozlarının hücre indeksini doza bağımlı olarak artırdığı görüldü. Ayrıca bu artışın hemen hemen ferulik asitle paralellik gösterdiği bulundu.

### 4.1.3. Hücreler Üzerinde Amiloid Beta Toksikitesi Oluşturulmadan Shogaol'ün Etkisi

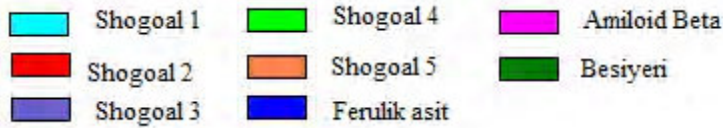
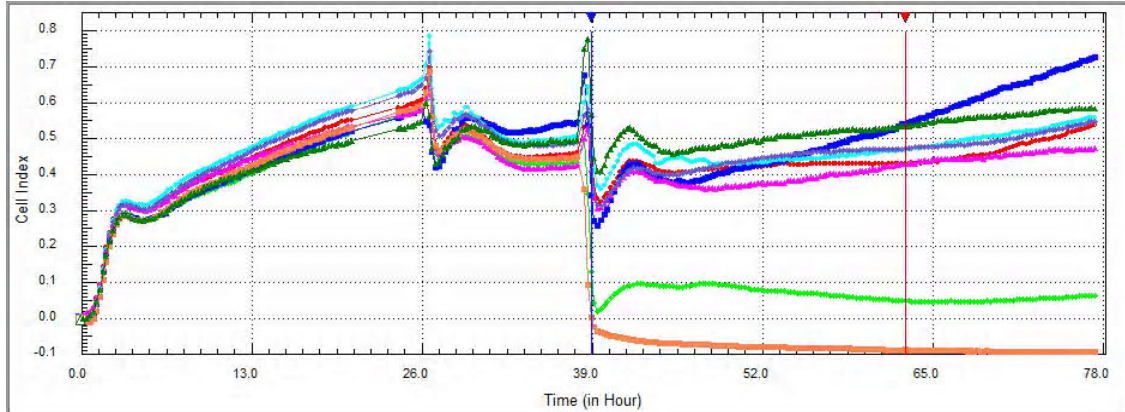


(Shogaol 1 0.01  $\mu$ M; Shogaol 2 0.1  $\mu$ M; Shogaol 3 1  $\mu$ M; Shogaol 4 10  $\mu$ M; Shogaol 5 100  $\mu$ M)

**Şekil 4.6.** Amiloid beta agregatı uygulanmadan hücreler üzerine shogaol dozlarının etkisi

Amiloid beta agregatı ile toksisite oluşturulmadan shogaol'ün hücre indeksinde oluşturduğu değişiklikler incelendiğinde shogaol'ün düşük dozlarada hücre indeksini artırdığı hatta bu etkilerinin ferulik asitten daha iyi olduğu, ancak yüksek dozlarda toksisite gösterdiği gözlenmiştir.

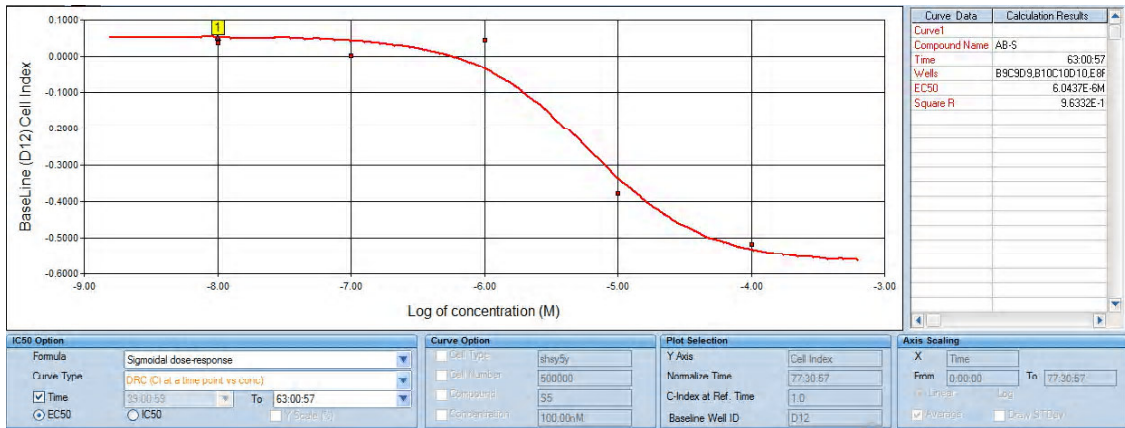
#### 4.1.4. Hücreler Üzerinde Amiloid Beta Toksikitesi Oluşturulduğunda Shogaol'ün Etkisi



(Shogaol 1 0.01  $\mu$ M; Shogaol 2 0.1  $\mu$ M; Shogaol 3 1  $\mu$ M; Shogaol 4 10  $\mu$ M; Shogaol 5 100  $\mu$ M)

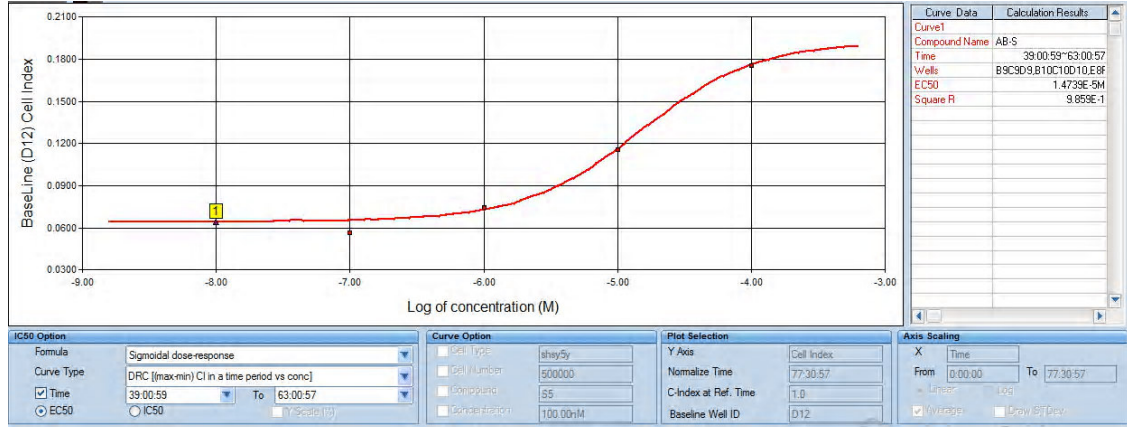
**Şekil 4.7.** Amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra hücreler üzerine shogaol dozlarının etkisi

Hücreler üzerine amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisitede hücre indeksini toksisite oluşturulmadan önceki artırıcı dozların 0.01  $\mu$ M , 0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M dozlar olduğu, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M dozlarda ise hücreler üzerine toksik etkisi gösterdiği saptanmıştır.



