



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***SİDERİTİS* TÜRÜ BİTKİ EKSTRELERİ YÜKLÜ
NANOPARTİKÜLLERİN ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU
VE ANTI-ALZHEİMER ETKİLERİNİN
İN VİTRO VE *İN VİVO* OLARAK BELİRLENMESİ**

SALİHA AYDIN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. MUHAMMET EMİN ÇAM
FARMAKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL- 2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Saliha AYDIN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, iyi bir akademisyen olmam için yoluma ışık tutan, karşılaştığım sorunlarda çözüme ulaşmama yardım eden, sabrını ve hoşgörüsünü hiç eksik etmeyen, öğrencisi olmaktan daima onur duyduğum saygıdeğer danışmanım Doç. Dr. Muhammet Emin Çam'a,

Kendisini tanıdığım günden bugüne eğitimci kişiliğini kendime örnek aldığım, her koşulda desteğini ve sevgisini hissettiğim, Farmakoloji Ana Bilim Dalı'nı bana sevdiren çok kıymetli hocam Prof. Dr. Levent Kabasakal'a,

Çalışmalarım süresince vermiş oldukları destekler için dekanımız Prof. Dr. Hatice Kübra Elçioğlu ve diğer Farmakoloji Ana Bilim Dalı üyeleri Dr. Öğr. Üyesi Büşra Ertaş, Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Nur Hazar Yavuz ve Arş. Gör. Elif Beyzanur Polat'a,

Çalışmalarıma katkı sağlayan değerli hocalarım Doç. Dr. Esra Tatar, Doç. Dr. Turgut Taşkın, Doç. Dr. Murat Doğan, Öğr. Gör. Ayşe Mine Yılmaz Göler, Dr. Öğr. Üyesi Ayfer Beceren, Dr. Öğr. Üyesi İsmail Şenkardeş, Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe Dikpınar, Dr. Öğr. Üyesi Muhammet Sait Toprak, Dr. Öğr. Üyesi Şükran Özdatlı Kurtuluş ve Arş. Gör. Dr. Zarife Nigâr Özdemir Kumral'a,

Yeterlilik sınavı sürecinde beni destekleyen can dostum Ecz. Fadime Topal'a, her zaman yanımda olan biricik arkadaşlarım Ecz. Gita Parviz, Ecz. Şevval Gülşah Tekinalp, Ecz. Fatima Abobakr, ve Ecz. Rəvanə Babazadə'ye, bitki çalışmalarında destek aldığım değerli arkadaşım Ecz. Mizgin Ermanoğlu'na, hayvan çalışmalarını beraber sırtladığımız canım arkadaşım Ecz. Ece Güler'e, histoloji çalışmalarında beraber çalıştığım Gül Sinemcan Özcan'a, DEHAMER'in sevgili çalışanları Cihat Yıldız, Kadir Demirci ve Deniz Mukaddes Türet'e, tez boyunca küçük büyük demeden farklı dönemlerde desteklerini aldığım arkadaşlarım Ecz. Hümeysa Kiyak Kırmacı, Ecz. Rumeysa Polatbilek, Ecz. Münire Köse, Ecz. İlke Kabaoğlu Çalı, Ecz. Hümeysa Yekeler, Sabiha Kendirci, İbrahim Özdikici, Bilge Tuzcu, Gülsüm Ercan, Selda Yardımcı, Özlem Sağıroğlu, Ebrar Tutar, Ömrüm Nalkıran, Deniz Karaokur, Yunus Emre Yüksek ve Kübra Bucak'a, her zorlandığımda bana güç veren, her mutluluğuma ortak olan arkadaşlarım Ayşe Kılıç, Gülcan Gül, Yaprak Naneci, Betül Arslan, Büşra Şahin, Elif Erol, Zeynep Arslan, Rabia Önen, Fatmanur Gültekin, Mizgin Avcı, Huri Nur Yağcı ve Zehragül Köse'ye,

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi manevi her an yanımda olup beni koşulsuz destekleyen en kıymetli hazinelerim annem Zeynep Tülay Aydın, babam Seyit Aydın, abim Feyzullah Aydın, kardeşlerim Fevzettin Aydın, Mustafa Aydın, Mehmet Emin Aydın ve Sümeyye Aydın'a, tez bitkimi toplamak için dağları taşları karış karış arayan amcalarım Alişan Aydın, Emin Aydın ve Mehmet Aydın'a,

Şu an yanımda olamasa da aldığım her kararda arkamda duracağını, beni destekleyeceğini bildiğim, her zaman daha iyisi için uğraşmamı ve ülkemize yararlı bir insan olmamı isteyen, gurur kaynağım, rol modelim, biricik abim Şehit Piyade Teğmen Raşit Aydın'a,

En içten teşekkür ve minnetlerimi sunarım.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2022-10515 proje kodu ve numarası ile, Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı tarafından A Grubu Acil AR-GE - 22508 proje kodu ve numarası ile, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu tarafından 1002B - 123S845 proje kodu ve numarası ile desteklenmiştir.

Saliha AYDIN

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR LİSTESİ	i
TABLO LİSTESİ	iii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	8
4.1. Alzheimer Hastalığı (AH).....	8
4.1.1. AH'nin tanımı ve temel bilgiler	8
4.1.2. AH'nin insidansı ve prevalansı	9
4.1.3. AH'nin nöropatofizyolojisi	10
4.1.3.1. A β kaskadı hipotezi	10
4.1.3.2. Tau hipotezi.....	11
4.1.3.3. Kolinerjik hipotez.....	12
4.1.3.4. İnflamasyon hipotezi	12
4.1.4. Oksidatif stresin AH'deki rolü	13
4.1.5. AH'nin teşhisi	13
4.1.6. AH'nin risk faktörleri.....	14
4.1.6.1. Genetik faktörler.....	14
4.1.6.2. Hipertansiyon	15
4.1.6.3. Tip 2 diabetes mellitus	15
4.1.6.4. Obezite.....	15
4.1.6.5. Stres, depresyon ve uyku bozukluğu.....	16
4.1.6.6. Sigara ve alkol kullanımı.....	17
4.1.7. AH'de tedavi yaklaşımları	18
4.1.7.1. Farmakolojik ve farmakolojik olmayan yaklaşımlar.....	18
4.1.7.2. Yeni tedavi yaklaşımları.....	19
4.2. AH Tedavisinde Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	20
4.3. Botanik Bilgiler.....	21
4.3.1. <i>Sideritis</i> cinsi.....	21
4.3.1.1. <i>Sideritis germanicopolitana</i> Bornm. subsp. <i>viridis</i> Hausskn. ex Bornm. (SGV)	21
4.3.1.2. <i>Sideritis Libanotica</i> Labill. subsp. <i>Linearis</i> (Bentham) Bornm. (SLL)	22

5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	24
5.1. Materyaller.....	24
5.2. Bitki Materyalinin Temin Edilmesi.....	24
5.3. Ekstrelerin Hazırlanması.....	24
5.4. <i>İn Vitro</i> Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri.....	24
5.4.1. 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH) radikali giderme aktivite tayini.....	24
5.4.2. Demir indirgeme antioksidan gücü tayini (FRAP).....	25
5.4.3. Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC).....	25
5.5. <i>İn Vitro</i> Antikolinesteraz Aktivite Tayin Yöntemi.....	26
5.6. NP'lerin Üretilmesi.....	26
5.7. Üretilen NP'lerin Fizikokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi.....	27
5.7.1. Zeta potansiyeli (ζ) ölçümü.....	27
5.7.2. İlaç enkapsülleme verimliliği.....	27
5.7.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM).....	27
5.7.4. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopu (FTIR).....	27
5.7.5. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC).....	28
5.7.6. X ışını toz kırınımı (XRD).....	28
5.7.7. <i>İn vitro</i> ilaç salım profili.....	28
5.7.8. <i>İn vitro</i> salım kinetiği.....	28
5.8. <i>İn Vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları.....	29
5.8.1. A β_{1-42} çözeltilisinin hazırlanması.....	29
5.8.2. Hücre canlılığı analizi.....	29
5.8.3. Ekstrelerin kombinasyon indekslerinin (CI) tespiti.....	30
5.8.4. SH-SY5Y hücrelerinde anti-Alzheimer etkinliğin değerlendirilmesi.....	31
5.8.5. RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) analizi.....	31
5.9. Akut Toksikite Çalışmaları.....	32
5.10. <i>İn Vivo</i> Anti-Alzheimer Değerlendirme Çalışmaları.....	33
5.10.1. Çalışmanın protokolü.....	33
5.10.2. İntraserebroventriküler A β_{1-42} uygulaması.....	35
5.10.3. Davranış testleri.....	36
5.10.3.1. Açık alan testi.....	36
5.10.3.2. Morris'in su tankı testi.....	36
5.10.3.3. Pasif sakınma testi.....	37
5.10.3.4. Yeni obje tanıma testi.....	37