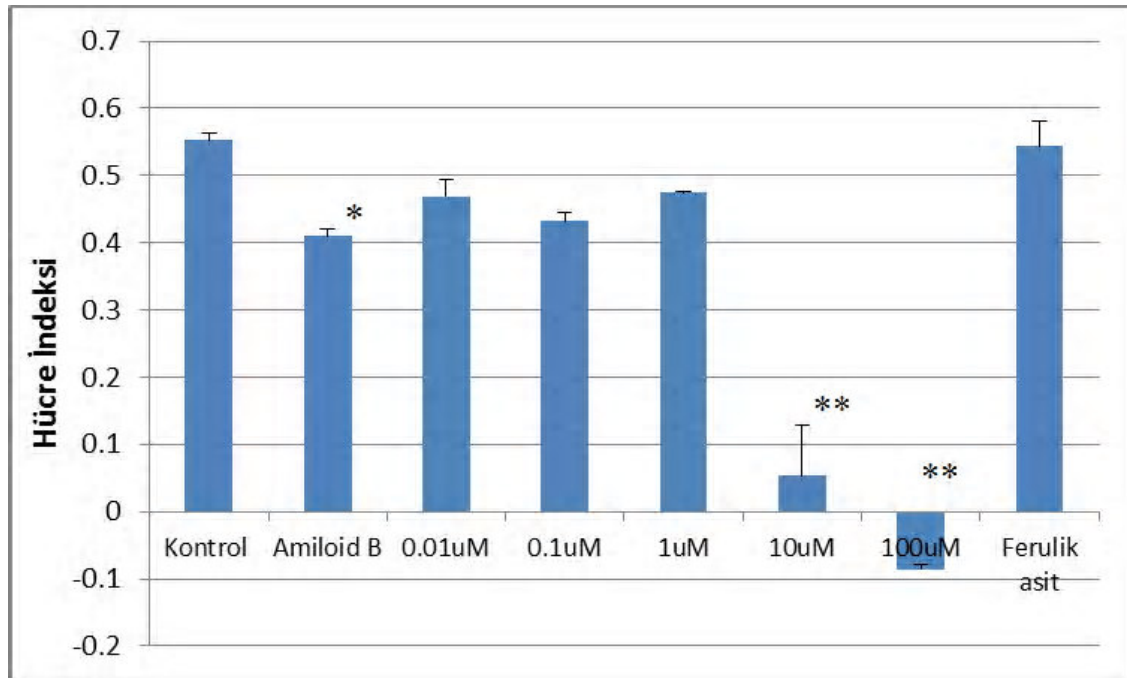
**Şekil 4.8.** Shogaol için amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra 24. saatteki sigmoidal doz- cevap eğrisi

Amiloid beta agregatı ile toksisite oluşturulduktan sonra 24. saatte shogaol doz yanıt eğrisi üzerinde  $EC_{50}$  6  $\mu$ M olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 4.9.** Shogaol için amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra 24 saatlik zaman dilimindeki sigmoidal doz-cevap eğrisi

Amiloid beta agregatı ile toksisite oluşturulduktan sonra 24 saatlik zaman dilimindeki shogaol doz yanıt eğrisi üzerinde  $EC_{50}$  14.7  $\mu$ M olarak hesaplanmıştır.



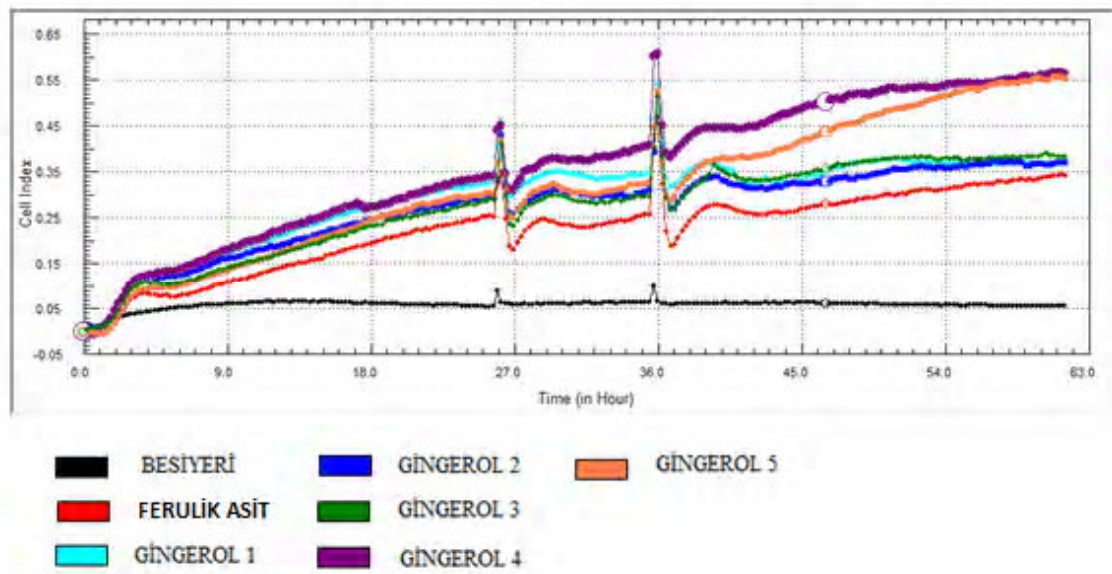
**Şekil 4.10.** Amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra shogaol uygulamasının 24. saatinde hücre indeksindeki değişiklikler (\*Kontrolle göre  $p < 0,05$ , \*\*Kontrolle göre  $p < 0,001$ )

Amiloid beta agregatı uygulanması ile hücre indeksinde kontrole göre belirgin bir düşüş gözlemlendi ( $p < 0,05$ ). Shogaol uygulamasından sonra 24. saatte shogaolün 1 $\mu$ M'dan sonra

hücre indeksini doza bağımlı olarak düşürdüğü görüldü. Shogaolün düşük dozlarında hücre indeksini artırıcı etkisi ise her doz için ferulik asitten düşük bulundu.

## 4.2. AMİLOİD BETA OLİGOMERLERİNİN HÜCRELERE UYGULANMASINDAN SONRA GİNGEROL VE SHOGAOL'ÜN ETKİSİ

### 4.2.1. Hücreler Üzerinde Amiloid Beta Toksisitesi Oluşturulmadan Gingerol'ün Etkisi

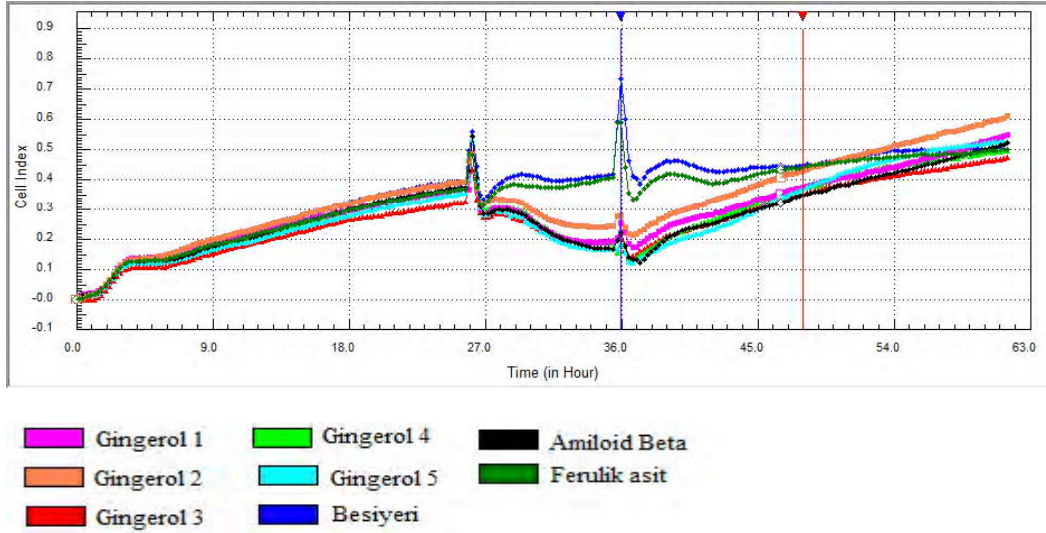


(Gingerol 1 0.01  $\mu$ M; Gingerol 2 0.1  $\mu$ M; Gingerol 3 1  $\mu$ M; Gingerol 4 10  $\mu$ M; Gingerol 5 100  $\mu$ M)

Şekil 4.11. Amiloid beta oligomeri uygulanmadan hücreler üzerine gingerol dozlarının etkisi

Amiloid beta oligomeri ile toksisite oluşturulmadan önce gingerol'ün hücreler üzerindeki etkileri incelendiğinde gingerol'ün her dozda ferulik asite kıyasla hücre indeksini daha fazla artırdığı ve etkisinin hemen hemen doza bağımlı bir etkiye sahip olduğu gözlemlendi.

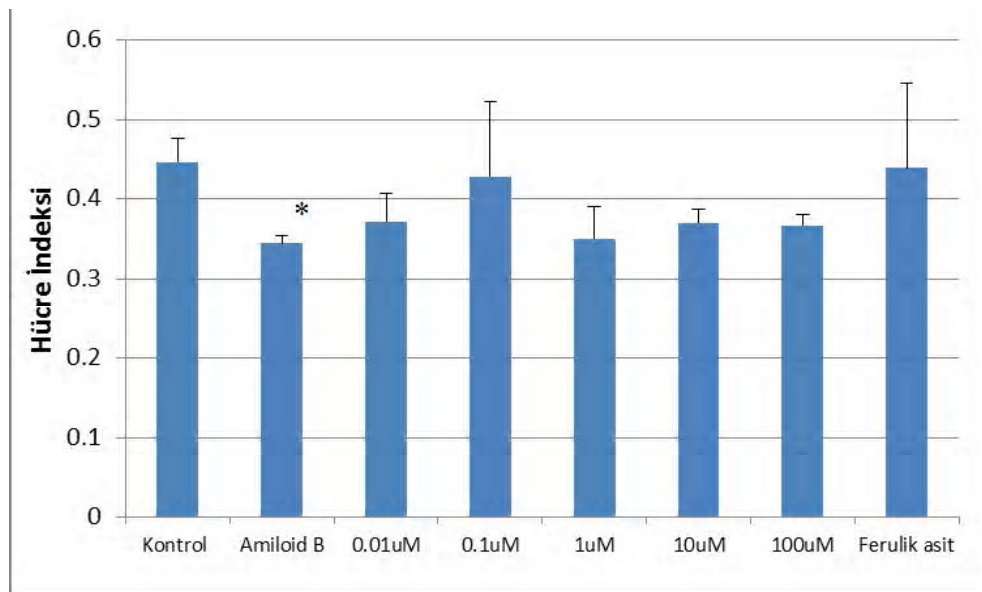
#### 4.2.2. Hücreler Üzerinde Amiloid Beta Toksisitesi Oluşturulduktan Sonra Gingerol'ün Etkisi



(Gingerol 1 0.01  $\mu$ M; Gingerol 2 0.1  $\mu$ M; Gingerol 3 1  $\mu$ M; Gingerol 4 10  $\mu$ M; Gingerol 5 100  $\mu$ M)