5.11. Alınan Doku Örneklerinde Yapılan Analizler.....	38
5.11.1. Beyinden alınan dokularda A β ₁₋₄₂ düzeyinin ELISA ile ölçülmesi	38
5.11.2. Histolojik analizler	38
5.11.3. İmmünohistokimyasal analizler	38
5.11.4. Konfokal görüntüleme	39
5.12. İstatiksel Değerlendirme.....	39
6. BULGULAR	40
6.1. <i>İn Vitro</i> Antioksidan Aktivite Sonuçları.....	40
6.1.1. DPPH radikali süpürücü aktivite tayini	40
6.1.2. FRAP tayini.....	40
6.1.3. CUPRAC tayini.....	41
6.2. <i>İn Vitro</i> Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları.....	41
6.3. Üretilen NP'lerin Fizikokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi.....	42
6.3.1. Zeta potansiyeli (ζ), NP'lerin parçacık boyutu ve polidispersi indeksi (PDI) ölçümü	42
6.3.3. NP'lerin morfolojisinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile analizi	43
6.3.4. Ekstre ve NP'lerin Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopu (FTIR) ile analizi	44
6.3.5. Ekstre ve NP'lerin diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ile analizi	45
6.3.6. Ekstre ve NP'lerin X ışını toz kırınımı (XRD) ile analizi.....	46
6.3.7. <i>İn vitro</i> ilaç salım profili	48
6.3.8. <i>İn vitro</i> salım kinetiği	49
6.4. <i>İn Vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları Sonuçları.....	51
6.4.1. Hücre canlılığı analizi sonuçları	51
6.4.2. Ekstrelerin kombine indekslerinin tespiti	52
6.4.3. SH-SY5Y hücrelerinde anti-Alzheimer etkinliğinin değerlendirilmesi.....	53
6.4.4. Gerçek zamanlı PCR sonuçlarının değerlendirilmesi	54
6.5. Akut Toksikite Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	55
6.5.1. Mortalitenin değerlendirilmesi.....	55
6.5.2. Klinik bulguların değerlendirilmesi	55
6.5.3. Histomorfolojik değerlendirme.....	56
6.6. Deney Hayvanlarının Kognitif Durumlarının Değerlendirilmesi.....	59
6.6.1. Açık alan testi sonuçlarının değerlendirilmesi	59
6.6.2. Morris'in su tankı testi sonuçlarının değerlendirilmesi	60
6.6.3. Pasif sakınma testi sonuçlarının değerlendirilmesi	62
6.6.4. Yeni obje tanıma testi sonuçlarının değerlendirilmesi.....	63
6.7. Alınan Doku Örneklerinde Yapılan Analizlerin Değerlendirilmesi.....	64

6.7.1. Beyin dokusunda A β ₁₋₄₂ düzeyinin ELISA ile değerlendirilmesi	64
6.7.2. Alınan beyin dokularının histopatolojik analizlerin değerlendirilmesi.....	65
6.7.3. İmmünohistokimyasal analizlerin değerlendirilmesi	67
6.7.4. Konfokal görüntüleme sonuçlarının değerlendirilmesi	72
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	73
8. KAYNAKLAR.....	81
9. ÖZGEÇMİŞ.....	102
10. BİLİMSEL FAALİYETLER.....	103
11. EKLER.....	105

KISALTMALAR LİSTESİ

AA	:	Alzheimer Derneği
AChE	:	Asetilkolinesteraz
AH	:	Alzheimer hastalığı
APP	:	Amiloid prokürsör protein
ATCI	:	Asetiltiyokolin iyodür
A β	:	Amiloid beta
BOS	:	Beyin omirilik sıvısı
BDNF	:	Beyin türevli nörotrofik faktör
BHA	:	Butilhidroksianisol
CI	:	Kombinasyon indeksi
CUPRAC	:	Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
DP	:	Donepezil
DPPH	:	2,2-difenil-1-pikril-hidrazil
DSC	:	Diferansiyel taramalı kalorimetre
DTNB	:	5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit
FBS	:	Fetal sığır serumu
Fa	:	Fraksiyonel etki
FDA	:	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FRAP	:	Demir indirgeme antioksidan gücü
FTIR	:	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopu
GSK-3 β	:	Glikojen sentaz kinaz-3 β
KBB	:	Kan beyin bariyeri
MTT	:	3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolyum
NIA	:	Ulusal Yaşlanma Enstitüsü
NMDA	:	N-metil-D-aspartat

PLGA	:	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PEG	:	Polietilen glikol
PI3K	:	Fosfoinositid 3-kinaz
ROT	:	Reaktif oksijen türleri
SEM	:	Taramalı elektron mikroskobu
SH-SY5Y	:	İnsan nöroblastoma hücreleri
Tg	:	Camsı geçiş sıcaklığı
T2DM	:	Tip 2 diabetes mellitus
XRD	:	X ışını toz kırınımı

TABLO LİSTESİ

Sayfa Numarası

Tablo 1.	İlaç salınım kinetiği matematiksel modelleri ve ilgili denklemler.....	29
Tablo 2.	Çalışmada kullanılan primer dizileri.....	32
Tablo 3.	Ön çalışma hayvan grupları.....	33
Tablo 4.	Ana çalışma hayvan grupları	33
Tablo 5.	SGV ve SLL ekstrelerinin DPPH radikali süpürücü aktiviteleri.....	40
Tablo 6.	SGV ve SLL ekstrelerinin FRAP değerleri.....	41
Tablo 7.	SGV ve SLL ekstrelerinin CUPRAC değerleri.....	41
Tablo 8.	SLL ve SGV yüklü NP'lerin ζ potansiyeli, partikül boyutu ve polidispersi indeksi (PDI) değerleri.....	42
Tablo 9.	SGV ve SLL yüklü NP'lerin EE ve LC'si.....	43

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa Numarası

Şekil 1.	<i>Sideritis germanicopolitana</i> Bornm. subsp. <i>viridis</i> Hausskn. ex Bornm. bitkisi (Fotoğraf: Dr. Öğr. Üyesi İ. Şenkardeşler, 2023)	22
Şekil 2.	<i>Sideritis Libanotica</i> Labill. subsp. <i>Linearis</i> (Bentham) Bornm. bitkisi (Fotoğraf: Dr. Öğr. Üyesi İ. Şenkardeşler, 2023).....	23
Şekil 3.	Çalışma sürecinde izlenen protokol.....	35
Şekil 4.	Bitkilerden elde edilen ekstrelerin antikolinesteraz aktiviteleri.....	42
Şekil 5.	NP'lerin morfolojisinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile analizi.....	44
Şekil 6.	NP'lerin moleküler yapısının Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopu (FTIR) ile analizi.....	45
Şekil 7.	SGV (A) ve SLL (B) ekstrelerinin moleküler yapısının Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopu (FTIR) ile analizi.....	45
Şekil 8.	Ekstrelerinin ve NP'lerin diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ile analizi....	46
Şekil 9.	Saf NP ve ekstrelerin X ışını toz kırınımı (XRD) ile analizi.....	47
Şekil 10.	Polimer ve ekstre yüklü NP kompozitlerinin X ışını toz kırınımı (XRD) ile analizi.....	48
Şekil 11.	Ekstre yüklü NP'lerin <i>in vitro</i> salım profili.....	49
Şekil 12.	SGV yüklü NP'lerin <i>in vitro</i> kinetik modellemeleri.....	50
Şekil 13.	SLL yüklü NP'lerin kinetik modellemeleri.....	51
Şekil 14.	Ekstre ve NP'lerin farklı konsantrasyonlarının doza bağımlı olarak hücre canlılığına etkisi.....	52
Şekil 15.	Ekstrelerin ve kombinasyonlarının doz-etki eğrisi.....	53
Şekil 16.	SH-SY5Y hücrelerinde anti-Alzheimer etkinliğinin değerlendirilmesi.....	54
Şekil 17.	SH-SY5Y hücrelerinde MAPT, Presenilin 1, Siklin D1, GSK-3 β , AKT-1 ve β -Katenin primerlerinin gen ekspresyonlarının değerlendirilmesi.....	55
Şekil 18.	Deney gruplarına ait H&E boyalı karaciğer dokularının fotomikrografları.....	56
Şekil 19.	Deney gruplarına ait H&E boyalı böbrek dokularının fotomikrografları.....	57
Şekil 20.	Deney gruplarına ait H&E boyalı dalak dokularının fotomikrografları.....	57
Şekil 22.	Deney gruplarına ait H&E boyalı akciğer dokularının fotomikrografları.....	58
Şekil 22.	Deney gruplarına ait H&E boyalı kalp dokularının fotomikrografları.....	58
Şekil 23.	Deney gruplarına ait H&E boyalı olfaktör bulbus dokularının fotomikrografları.....	59
Şekil 24.	Açık alan testi uygulanan gruplardan alınan sonuçların değerlendirilmesi.....	60