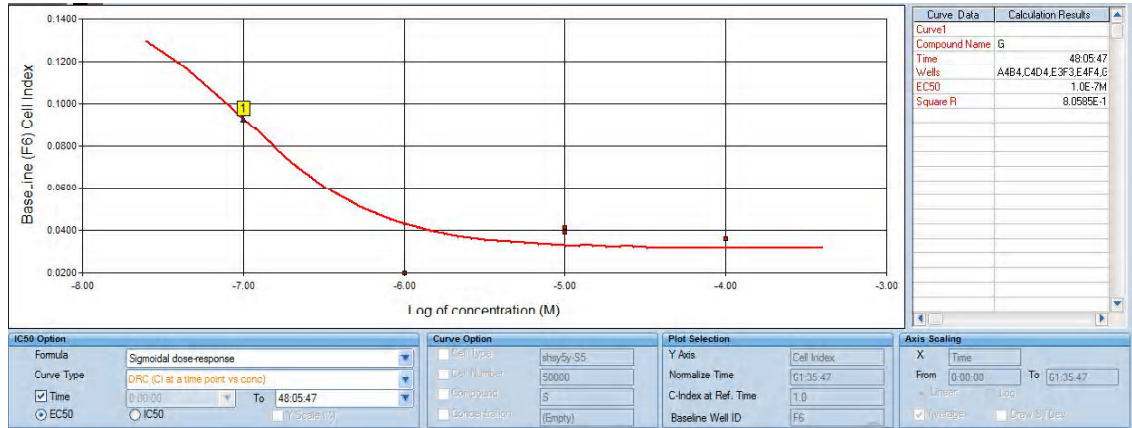
**Şekil 4.12.** Amiloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra hücreler üzerine gingerol dozlarının etkisi

Amiloid beta oligomerleri ile toksisite oluşturduktan sonra gingerol uygulanması durumunda gingerol'ün hücre indeksini önemli derecede artırdığı ve toksisiteden koruduğu ve gingerol'ün en son iki dozunda ferulik asitten daha etkili olduğu bulundu.



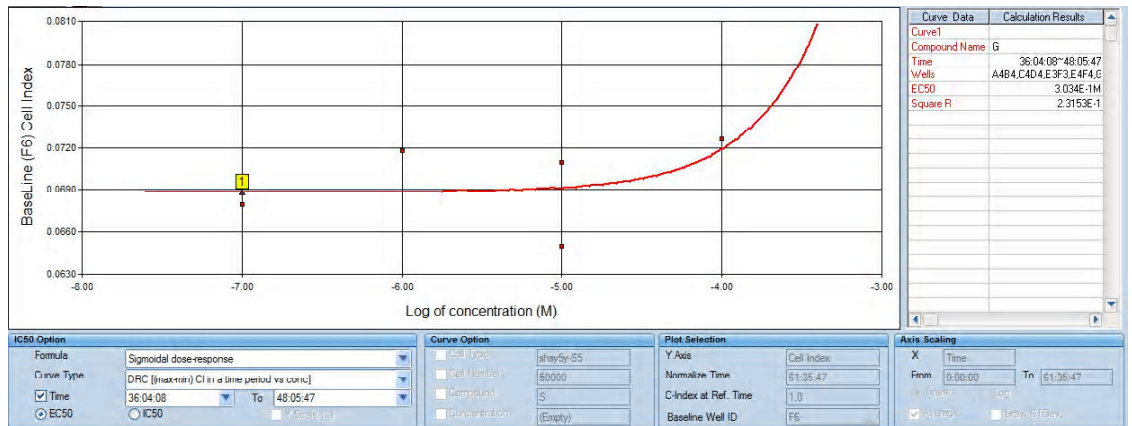
**Şekil 4.13.** Amiloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra gingerol uygulamasının 12. saattinde hücre indeksindeki değişiklikler (\*Kontrole göre  $p < 0,05$ )

Amiloid beta oligomeri uygulanması ile hücre indeksinde kontrole göre belirgin bir düşüş gözlemlendi. Gingerol uygulamasından sonra 12. saatte gingerol'ün uygulanan bütün dozlarının hücre indeksini artırdığı gözlemlendi. Fakat hem ferulik asitteki hemde ginderoldaki artış oligomerin oluşturduğu toksisiteyi geriye döndürecek kadar kuvvetli değildir. Bu yüzden istatistiksel olarak anlamlı değildir.



**Şekil 4.14.** Gingerol için Amiloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra 24. saatteki sigmoidal doz-cevap eğrisi

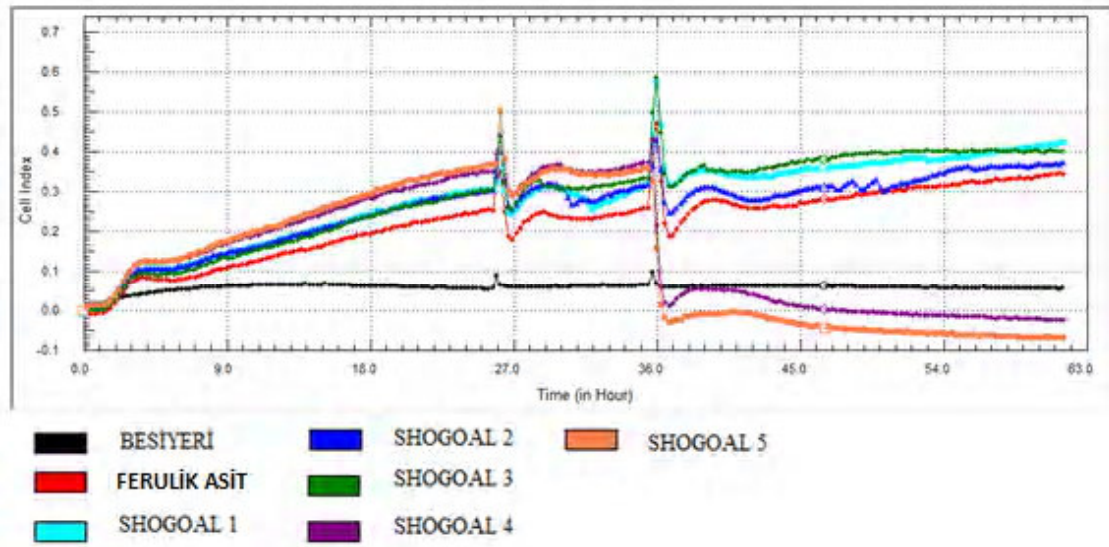
Amiloid beta oligomeri ile toksisite oluşturulduktan sonra 12. saatte gingerolün doz yanıt eğrisi üzerinde  $EC_{50}$  0.1  $\mu$ M olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 4.15.** Gingerol için Amiloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra 24 saatlik zaman dilimindeki sigmoidal doz-cevap eğrisi

Amiloid beta oligomeri ile toksisite oluşturulduktan sonra 24 saatlik zaman dilimindeki gingerolün doz yanıt eğrisi üzerinde  $EC_{50}$  0,3 M olarak hesaplanmıştır.