Şekil 25.	Morris'in su tankı testi grupların öğrenme performanslarının değerlendirilmesi.....	61
Şekil 26.	Morris'in su tankı testinde grupların hedef kadrana ulaşma süresi (a) ve hedef kadranda geçen toplam sürenin (b) değerlendirilmesi.....	62
Şekil 27.	Pasif sakınma testi grupların karanlık bölgeye geçiş zamanlarının değerlendirilmesi.....	63
Şekil 28.	Yeni obje tanıma testi uygulanan gruplardan alınan sonuçların değerlendirilmesi.....	64
Şekil 29.	Serebral korteks ve hipokampus dokularındaki A β ₁₋₄₂ düzeylerinin değerlendirilmesi.....	65
Şekil 30.	Deney grupları arasında H&E boyalı beyin dokularının serebral korteks bölgelerine ait fotomikrograftlar.....	66
Şekil 31.	Deney grupları arasında H&E boyalı beyin dokularının hipokampus bölgelerine ait fotomikrograftlar.....	67
Şekil 32.	Deney grupları arasında beyin dokularının korteks bölgelerine ait anti-A β immünohistokimyasal boyama.....	68
Şekil 33.	Deney grupları arasında beyin dokularının hipokampus bölgelerine ait anti-A β immünohistokimyasal boyama.....	69
Şekil 34.	Deney grupları arasında beyin dokularının korteks bölgelerine ait anti-Tau immünohistokimyasal boyama.....	70
Şekil 35.	Deney grupları arasında beyin dokularının hipokampus bölgelerine ait anti-Tau immünohistokimyasal boyama.....	71
Şekil 36.	Tedavi ajanları yüklenen NP'lere bağlanan rhodamine B floresan boyanın beyin dokusundaki konfokal mikroskop görüntüsü.....	72

1. ÖZET

Tezin başlığı: *Sideritis* Türü Bitki Ekstreleri Yüklü Nanopartiküllerin Üretimi, Karakterizasyonu ve Anti-Alzheimer Etkilerinin *In Vitro* ve *In Vivo* Olarak Belirlenmesi

Öğrencinin Adı Soyadı: Saliha AYDIN

Danışmanın Adı Soyadı: Doç. Dr. Muhammet Emin ÇAM

Programın Adı: Farmakoloji Doktora Programı

Amaç: *Sideritis* bitki ekstraları ile bu ekstraların yüklü olduğu nanopartikül (NP) formlarından oluşan ilaç taşıyıcı sistemlerinin AH tedavisindeki etkinliğini kıyaslayarak araştırmak ve literatüre yenilikçi bir tedavi stratejisi kazandırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Bitkilerden elde edilen ekstraların *in vitro* antioksidan tayinleri için DPPH, FRAP, CUPRAC; *in vitro* antikolinesteraz aktivite tayini için Ellman metodu kullanılmıştır. Üretilen NP'lerin fizikokimyasal özellikleri zeta potansiyelin ölçümü, enkapsülleme verimliliği, SEM, FTIR, DSC, XRD, *in vitro* salım profili ve *in vitro* salım kinetiği analizleri ile aydınlatılmıştır. SH-SY5Y ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında hücre canlılığı, kombinasyon indeksi ve anti-Alzheimer etkinlik analizleri yapılmıştır. Hayvan çalışmalarında akut toksisite çalışmaları ardından anti-Alzheimer etkinlikleri değerlendirmek için hayvan gruplarına davranış testlerinden olan açık alan, Morris'in su tankı, pasif sığınma ve yeni obje tanıma testleri uygulanmıştır. Beyinden alınan dokuların A β ₁₋₄₂ düzeyi ELISA ile ölçülmüş, serebral korteks ve hipokampüste histolojik ve immünohistokimyasal analizler yapılmıştır. Konfokal görüntüleme ile NP'lerin KBB'yi aşır aşamadığı incelenmiştir.

Bulgular: Ekstrelerde yapılan *in vitro* tayinler ile bu ekstraların anti-Alzheimer potansiyeli olduğu anlaşılmış, ekstralarda ve oluşturulan NP formülasyonlarında yapılan karakterizasyon testleriyle de yüklemenin başarılı bir şekilde yapıldığı kanıtlanmıştır. Hücre çalışmalarında ve hayvan gruplarında yapılan akut toksisite deneyi ile toksik bir etkiye sahip olmadıkları belirlenmesiyle beraber kombine kullanımın sinerjik bir etki sağlamadığı görülmüştür. Etki mekanizması farklı olsa da hücre kültürü ve hayvan gruplarında yapılan davranış testleri ile tedavi gruplarının güçlü anti-Alzheimer etki gösterdikleri kanıtlanmıştır. Yapılan ELISA, histoloji ve immünohistokimyasal analizleri ile bu bulgular desteklenmiştir. Konfokal görüntüleme ile NP formlarının başarılı bir şekilde beyne ulaştığı tespit edilmiştir.

Sonuç: *Sideritis* ekstralarının ve NP formlarının anti-Alzheimer etkinliği kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer, Nanopartikül, Hücre kültürü, İntraserebroventriküler (i.c.v), *Sideritis*

2. SUMMARY

Title of Thesis: Production and Characterization of *Sideritis* Species Extracts-Loaded Nanoparticles and Determination of Their *In Vitro* and *In Vivo* Anti-Alzheimer Effects

Student Name, Surname: Saliha AYDIN

Supervisor Name, Surname: Assoc. Prof. Muhammet Emin ÇAM

Program Name: Pharmacology PhD Program

Objective: The aim of this study is to investigate and compare the efficacy of *Sideritis* species plant extracts and drug delivery systems consisting the nanoparticle (NP) forms loaded with these extracts in the treatment of Alzheimer's disease (AD). The goal is to contribute an innovative therapeutic strategy to the literature.

Materials and Methods: DPPH, FRAP, and CUPRAC assays were used for the *in vitro* determination of the antioxidant properties of plant-derived extracts, while the Ellman method was used for *in vitro* anticholinesterase activity assessment. The physicochemical characteristics of the produced NPs were elucidated through measurements of zeta potential, encapsulation efficiency, SEM, FTIR, DSC, XRD, *in vitro* release assay, and *in vitro* release kinetics. In cell culture studies with SH-SY5Y cells, analyses of cell viability, combination index, and anti-Alzheimer efficacy were carried out. In animal studies, after acute toxicity evaluations, behavior tests such as open field, Morris water maze, passive avoidance, and novel object recognition tests were conducted in animal groups to evaluate their anti-Alzheimer effects. A β ₁₋₄₂ levels in brain tissues were measured using ELISA, histological and immunohistochemical analyses were performed in the cerebral cortex and hippocampus. Confocal imaging was used to investigate whether NPs could cross the blood-brain barrier.

Results : The *in vitro* assays performed on the extracts indicated their anti-Alzheimer potential, and the characterization tests on both the extracts and the formulated NP structures provided clear evidence of successful loading. Although it was determined that they did not have a toxic effect in cell studies and acute toxicity experiments in animal groups, it was observed that combined use did not provide a synergistic effect. Despite the mechanism of action is different, cell culture and behavioral tests in animal groups have proven that the treatment groups have a strong anti-Alzheimer effect. These findings were supported by ELISA, histology and immunohistochemical analyses. It was determined by confocal imaging that NP forms successfully reached the brain.

Conclusion : The anti-Alzheimer efficacy of *Sideritis* extracts and NP forms has been proved.

Keywords : Alzheimer, Nanoparticle, Cell Culture, Intracerebroventricular (i.c.v), *Sideritis*

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Demans, hastanın günlük yaşamında hafıza, düşünme ve sosyal becerileri etkileyen bir grup semptomu tanımlar. Alzheimer hastalığı (AH), demansın bir türüdür ve genellikle ileri yaşlarda görülen, hastaların bağımsızlığını kaybettiren ilerleyici ve nörodejeneratif bir hastalıktır. AH'nin kesin nedeni bilinmemekle birlikte, genetik faktörler, yaşlanma ve çevresel faktörlerin hastalık riskini artırdığı düşünülmektedir (El-Sewify ve ark., 2022; Hodson, 2018). Dünya genelinde yaklaşık 50 milyon insanı etkilemektedir ve 2050 yılına kadar 100 milyondan fazla insanın AH ile yaşaması beklenmektedir. AH, hükümetlere, ailelere ve bireylere ciddi bir mali yük getirir. AH, beyinde amiloid beta (A β) plak birikimi, hiperfosforile tau proteinlerinden oluşan nörofibriler yumak (NFY) ve yanlış katlanmış protein birikimleri ile karakterizedir. Bu hastalık, çoğunlukla hipokampus ve serebral korteks boyunca sinaps kaybına ve nöron atrofisine yol açar (Huang, 2020; Jason Weller ve Andrew Budson, 2018).

AH, dünya genelinde birçok insanı etkileyen bir sağlık sorunudur ve şu ana kadar bu hastalığın kesin bir tedavisi bulunmamaktadır. Mevcut tedaviler sadece semptomların hafifletilmesine yöneliktir. Günümüzde, semptomatik AH'nin yönetimi için Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış dört ilaç bulunmaktadır. Bu ilaçlar arasında donepezil, rivastigmin ve galantamin gibi asetilkolinesteraz inhibitörleri (AChEI) ile memantin gibi N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonisti yer almaktadır. AChEI ilaçlarının etki mekanizması incelendiğinde, AH'de Meynert'in nükleus bazalisindeki kolinerjik nöronların ve korteks boyunca geniş bir alana yayılan diğer septal çekirdeklerin kaybolduğu ve genel bir kolinerjik eksikliğin ortaya çıktığı görülür. Bu kolinerjik eksiklik, AH'nin erken evrelerinde dikkat eksikliği ve hafıza sorunlarına yol açabileceği düşünülmektedir. AChEI ilaçları, sinaptik asetilkolin seviyelerini artırarak bu eksikliği gidermeye çalışır. Ancak bu tedavi, semptomları hafifletmekle sınırlıdır ve hastalığın ilerlemesini durdurma yeteneği yoktur. Memantin, etki mekanizması hala tam olarak anlaşılmamış olsa da AH'nin ilerleyişi sırasında nöronların ölümüyle ilişkilendirilen glutamat aracılı nörotoksisiteyi engelleme potansiyeline sahip bir NMDA reseptör modülatörüdür. Orta şiddetli AH'de etkili olabilir, ancak uzun vadede hastalığın ilerlemesini engelleme yeteneği sınırlıdır. İlaç endüstrisindeki sayısız araştırmaya rağmen, AH'nin farklı evrelerinde 20'den fazla bileşik üzerinde yapılan denemeler sonuçsuz kalmıştır ve bu ilaçların bilişsel gerilemeyi yavaşlatma veya genel işlevi iyileştirmede etkili olmadığını göstermiştir. Bu başarısızlıklar, AH'de etkili bir tedavisinin geliştirilmesi için farklı yaklaşımların gerekliliğini vurgulamaktadır (Long ve Holtzman, 2019; Reisberg ve ark., 2003).

Elde edilen mevcut veriler, AH ve diğer nörodejeneratif bozuklukların temel nedenlerinden birinin oksidatif stres olduğunu göstermektedir. Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretiminin antioksidan savunma mekanizmalarının yeteneklerini aştığı bir durumu ifade eder. Çevresel etkenler organizmaların ROT üretimini artırabilir ve bu durum AH için yüksek bir risk faktörü haline gelebilir. Ayrıca yaşlanma süreci, oksidatif stresin artmasına ve antioksidan savunma mekanizmalarının zayıflamasına neden olur. Beyin, yüksek enerji seviyelerine ve oksijen tüketimine sahip olmasına rağmen, antioksidan savunma mekanizmaları bakımından zayıf bir organdır. Bu nedenle beyin, özellikle oksidatif stresle karşı savunmasız hale gelir. ROT üretimindeki artış, nöronal hasara ve/veya ölüme yol açar. Artan nöron kayıpları, ROT miktarındaki artışı beraberinde getirir, bu da daha fazla nöronal ölüme neden olur (Joy ve ark., 2018; Moulton ve Yang, 2012). AH tedavisi için onaylanmış olan ilaçların yetersizliği göz önünde bulundurulduğunda, alternatif tedavi yöntemlerinin incelenmesi son derece önemlidir. Bilimsel çalışmalar, oksidatif stresin sağlıklı yaşlanmayı engellediğini ve AH gibi nörodejeneratif hastalıklara yol açtığını göstermiştir (Voulgaropoulou ve ark., 2019). Birçok bitkisel ilaç, antioksidan özelliklere sahiptir ve Çin gibi bölgelerde uzun süredir demans tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak son on yılda bitkisel ilaçların demans tedavisinde tek başına kullanımının onaylanması oldukça nadir görülmüştür. Mevcut verilere göre, AH için potansiyel ilaç olarak kabul edilen bazı bitkiler ve bitkisel formülasyonlar ile bu tedavilere yönelik yapılan çalışmalar, bilişsel iyileşme açısından umut verici sonuçlar sunmaktadır (Tian ve ark., 2010). Son yıllarda, AH gibi hastalıkların tedavisinde bitkilerin kullanılması, kanser ve diyabet gibi diğer sağlık sorunlarının tedavisinde de mantıklı bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Bu hastalıkların kesin tedavisinin doğada bulunan bitkilerin karmaşık içeriklerinde gizli olma olasılığını göz ardı etmemek önemlidir (Atas ve ark., 2019).

Lamiaceae familyasına ait olan *Sideritis* cinsi, genellikle subtropik ve ılıman bölgelerde yaygın olarak bulunan, 20-75 cm yüksekliğinde bir çalıdır. *Sideritis* cinsinin dünya genelinde 150'den fazla türü mevcuttur, çoğunluğu Akdeniz bölgesinde yer alır. Türkiye florasında ise 46 tür ve 55 taksonla temsil edilir. Bu taksonlardan 42'si yalnızca bu bölgeye özgüdür (Güner ve ark., 2000). Türkiye, *Sideritis* cinsinin ana gen merkezlerinden birine ev sahipliği yaptığı için endemizm oranı (%79.5) oldukça yüksektir (Baser, 2002). Yüzyıllardır, Türk halkı tarafından bazı yaygın hastalıkların tedavisinde tıbbi bitki olarak kullanılmaktadır (Everest ve Ozturk, 2005). *Sideritis* türleri, Türkiye'de genellikle "dağ çayı" ve "adaçayı" olarak adlandırılır ve halk tıbbında bitki çayı olarak yaygın bir şekilde kullanılır. Halk tıbbında sinir sistemi üzerinde

sakinleştirici, iltihap önleyici, spazm giderici, hazmı kolaylaştırıcı, ağrı kesici, sakinleştirici, öksürük kesici, mide ağrılarını hafifletici, nöbet önleyici, soğuk algınlığına bağlı öksürüklerde ve sindirim rahatsızlıklarında kullanılır (Aneva ve ark., 2019). Ayrıca, son çalışmalar bu bitkilerin Tip 2 Diyabet Mellitus (T2DM), Parkinson hastalığı ve AH gibi hastalıkların tedavisinde de etkili olduğunu göstermektedir. *Sideritis* türleri üzerinde yapılan çalışmalarda, bu etkinin yüksek antioksidan aktiviteye ve nörokoruyucu potansiyele sahip olmalarından kaynaklandığı anlaşılmıştır. *Sideritis* türlerinin içeriği değerlendirildiğinde, fenolik bileşikler, flavonoidler, tanenler ve monoterpenoidler gibi temel fitokimyasal içeriklere sahip oldukları görülmüştür (Turkmenoglu ve ark., 2015; Ververis ve ark., 2023; Zengin ve ark., 2016). Deneysel kanıtlar, luteolin, rosmarinik asit ve apigenin gibi bazı flavonoidlerin, AH'ye karşı potansiyel koruma sağlayabileceğini desteklemektedir (Dourado ve ark., 2020; Hase ve ark., 2019; Kwon, 2017)