### 4.2.3. Hücreler Üzerinde Amiloid Beta Toksisitesi Oluşturulmadan Shogaol'ün Etkisi

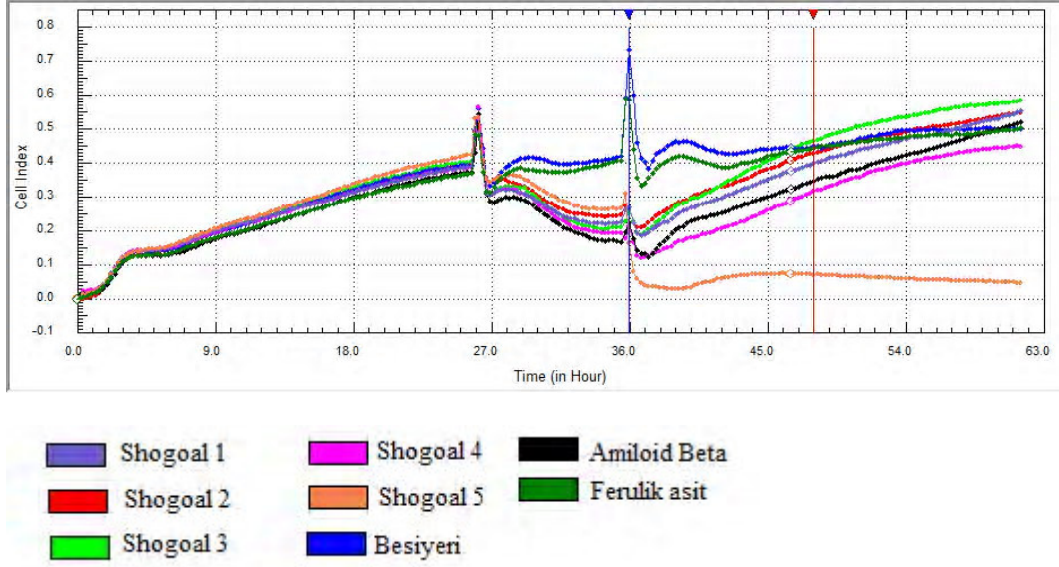


(Shogaol 1 0.01  $\mu$ M; Shogaol 2 0.1  $\mu$ M; Shogaol 3 1  $\mu$ M; Shogaol 4 10  $\mu$ M; Shogaol 5 100  $\mu$ M)

Şekil 4.16. Amyloid beta oligomeri uygulanmadan hücreler üzerine shogaol dozlarının etkisi

Amiloid beta oligomeri ile toksisite oluşturulmadan shogaol'ün hücre indeksi üzerindeki etkileri incelendiğinde shogaolün düşük dozlarda hücre indeksini artırdığı hatta bu etkilerinin ferulik asitten daha iyi olduğu ancak yüksek dozlarda toksisite gösterdiği gözlenmiştir.

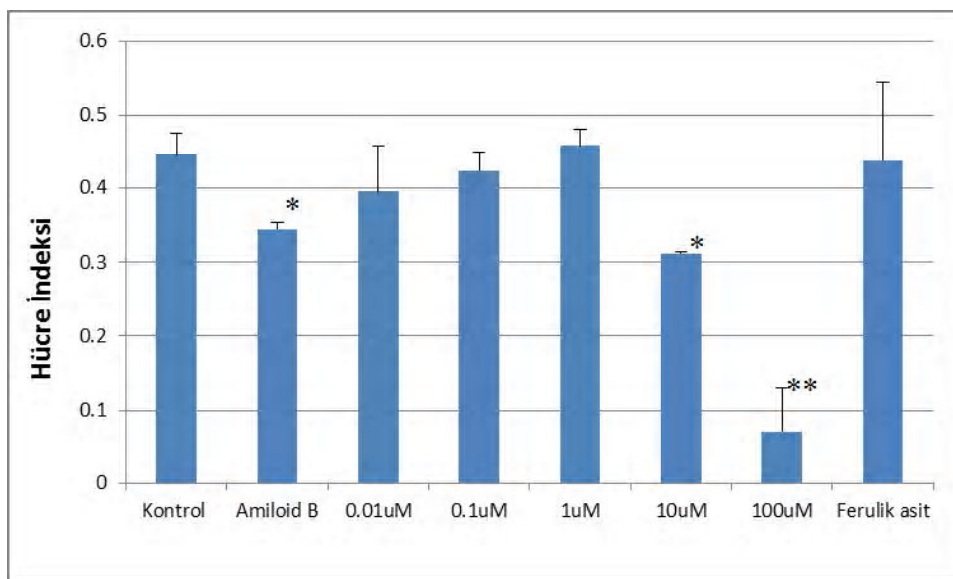
#### 4.2.4. Hücreler Üzerinde Amyloid Beta Toksisitesi Oluşturulduktan Sonra Shogol'ün Etkisi



(Shogol 1 0.01 µM; Shogol 2 0.1 µM; Shogol 3 1 µM; Shogol 4 10 µM; Shogol 5 100 µM)

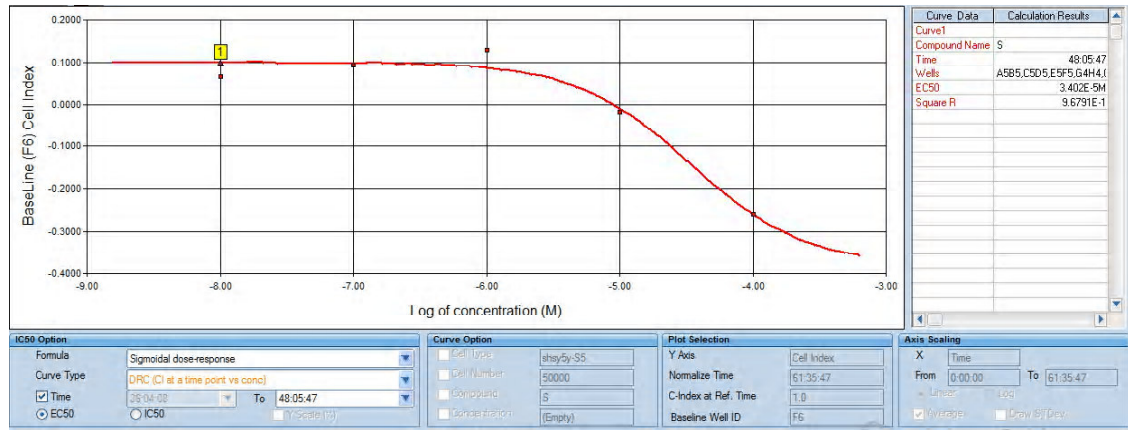
**Şekil 4.17.** Amyloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra hücreler üzerine shogol dozlarının etkisi

Amyloid beta oligomerleri ile oluşturulan toksisitede shogol'ün etkileri incelendiğinde hücre indeksini 0.01µM ve 0.1µM dozlarda artırdığı 1µM ve daha yüksek dozlarda ise shogol'ün kendisinin toksisite gösterdiği bulundu.