Mikrotübül sistemi, nöronlardaki sinaptik terminaller arasında malzemelerin taşınmasında kritik bir rol oynar. Tau proteini, mikrotübül ağını stabilize etmede önemli bir rol oynar, ancak yanlış katlanmış tau proteinlerinin toksik etkilere neden olabileceği ve nörodejeneratif hastalıklara yol açabileceği bilinmektedir. PI3K/AKT/GSK-3 β sinyal yolunun, AH patofizyolojisinin ana faktörlerinden biri olan tau proteininin hiperfosforilasyonunu düzenlemede rol oynadığı bilinmektedir. Glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β), uzun süreli belleğin ve sinaptik plastisitenin düzenlenmesinde rol oynar ve ayrıca anormal tau proteininin hiperfosforilasyonunda yer aldığı kanıtlanmıştır. Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K), Akt'i etkinleştirerek GSK-3 β 'nin inaktivasyonunu sağlar ve bu da aktif GSK-3 β tarafından neden olan tau hiperfosforilasyonunu engeller (Kitagishi ve ark., 2014). AH patogenezinde önemli bir rol oynadığı düşünülen bir diğer yolak ise Wnt/ β -katenin yolağıdır. Wnt/ β -katenin yolağı, embriyonik gelişim, yetişkin homeostazı ve yetişkin hipokampal nörogenezinde önemli bir rol oynar. Bu yolaktaki düzensizliklerin AH'de etkili olabileceği belirtilmektedir. Wnt proteinleri, Frizzled reseptörlerine ve lipoprotein reseptör ile ilişkili proteinler 5 ve 6 (LRP-5/6) koreseptörlerine bağlanarak yolağı aktive eder. Bu, sitoplazmada β -kateninin stabilizasyonunu ve ardından çekirdeğe taşınmasını tetikler. Çekirdekte T hücre faktörü/lenfoid arttırıcı faktör (TCF/LEF) ile bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonunu uyarır. Bu yolak ayrıca hücre ölümünü ve hayatta kalmasını, sinaptik plastisiteyi ve kan beyin bariyerinin (KBB) bütünlüğünü düzenler, A β üretimini ve agregasyonunu inhibe ederken tau fosforilasyonunu ve nöroinflamasyonu baskılar.(Gao ve ark., 2014; Inestrosa ve Toledo, 2008; Jia ve ark., 2019).

Bazı ilaçlar, ağız yoluyla tablet, kapsül veya granül şeklinde verilirken, diğerleri ise intravenöz, subkutan veya intramüsküler gibi parenteral yolla verilir. Bu ilaç formları ve uygulama yolları, çeşitli dezavantajlar taşıyabilir, örneğin ilk geçiş etkisi veya ağrı gibi sorunlara yol açabilir. Günümüzde, bu dezavantajlardan kaçınan nanoteknolojik ilaç taşıyıcı sistemlerin, ilaç üretimi ve taşınmasında önemli bir rol oynadığı gözlemlenmektedir (Tyagi ve Subramony, 2018). Nanotaşıyıcılar, son 50 yılda yaygın olarak geliştirilen nano boyutlu kolloidal ilaç dağıtım sistemleri olarak özellikle öne çıkmıştır. Bu alanda farmakoloji ve farmasötikleri birleştiren nanoteknoloji, tanısal, teranostik ve tedavi edici özelliklere sahip nanotaşıyıcıları içermektedir. Nanotaşıyıcılar, yüksek ilaç yüklemesi sağlayarak ilacın stabilitesini ve çözünürlüğünü artırabilir, biyolojik engelleri aşabilir, biyoyararlanımı ve hedefe yönlendirilebilirliği artırabilir veya ilaçların olumsuz etkilerini azaltabilir. Ayrıca, esnek fizikokimyasal özellikler, hedefe özgü etki, biyolojik olarak çözünürlük, biyoyumluluk, düşük toksisite, kontrollü ve sürekli ilaç salımı gibi benzersiz yeteneklere sahiptirler. Bu nedenle, AH gibi nörolojik hastalıkların tedavisinde beyne ilaç taşıma açısından büyük potansiyel taşırlar (Agrawal ve ark., 2021; Séguéy ve ark., 2022). Günümüzde, katı-lipid, lipid ve inorganik nanopartiküller (NP) daha yaygın olarak kullanılan nano taşıyıcılardır. Bunun yanı sıra, organik NP içeren dendrimerler, nanoemülsiyonlar, nanosüspansiyonlar ve nanojeller de kullanılmaktadır. Son yıllarda, eksozomlar, nanomikeller, karbon noktaları, karbon-nano iyonları, modifiye ekstravasküler araçlar, montmorillonitler, laponitler veya halloysit nanotüpleri, laminarin, yeşil nanomalzemeler, grafen nanolevhalar gibi yeni nanotaşıyıcılar da keşfedilmiştir (Taliyan ve ark., 2022).

KBB, çoğu ilacın geçemediği ve özellikle santral sinir sistemi hastalıklarının tedavisini zorlaştıran bir engeldir. Ancak son yıllarda nanoteknoloji temelli yöntemler, KBB'nin geçilmesine yardımcı olma potansiyeline sahiptir (Brambilla ve ark., 2011). Eşsiz fizikokimyasal özelliklere ve KBB'yi geçme kabiliyetine sahip tasarlanmış NP'ler beyin hastalıklarının tedavisinde umut vadeden bir strateji sunar. Bu NP'ler, ilaçları beyne taşıyarak etkinliği artırıp toksisiteyi azaltabilir. Ayrıca, ilaçların kontrollü salınımını sağlama yetenekleri ile dikkat çekerler (Khan ve ark., 2021). Biyoçözünür polimerik NP'ler, yüksek ilaç taşıma kapasiteleri ve seçici toksisite potansiyeli sunan önemli bir NP türüdür. Hem aktif hem de pasif hedeflemeyi desteklerler, ilaçları korur ve kontrollü ilaç salınımı yapabilirler. Ayrıca hem hidrofilik hem de hidrofobik bileşenleri taşıyabilirler ve yüksek stabilite, kolay üretim, yüksek kapsülleme verimliliği, sterilizasyon olasılığı ve kolay modifiye edilebilirlik gibi birçok avantaj

sunarlar. Bu polimerik NP'ler, kitosan, poli (laktik asit) (PLA), poli (vinil pirolidon) (PVP), poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), polietilen glikol (PEG) gibi çeşitli hidrofilik veya hidrofobik polimerler kullanılarak üretilebilirler (Manek ve ark., 2020; Reddy ve ark., 2021).

Mevcut sorunları göz önüne alarak hazırlanan bu tez çalışmasında, *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm. (SGV) ve *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm. (SLL) bitkileri kurutulup maserasyon yöntemi ile ekstreler elde edildi. KBB'ye hedeflendirilmiş PLGA/PEG NP'lerinin içerisine ekstreler yüklendi. Boş ve ekstre yüklü NP'lerin fizikokimyasal özellikleri incelenmesinin ardından *in vitro* ve *in vivo* ortamda deney gruplarının AH üzerine etkileri karşılaştırılarak değerlendirildi. Bunlara ek olarak bu bitki ekstrelerinin olası anti-Alzheimer etkinliğinin PI3K/Akt/GSK3 β ve Wnt/ β -katenin yolları üzerindeki etkisi aydınlatıldı. Çalışma boyunca klinik ve ticari olarak uygulanabilir bir ilaç formu oluşturularak hastalıktan muzdarip olan kişilere etkinliği yüksek ve yan etki profili düşük ilaç tedavisi uygulanarak ülke ekonomisine katkı yapılması amaçlandı.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Alzheimer Hastalığı (AH)

4.1.1. AH'nin tanımı ve temel bilgiler

Demans, organik beyin hastalığının bir sonucu olarak bilişsel işlevlerde ciddi bozulma ve nöron kaybı ile karakterize, progresif bir hastalık olarak tanımlanabilir. 70'ten fazla farklı nedenle ilişkili olmasına rağmen dünya çapında en yaygın nedeni Alzheimer hastalığı (AH) adı verilen birincil beyin hasarıdır. Demans kavramı binlerce yıldır var olmasına rağmen temel klinik sendrom ve ilişkili nörodejeneratif değişiklikler ilk kez ancak 20. yüzyılın başlarında keşfedilmiştir. 1907'de Aloysius "Alöis" Alzheimer, akıl hastanesinde bakım altında olan 51 yaşındaki Auguste Deter'in hafıza kaybı ve diğer bilişsel bozuklukları içeren semptomlarını titizlikle tanımlamıştır. Auguste Deter'in ölümünden sonra Alzheimer, gümüş boyamayla beynini histolojik olarak analiz etmiş ve nörofibriler yumakların (NFY), nöritik plakların ve amiloid anjiyopatinin gelişimini gözlemlemiştir. Sonrasında bu gözlemler AH olarak bilinen hastalığın ayırt edici özelliği haline gelmiştir (Agrawal ve Jha, 2020; Bondi ve ark., 2017).