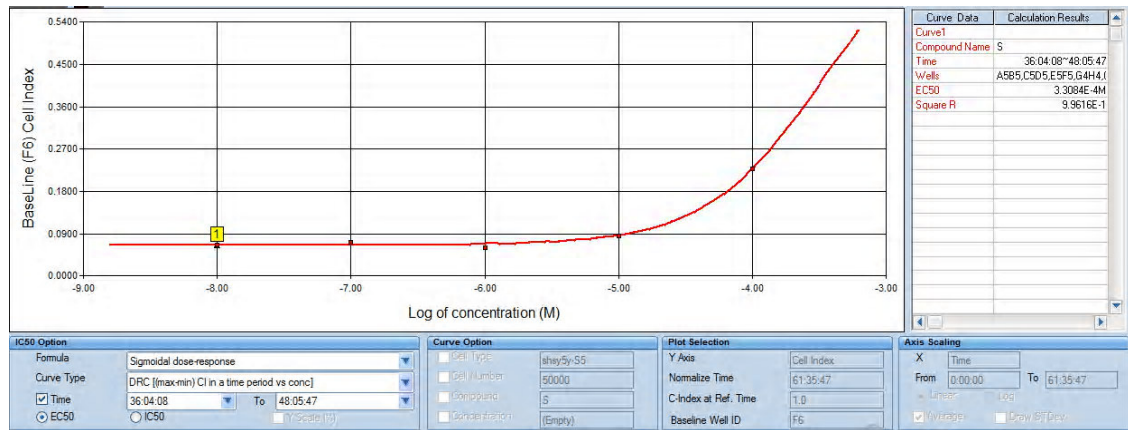
**Şekil 4.18.** Amyloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra shogol uygulamasının 12. saatinde hücre indeksindeki değişiklikler (\*Kontrolle göre p<0,05, \*\*Kontrolle göre p<0,001)

Amiloid beta oligomeri uygulanması ile hücre indeksinde kontrole göre belirgin bir düşüş gözlemlendi. Shogaol uygulamasından sonra 12. saatte shogaolün 1 $\mu$ M'dan sonra hücre indeksini doza bağımlı olarak düşürdüğü görüldü. Shogaolün düşük dozlarında hücre indeksini artırıcı etkisi ise her doz için ferulik asitten düşük bulundu.



**Şekil 4.19.** Shogaol için Amiloid beta oligomer ile oluşturulan toksisiteden sonra 12. saatteki sigmoidal doz-cevap eğrisi

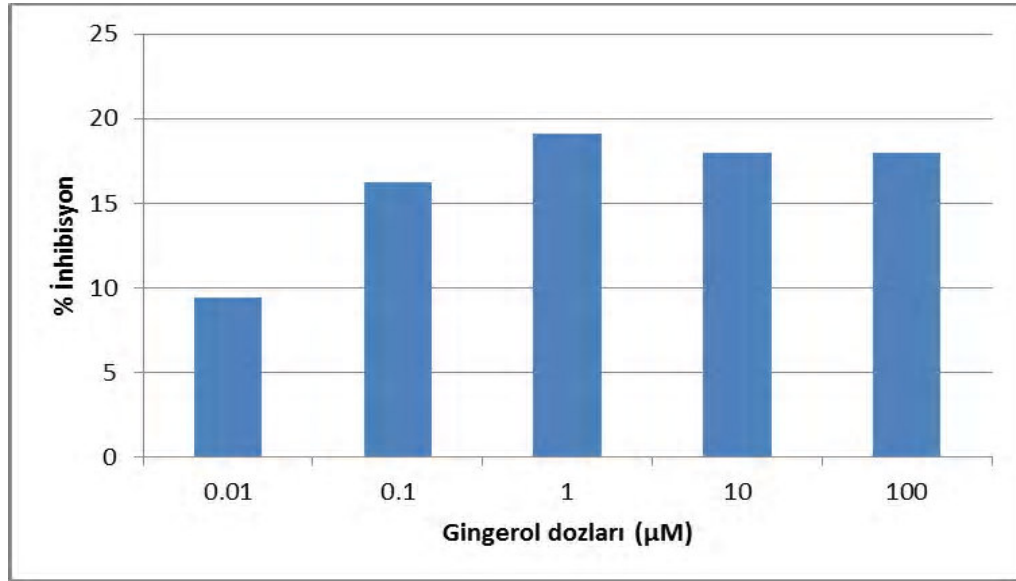
Amiloid beta oligomer ile toksisite oluşturulduktan sonra 12. saatte shogaol doz yanıt eğrisi üzerinde EC<sub>50</sub> 34  $\mu$ M olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 4.20.** Shogaol için Amiloid beta oligomer ile oluşturulan toksisiteden sonra 12 saatlik zaman dilimindeki sigmoidal doz-cevap eğrisi

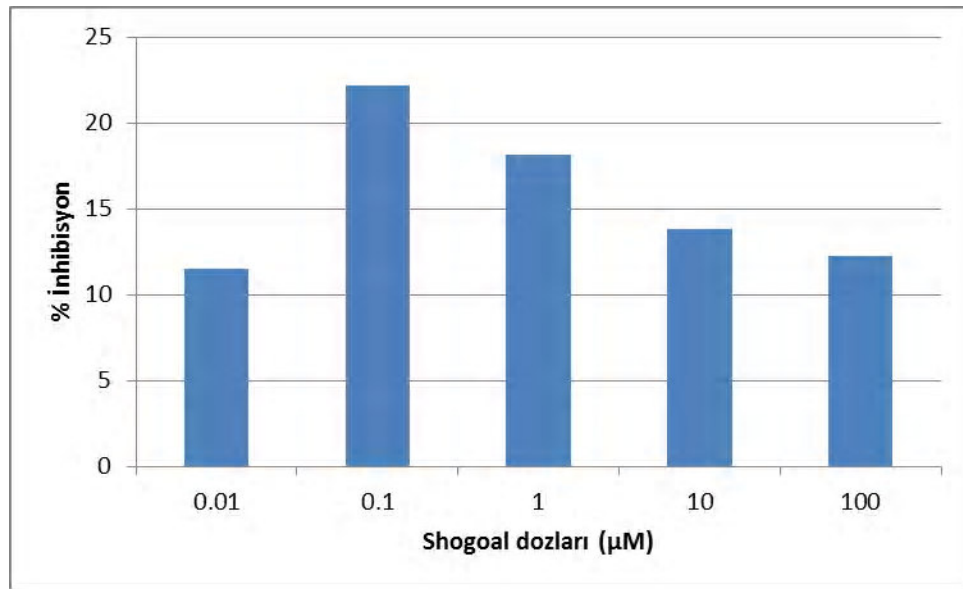
Amiloid beta oligomer ile toksisite oluşturulduktan sonra 12 saatlik zaman dilimindeki shogaol doz yanıt eğrisi üzerinde EC<sub>50</sub> 330 $\mu$ M olarak hesaplanmıştır.

### 4.3. GSK-3 $\beta$ İNHİBİSYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ



Şekil 4.21. Gingerolün doza bağımlı % inhibisyonu

GSK-3 $\beta$  enziminin aktivitesi üzerine gingerol'ün etkileri incelendiğinde gingerol'ün doza bağımlı olarak enzimi inhibe ettiği gözlemlendi.



Şekil 4.22. Shogol'ün doza bağımlı % inhibisyonu

GSK-3 $\beta$  enziminin aktivitesi üzerine shogaol'ün etkileri incelendiğinde shogaol'ün 0.1 μM'lık dozunda en yüksek inhibisyona sahip olduğu, 1 μM ve daha yüksek dozlarda sonrasında doza bağımlı olarak inhibisyonun azaldığı gözlemlendi.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzün en yaygın hastalıklarından biri olan Alzheimer patolojisinde önemli bir rolü olan amiloid beta toksisitesinden korunmada bu zamana kadar birçok sentetik ve doğal bileşimin etkinliği (33, 34) denenmiş ve birçok mekanizma üzerinden amiloid beta toksisitesi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Amiloid beta toksisitesinde daha önce bulunan enflamatuar teori, oksidatif stress teorisi ve bunlara ek olarak son zamanlarda yapılan çalışmalar GSK-3 $\beta$  enziminin önemli bir role sahip olabileceğini göstermiştir (35).

Yapılan çalışmalar GSK-3 $\beta$  enzim inhibisyonunun nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu rolünün olabileceğini göstermiştir (36). Bu nedenle son yıllarda bu enzimin inhibisyonu üzerinden koruyucu etkiye sahip olabilecek sentetik ve doğal bileşikler bulunmaya çalışılmıştır (37). Söz konusu enzim üzerinde inhibitör etkinlik göstererek amiloid beta toksisitesinde korunmada denenilen bazı bitkisel ekstraktlar ve saf maddelerin hücreler üzerinde koruyucu etkiye sahip oldukları gösterilmiştir (38). Saf maddelerde ferulik asidin amiloid beta toksisitesi üzerinde koruyucu etkileri tanımlanmıştır (39). Yapıca ferulik aside benzeyen ve *Zingiber officinale* (zencefil) bitkisinde yoğun bir şekilde bulunan gingerol ve shogaol saf maddelerinin amiloid beta toksisitesi üzerindeki koruyucu etkilerini gösteren ve bu maddelerin GSK-3 $\beta$  enzimi inhibisyonu yapıp yapmadığına dair literatürde herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda, hem amiloid beta agregatları hem de oligomerleri ile oluşturulan toksisitede gingerol ve shogaolün SHSY-5Y nöroblastoma hücrelerinde proliferasyon üzerine etkileri araştırılmış hem de bu maddelerin GSK-3 $\beta$  enzim inhibitörü olup

olmadıkları değerlendirilerek hücrelerdeki koruyucu etkilerinin bu enzim inhibisyonu ile ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Gerçekleştirilen deneyler sonucunda gingerol'ün kullanılan her dozunda hücre indeksini hem amiloid beta toksisitesi oluşturulan hem de oluşturulmayan hücrelerde artırdığı, diğer bir ifade ile hücre proliferasyonunu desteklediği, shogaol'ün ise düşük dozlarda hücre indeksini artırdığı ancak yüksek dozlarda toksik etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

GSK-3 $\beta$  enzimi üzerindeki inhibitör etkileri incelendiğinde ise gingerol'ün doza bağımlı olarak enzimi %20'lere kadar inhibe ettiği, shogaol'ün ise 0.1 $\mu$ M'lık dozunda en yüksek inhibisyona sahip olduğu ancak bundan daha yüksek dozlarda enzim üzerindeki inhibitör etkisinin doza bağımlı olarak giderek azaldığı sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar hücre indeksi sonuçları ile de paralellik göstermektedir. Şöyle ki, enzim inhibisyonunun yüksek olduğu konsantrasyonlarda hücre indeksi artmış yani maddelerin hücreler üzerindeki koruyucu etkileri artmış, inhibisyonun az olduğu dozlarda ise hücrelerdeki koruyucu etkinlik azalmış hatta shogaol'ün yüksek dozlarında toksisiteye neden oldukları gözlenmiştir. Ayrıca gingerol'ün bütün dozları için shogaol'ün de düşük dozları için hem hücre indeksinde hem de enzim inhibisyonunda ferulik asitten daha etkili olduğu bulunmuştur.

Sonuç olarak, gingerol ve shogaol'ün belirli dozlarda ferulik aside benzer şekilde hem A $\beta$  oligomerleri hem de A $\beta$  agregatları ile oluşturulan toksisiteye karşı koruyucu oldukları ve GSK-3 $\beta$  enzimini inhibe edebildikleri ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir.