Temel olarak AH, erken başlangıçlı (ailesel) AH ve geç başlangıçlı (sporadik) AH olmak üzere 2 alt kategoriye ayrılmaktadır. Erken başlangıçlı AH genellikle 65 yaş altındaki bireyleri etkiler ve daha nadirdir. Genetik faktörler bu türün gelişiminde daha büyük bir rol oynayabilir ve aile geçmişi üzerinde daha fazla etkiye sahip olabilir. Bundan dolayı genellikle ailesel AH olarak adlandırılır ve genetik mutasyonlar bulunabilir. Buna karşılık geç başlangıçlı sporadik AD genellikle 65 yaşın üstündeki bireyleri etkiler ve daha yaygın olan türdür. Genetik yatkınlık önemli bir rol oynasa da aile geçmişi erken başlangıçlı tür kadar belirgin değildir (Sehar ve ark., 2022).

AH'nin, etkilenen kişi tarafından fark edilmeyen beyin değişikliklerinden, hafıza sorunlarına ve sonunda fiziksel sakatlığa neden olabilecek beyin değişikliklerine doğru ilerlemesine AH süreci denir. Süreç, semptomların gözükmediği prelinik AH'den hafif bilişsel ve/veya davranışsal bozukluğa ve ardından şiddetli semptomların gözüküğü Alzheimer demansına kadar uzanır. AH'yi bu süreçte kategorize etmek için bir dizi evreleme sistemi geliştirilmiştir. Bu süreç üzerinde üç genel evre vardır. Bunlar, prelinik AH, AH'ye bağlı hafif kongitif bozukluk ve AH'ye bağlı demanstır. Prelinik AH belirgin belirtiler göstermeyen ancak beyinde AH'ye bağlı değişikliklerin başladığı dönemi ifade eder. Bu dönemde, birey hafif

bellek sorunları veya diğer bilişsel değişiklikler fark etmeyebilir. Bu evre, AH belirtileri ortaya çıkmadan önceki dönemdir ve genellikle araştırmalarda veya risk değerlendirmelerinde dikkate alınır. Süresi kişiden kişiye değişebilir ancak başlangıç yaşına bağlı olarak genellikle 6-10 yıl sürer. AH'ye bağlı hafif bilişsel bozuklukta birey hafif bilişsel zorluklar yaşar, ancak günlük yaşam aktivitelerini bağımsız olarak sürdürebilir. Bu dönemde, hafıza kaybı ve düşünme becerilerinde zayıflama gibi belirtiler artar, ancak bunlar günlük yaşamı ciddi şekilde etkilemez. AH'ye bağlı demans evresinde belirtiler daha belirgin ve ileri seviyededir. Bu evre kendi içinde AH'ye bağlı hafif, orta ve şiddetli demans olarak sınıflandırılır. AH'ye bağlı hafif demansı olan birey günlük yaşam aktivitelerini yürütme konusunda giderek daha fazla zorluk yaşar. Bellek kaybı daha belirgin hale gelir, kişilik ve davranış değişiklikleri gözlenir. Orta derecede ise birey temel günlük aktiviteleri gerçekleştirmede daha fazla yardıma ihtiyaç duyar. Bellek daha da bozulur, dil becerileri zayıflar, kişilik değişiklikleri artar ve zaman ve mekân algısı bozulabilir. AH'ye bağlı şiddetli demans evresi son evredir. Bu evrede bireye genellikle bakım ve destek gerekir. Hafıza neredeyse tamamen kaybolabilir, iletişim zorlaşır, hareket yeteneği kısıtlanabilir ve kişi çevresine ve tanıdık kişilere yabancılaşabilir (Landeiro ve ark., 2020; Porsteinsson ve ark., 2021; X. Wang ve ark., 2020) .

4.1.2. AH'nin insidansı ve prevalansı

Hastalıkların insidansının ve prevalansının araştırılması, hastalığa yol açan faktörlerin yaş ve cinsiyet gruplarına göre dağılımını anlamak ve bu bozuklukların olası nedenlerini tespit etmek açısından önemlidir. Nüfusun yaşlanması dünya çapında evrensel bir olgu haline gelmiştir. AH'nin ortaya çıkışı artan yaşla güçlü bir şekilde ilişkili olduğundan, demansa yol açan bu bozukluğun dünya genelindeki tüm ülkelerde halk sağlığı ve yaşlı bakımı sistemlerine büyük zorluklar oluşturacağı öngörülmektedir (Lopez ve Kuller, 2019; Qiu ve ark., 2009). 65-75 yaş arası kişilerin %3'ü, 75-84 yaş arası kişilerin %17'si ve 84 yaş üstü kişilerin %32'si hastalıktan etkilenmektedir. 90 yaş sonrasında hipokampal skleroz giderek daha yaygın hale geldikçe AH insidansı azalıyor gibi görünmektedir. AH'den etkilenen kişilerin yaklaşık üçte ikisi kadın ve üçte biri erkektir. Bu durum hem genetik faktörler hem de kadınların daha uzun yaşam beklentisi nedeniyle. 60-64 yaş grubundaki kişilerin yaklaşık %6,7'sinde, 65-69 yaş grubunda %8,4'ünde, 70-74 yaş grubunda %10,1'inde, 75-79 yaş grubunda %14,8'inde ve 80-84 yaş grubunda %25,2'sinde hafif bilişsel bozukluk vardır. Genel olarak 64 yaş üstü kişilerin %15-20'sinde hafif bilişsel bozukluk vardır ve bunların yaklaşık %15'inde 2 yıl içinde demans gelişir (Soria Lopez ve ark., 2019). Hafif bilişsel bozukluk yaşayan bireylerin, AH veya ilgili

bir demans türü geliştirme olasılığı daha yüksektir. Hafif bilişsel bozukluktan normale dönüş, genel olarak epidemiyolojik çalışmalarda oldukça yaygın olmasına rağmen ilerleyen zamanda yine de bilişsel gerileme riski altındadır (Koepsell ve Monsell, 2012). 2050 yılına kadar, her 33 saniyede bir yeni bir AH vakasının gelişmesi, yılda neredeyse 1 milyon yeni vaka olaması ve toplam tahmini 13.8 milyon prevelans göstermesi bekleniyor ('Alzheimer Hastalığı: Gerçekler ve Rakamlar' <https://www.brightfocus.org/alzheimers/article/alzheimers-disease-facts-figures> Erişim Tarihi: 10.08.2023)

4.1.3. AH'nin nöropatofizyolojisi

AH'nin patofizyolojisiyle ilgili tartışmalar, Alzheimer'ın 1907 yılında hastalığın nöropatolojik özellikleri olan amiloid plakları ve NFY'lerin gözlemlendiği zamana kadar uzanır. Bu çok faktörlü bozukluğun çeşitli neden faktörlerine dayalı olarak açıklanması amacıyla çeşitli hipotezler ortaya atılmıştır. Bu hipotezler arasında, amiloid beta ($A\beta$) kaskadı hipotezi, tau hipotezi, kolinerjik hipotez ve inflamasyon hipotezi bulunmaktadır (Kumar ve ark., 2015). Son zamanlarda, en sık $A\beta$ hipotezinin üzerinde durulsa da bu yetersizliğe neden olan hastalığın karmaşık patofizyolojisi hâlâ tam olarak açıklanamamıştır (Pinheiro ve Faustino, 2019).

4.1.3.1. $A\beta$ kaskadı hipotezi

Amiloid kaskadı hipotezi, AH araştırmalarının çoğunun odak noktası olmuştur ve bu hipotez ilk olarak 1991 yılında Selkoe ve ekip arkadaşları tarafından kurulmuştur (Selkoe, 1991). Bu görüş, AH'nin $A\beta$ stabilitesinde ve birikimindeki değişiklikler veya amiloid öncü proteininin (APP) ekspresyonunda değişiklikler sonucu $A\beta$ üretimi ile kleransı arasındaki kronik dengesizliğin sonucu olarak ortaya çıktığını öne sürer. Biriken $A\beta$ agregatlarının birikimi, enflamatuvar değişiklikleri, NFY oluşumunu ve nörotransmitter kaybını içeren bir kaskadı başlatır (Golde ve ark., 2006; Stakos ve ark., 2020). $A\beta$ üretiminin veya birikiminin artmasında rol oynayan çeşitli genlerin de AH etiolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir. Bu genler arasında $A\beta$ 'nin öncüsü olan APP, γ -sekretazın alt bileşenleri olan ve presenilin proteinlerini kodlayan PSEN1/PSEN2 ve ApoE- ϵ 4 bulunmaktadır (Menting ve Claassen, 2014).

$A\beta$ peptidleri, geniş çapta dağıtılmış bir transmembran proteini olan APP üzerinde β -sekretaz ve γ -sekretazın sıralı enzimatik etkisi ile proteolitik olarak türetilmiş 39-43 amino asit kalıntılı peptidlerdir (Coulson ve ark., 2000). $A\beta$ peptidinin uzunluğu, APP'nin bölünme modeline göre C-terminalinde değişir. $A\beta_{1-40}$ izoformu en yaygın olanıdır, bunu doğası gereği hidrofobik olan

ve A β ₁₋₄₀'tan daha hızlı bir şekilde toplanan A β ₁₋₄₂ takip etmektedir. Plakların içinde, β konformasyonundaki A β peptidleri bir araya gelir ve fibriller, protofibriller ve polimorfik oligomerler dahil olmak üzere yapısal olarak farklı formlara polimerize olur (Perl, 2010; Tzioras ve ark., 2023). A β birikimi ve yaygın plak oluşumu, lokal mikroglial aktivasyona, sitokin salınımına ve çok proteinli bir inflamatuvar yanıtı yol açar. Bunlarla birlikte AH'de sinaps kaybı, nöron kaybı ve serebral atrofinin artışı ile karakterize çok yönlü biyokimyasal ve yapısal değişiklikler meydana gelir (Barage ve Sonawane, 2015; Ferrer, 2017).

APP, birden fazla hücre tipi tarafından üretilen tip 1 transmembran proteinidir. Merkezi sinir sisteminde APP iki farklı şekilde bölünmeye uğrayabilir. Bu yolların her ikisindeki ikinci adım, γ -sekretaz ile bölünmeyi içerir. Amiloidojenik olmayan ilk yolda, APP ilk olarak α -sekretaz tarafından bölünür ve bunun sonucunda sAPP α adı verilen hücre dışı bir ürün ve C83 adı verilen membrana bağlı bir amino asit parçası elde edilir. C83'ün γ -sekretaz tarafından bölünmesi, p3 adı verilen başka bir salgılanan parça üretir ve membrana bağlı APP hücre içi alanını (AICD) bırakır. Amiloidojenik yolda, APP ilk olarak β -sekretaz tarafından bölünerek sAPP β adı verilen salgılanan hücre dışı ürünü ve membrana bağlı 99 amino asit C-terminal fragmanı C99'u üretir. C99'un γ -sekretaz prosesi, A β 'nin ve aynı membrana bağlı AICD'nin hücre dışı salgılanmasıyla sonuçlanır (Soria Lopez ve ark., 2019).

4.1.3.2. Tau hipotezi

Nöropatolojik olarak AH, tau proteinlerinden oluşan intranöronal NFY'lerin varlığı olarak tanımlanır. Patolojik NFY'ler çoğunlukla hiperfosforile edilmiş tau proteinlerinden oluşur. Tau proteinleri esas olarak nöronlarda bulunur ve mikrotübülle ilişkili proteinler ailesine aittir. Tau'nun ana işlevi, mikrotübülleri stabilize etmektir. Mikrotübüller, dendritler ve aksonlardaki yükün taşınması için otoyol görevi gördüğünden, nöronlar için özellikle önemlidir. Tanımlanmış 6 izoformu vardır. Mikrotübüllerin bir araya gelmesinde ve nöronal mikrotübül ağının stabilizasyonunda önemli rol oynarlar. Tau proteininin en çarpıcı özelliği, proteinin C-terminalinde yer alan 18 amino asidin yüksek oranda korunmuş üç veya dört tekrarından oluşan bir mikrotübül bağlanma alanının varlığıdır. Bu mikrotübül bağlanma alanı, mikrotübül polimerizasyonu ve stabilizasyonunda rol oynar. Tau'nun N-terminali, yüksek düzeyde asidik amino asitlerden ve ardından normal olarak projeksiyon alanı olarak adlandırılan bazik prolin açısından zengin bölgeden oluşur. Projeksiyon alanı, hücre iskeleti elemanı ve plazma zarı ile etkileşime girebilir. Tau patolojisi genellikle ilk önce ayrı ve spesifik alanlarda ortaya çıkar ve

daha sonra beynin daha fazla bölgesine yayılır. Fibriller ve yanlış katlanmış tau kümeleri, hücreler arasında prion benzeri bir şekilde yayılabilir ve sonunda AH'lilerin beynine yayılabilir (Barage ve Sonawane, 2015; Liu ve ark., 2019).

4.1.3.3. Kolinerjik hipotez

Kolinerjik hipotez, AH araştırmalarını, betimsel nöropatolojiden sinaptik nörotransmisyon modern kavramına taşıyarak devrim niteliğinde bir değişiklik getirmiştir. Bu hipotez, beyin korteksindeki tükenmiş presinaptik kolinerjik belirteçlerin keşfi, Meynert'in bazal çekirdeğinin AH'de ciddi nörodejenerasyona uğrayan kortikal kolinerjik innervasyonun kaynağı olduğunun keşfi ve kolinerjik antagonistlerin hafızayı bozarken agonistlerin ise tam tersi etki gösterdiğini gösteren kanıtlardan oluşan üç önemli kilometre taşına dayanmaktadır (Hampel ve ark., 2018). Hipotez ilk kez Davies ve Maloney tarafından yapılan araştırmada AH'ye sahip beyinlerinin biyokimyasal incelenmesi sonucu, normal beyinle karşılaştırıldığında serebral kortekste kolin asetiltransferaz ve asetilkolinesteraz aktivitelerinde azalma olduğunu görülerek öne sürülmüştür (Davies ve Maloney, 1976). Aynı sene Bowen ve arkadaşları ölüm sonrası insan beyin dokularının serebral korteksindeki kolin asetiltransferaz aktivitesinde azalma olduğunu bildirmiştir (BOWEN ve ark., 1976). Kolinesteraz inhibitör tedavilerinin AH'de belirgin semptomatik iyileşmeye neden olduğu gösterildiği için hipotez ikna edici bir şekilde doğrulanmıştır. Her ne kadar diğer ilgili patofizyolojik mekanizmalar son yıllarda araştırmaların daha fazla ilgisini çekmiş olsa da, kolinerjik fonksiyonu iyileştiren tedaviler AH tedavisinde kritik olmaya devam etmektedir (Hampel ve ark., 2018).