## **6. KAYNAKLAR**

1. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991; 82: 239-259.
2. Bennett DA, Schneider JA, Wilson RS, et al. Neurofibrillary tangles mediate the association of amyloid load with clinical Alzheimer disease and level of cognitive function. *Arch Neurol* 2004; 61: 377-378.
3. Tanzi RE. Tangles and neurodegenerative disease a surprising twist. *N Engl J Med* 2005; 353:1852-1853.
4. Santacruz K, Lewis J, Spires T, et al. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 2005; 309: 475-476.
5. Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, et al. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7737-7741.
6. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 120: 885-890.
7. Masters CL, Simms G, Weinman NA, et al. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 4245-4249.
8. Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, et al. Visualization of A beta 42 (43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42. *Neuron* 1994; 13: 45-53.
9. Cummings JL. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 55-56.

10. Georganopoulou DG, Chang L, Nam JM, et al. Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 2272-2273.
11. Kelnin WL, Kraft GA, Finch CE. Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum *Trends. Neurosci* 2001; 24: 218-219.
12. Gandy S. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 2005; 115: 1120-1121.
13. Pansari K, Gupta A, Thomas P. Alzheimer's disease and vascular factors: facts and theories. *Int J Clin Pract* 2002; 56: 197-203.
14. Citron M, Oltersdorf T, Haass C, et al. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 1992; 360: 672-674.
15. Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, et al. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 1994; 264:1336-1340.
16. Gürvit H. Sinir Sisteminin Dejeneratif Hastalıkları. Demans Sendromu, Alzheimer Hastalığı ve Alzheimer dışı demanslar. İçinde: Öge AE; ed. Nöroloji. İstanbul: Nobel Matbaacılık; 2004: 367-415.
17. Markesbery WR, Kryscio RJ, Lovell MA et al. Lipid peroxidation is an early event in the brain in amnesic mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 2005; 58: 730.
18. Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's Disease. *Science*. 2006; 314: 777-781.
19. Price JL, Morris JC. Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999; 45: 358-368.
20. Akiyama H, Barger S, Barnum S, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000; 21: 383-421.
21. Choi C, Park JY, Lee J, et al. Fas ligand and fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , or IFN- $\gamma$ . *J Immunol* 1999; 162: 1889-1895.
22. Genç Ş, Kızıldağ S, Genç K. İnflamatuvar uyaranların mikrogial TRAIL ekspresyonu üzerine etkisi. *Geriatrics* 2002; 5: 44-48.

23. Marin DB, Sewell MC, Schlechter A. Alzheimer's disease: accurate and early diagnosis in the primary care setting. *Geriatrics* 2002; 57: 36-40.
24. Mintun MA, Larossa GN, Sheline YI, et al. [11C]PIB in a nondemented population: potential antecedent marker of Alzheimer disease. *Neurology* 2006; 67: 446-452.
25. Keesing JLS. Useful plants. In: *Kew Gardens Book of Indoor Plants*, ed. J.B. Simmonds, pp. 1988; 186-213.
26. Pursglove JS, Brown EG, Green CL, Robbins, SRJ. *Spices, Volume 2*. Longman Tropical Agriculture Series. 1981.
27. Shafina Hanim Mohd Habib, Suzana Makpol, Noor Aini Abdul Hamid et al. Ginger extract (*Zingiber officinale*) has anti-cancer and anti-inflammatory effects on ethionine-induced hepatoma rats. *Clinics* 2008;63:807-813
28. Jellin JM, Gregory PJ et al. *Pharmacist's Letter/Prescriber's Letter Natural Medicines Comprehensive Database, 10th Edition*. Therapeutic Research Faculty, Stockton. 2008.
29. Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 2003;116:1175-1186.
30. Verheyen EM, Gottardi CJ. Regulation of Wnt/beta-catenin signaling by protein kinases. *Dev Dyn* 2010; 239: 34-44.
31. Hofmann C, Dunger N, Schölmerich J, Falk W, Obermeier F. Glycogen synthase kinase 3- $\beta$ : a master regulator of toll-like receptor-mediated chronic intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:1850-1858.
32. Boonen RA, van Tijn P, Zivkovic D. Wnt signaling in Alzheimer's disease: up or down, that is the question. *Ageing Res Rev* 2009;8:71-82.
33. Rhein V, Giese M, Baysang G, et al. *Ginkgo biloba* extract ameliorates oxidative phosphorylation performance and rescues AB-induced failure. *PLOS One* August 2010;5: 8-9
34. Iuvone T, De Filippis D, Esposito G, et al. The spice sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cells from amyloid-beta peptide-induced neurotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;317:1143-1149.

35. Serenó L, Coma M, Rodríguez M, et al. A novel GSK-3 $\beta$  inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo. *Neurobiol Dis.* 2009;35:359-367.
36. Koh S, Noh MY, Kim SH. Amyloid beta induced neurotoxicity is reduced by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *Brain Research* 2008;1188:254-262.
37. Meijer L, Flajolet M, Greengard P, Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends in Pharmacological Sciences.* 2004;25:8-9.
38. Zhou Y, Li W, Xu I, Chen L. In salvia miltiorrhiza, phenolic acids possess protective properties against amyloid B-induced cytotoxicity, and tanshinones act as acetylcholinesterase inhibitors. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2011;443-452.
39. Cui L, Zhang Y, Cao H, et al. Ferulic acid inhibits the transition of amyloid- $\beta$ 42 monomers to oligomers but accelerates the transition from oligomers to fibrils. *J Alzheimers Dis.* 2013;31:42-43.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı, Soyadı:** Mehmet Kaan Tiryaki

**Uyruğu:** Türkiye (TC)

**Doğum Tarihi ve Yeri:** 2 Mayıs 1987, Kırşehir

**Medeni Durumu:** Bekâr

**Tel:** +90 386 214 32 28

**Fax:** +90 386 214 32 28

**email:** eczmkt@gmail.com

**Yazışma Adresi:** Tiryaki Eczanesi Ahi Evran Mah. Yavuz Sultan Selim Bulvarı Keleş Apt. No: 19/A Kırşehir/ Merkez

### EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	EÜ Eczacılık Fakültesi	2010
Lise	H.F.E Anadolu Lisesi, Kırşehir	2005

### İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2011- Halen	Tiryaki Eczanesi	Sahip ve Mesul Müdürü
2010–2011	Kayseri Acıbadem Hastanesi	Sorumlu Eczacı

### YABANCI DİL

İngilizce