4.1.3.4. İnflamasyon hipotezi

Nöroinflamasyon AH'nin en önemli ayırt edici özelliklerinin biridir. Ortaya çıkan genetik ve transkriptomik çalışmalarla desteklendiği gibi, mikroglia ile ilişkili yolların AH riski ve patogeneğinde merkezi olduğu kabul edilmiştir. Artan kanıtlar, mikroglia'nın AH'de merkezi rol oynadığını gösteriyor. Çok erken aşamada mikroglia, TREM2 ve kompleman sistemi sinaptik budamadan sorumlu olduğu tespit edilmiştir (Bolós ve ark., 2017; Colonna ve Wang, 2016; Hong ve ark., 2016). Aktiviteye bağlı ve uzun vadeli sinaptik plastisite süreçleri, uzun vadeli potansiyel üzerinde etki olarak ortaya çıkabilen öğrenme ve hafızanın ortak ve temel hücrel temelinin oluşturur (Bliss ve ark., 2014). Bunu takiben reaktif mikroglia ve astrositler amiloid plakları çevreler ve çok sayıda proinflamatuvar sitokin salgılar. Bu olaylar AH oluşumunda erken ve temel etken olarak kabul edilir. Ancak steroid olmayan antiinflamatuvar

ilaçlar klinikte yeterli fayda gösterememiştir. Bunun nedeni, doğuştan gelen bağışıklık ile AH patogenezi arasındaki ilişkinin karmaşık olması ve bağışıklığa bağlı olarak tepkisinin zararlı ya da faydalı olabilmesidir (Chen ve ark., 2017; E. Hirbec ve ark., 2017).

4.1.4. Oksidatif stresin AH'deki rolü

AH'den etkilenen sayısız süreçten biri de mitokondriyal işlevdir. AH'de mitokondriyal morfoloji, sayı ve taşımada değişiklik, sitokrom oksidaz aktivitesinde azalma, metabolik proteinlerde eksiklik, mitokondriyal membran potansiyelinde değişme ve oksidatif strete artış gözlenmiştir (Swerdlow ve ark., 2010) Sinir hücreleri mitokondrilere oldukça bağımlıdır ve mitokondriler, yüksek metabolik taleplerini karşılamaya yardımcı olmak için sinapslarda birikir. Sinapslarda meydana gelen yüksek ROT üretimi, yetersiz antioksidanlarla birleşerek oksidatif stresin oluşmasına neden olabilir. Ayrıca, beyin yüksek düzeyde kolesterol içerir ve kolesterol de oksidatif hasara çok duyarlıdır. Bu nedenle, beyinin yüksek enerji talepleri ve yüksek lipid konsantrasyonu, doğal olarak oksidatif hasara karşı risk altına sokar (Cenini ve Voos, 2019; Vetrivel ve Thinakaran, 2010). Aslında AH, hücrel oksidatif stresle yüksek derecede ilişkilendirilir, bu da protein oksidasyonunun artması, protein nitratasyonu, glikoz oksidasyonu ve lipid peroksidasyonunun artması gibi değişimleri içerir. Bu aynı zamanda A β birikiminin de bir sonucu olabilir, çünkü A β aynı zamanda oksidatif stresi de tetikleyebilmektedir (Cheignon ve ark., 2018). Bu sebeplerden dolayı, teorik olarak antioksidan bileşiklerle tedavi, oksidatif stres ve A β toksisitesine karşı koruma sağlayacaktır. Bununla birlikte, oksidatif stres AH'ye yol açan faktörlerden sadece biridir. Elde edilen veriler göz önünde bulundurularak antioksidan stratejisi, AH'nin ilerlemesini durdurma potansiyeli konusunda sorgulanmış ve bir kombinasyon tedavisi parçası olarak tedavide yerini almıştır (Ionescu-Tucker ve Cotman, 2021; Johri, 2021)

4.1.5. AH'nin teşhisi

Şu anda AH tanısı öncelikle izleyici moleküllerin pozitron emisyon tomografisine (PET) ve beyin omurilik sıvısı (BOS) proteininin analizine bağlıdır (Bateman ve ark., 2020). Son zamanlarda, özel bir PET taraması ile teşhis doğruluğu artmıştır ve AH ile daha hafif koşullara sahip hastalarda yüksek oranda hassasiyet göstermektedir. Florbetapir, florbetaben ve flutemetamol teşhis için PET ligandları olarak kullanılmaktadır, ancak yüksek maliyeti nedeniyle yaygın olarak kullanılmamaktadır. Fosforile tau, A β ₁₋₄₂ ve toplam tau protein içeriğinin incelenmesi daha düşük maliyetli bir yöntemdir. Bu yöntemin AH teşhisinde %85-

90 doğruluğa sahip olduğu ancak sonuçların alınması için invaziv bir yöntem ve sıvı analizi ile ilgili laboratuvar olanaklarının eksikliği nedeniyle uzun süre gerektiği belirtilmektedir. Ancak hem PET görüntüleme hem de BOS analizi benzer doğruluk göstermektedir ve teşhis için en uygun testin hasta/hasta yakınına tercihinin, maliyete ve tesislerin olanaklarına bağlıdır (J. Weller ve A. Budson, 2018).

Fakat yapılan PET ve BOS analizleri, patolojik değişikliklerin semptomların ortaya çıkmasından yirmi yıl önce başladığını ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle, patolojik değişiklikler ve kognitif bozulma daha ileri aşamalara doğru hızlanmış olacağından, belirtilerin başlangıcında AH tanısı koymak pek yararlı olmamaktadır. Sonuç olarak AH'nin erken tespiti için biyobelirteçlerin kullanılması büyük önem arz etmektedir.

2018 yılında, Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Yaşlanma Enstitüsü (NIA) ve Alzheimer Derneği (AA), AH'nin tanımı ve teşhisi için amiloid β , tau, nörodejenerasyon araştırma çerçevesini önerdi. Bu çerçeve, klinik-biyolojik bir teşhisinden hem semptomsuz hem de semptomatik aşamalarda uygulanabilen sadece biyolojik bir AH teşhisine geçişi mümkün kılmıştır. Biyobelirteçlere artan erişim ve gelecekte kan biyobelirteçlerinin temel hastalık süreçleri hakkında bilgi sağlama potansiyeli, AH'nin teşhisinde biyobelirteçlerin sınırlamalarının göz önüne alınmasını önermektedir (Dubois ve ark., 2021).

4.1.6. AH'nin risk faktörleri

4.1.6.1. Genetik faktörler

AH, belirtilerin başlangıç yaşına göre iki ana tipe ayrılabilir. Erken başlangıçlı AH, 65 yaşın altındaki bireyleri etkilerken, geç başlangıçlı AH 65 yaş veya daha yaşlı bireyleri etkiler (Elahi ve ark., 2020). Genetik faktörler AH riskinin büyük bir kısmını oluşturur ve yaklaşık %70'iyle ilişkilendirilir. Erken başlangıçlı AH, genellikle APP, PSEN1 ve PSEN2 genlerindeki mutasyonlarla ilişkilendirilirken, geç başlangıçlı AH özellikle APOE genindeki bir polimorfizmle (özellikle $\epsilon 4$ alelinin varlığı) bağlantılıdır (Giri ve ark., 2016; Xiao ve ark., 2021). APP geninde 30'dan fazla baskın mutasyon bulunur ve erken başlangıçlı otozomal dominant AH vakalarının yaklaşık %15'ine neden olur. PSEN1 mutasyonları, erken başlangıçlı AH vakalarının %80'ine bağlanırken, %5'i PSEN2 mutasyonlarıyla ilişkilendirilir. Bu mutasyonlar genellikle A β 42: A β 40 oranını artırarak amiloidojenik süreci tetikler (Bekris ve ark., 2010; Calero ve ark., 2015). Apolipoprotein E (ApoE), APOE geni tarafından kodlanan,

lipid metabolizmasında rol oynayan bir proteindir. Tanımlanan üç APOE aleli vardır ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$). AH riskini $\epsilon 4$ alelinin varlığı artırırken, $\epsilon 2$ aleli AH riskini azaltır (Martens ve ark., 2022).

4.1.6.2. Hipertansiyon

Hipertansiyon, vasküler duvarlarda değişikliklere neden olabilen bir durumdur ve bu değişiklikler hipoperfüzyona, iskemiye ve serebral hipoksiye yol açabilir, bu da AH gelişimini tetiklemeyebilir. Araştırmalar, serebral iskeminin, APP ve A β birikimine yol açabileceğini ve A β sentezine katılan presenilin ifadesini uyarabileceğini göstermektedir. Ayrıca, yüksek tansiyon, daha önce tartışılan mekanizmalarla ilişkilendirilen bir olay olan KBB'nin işlev bozukluğuna yol açabilir (Chen ve ark., 2017). Yapılan bazı çalışmalarda ise, düşük kan basıncının aynı zamanda demans ile ilişkili olabileceğini ve kan basıncının AH'nin klinik öncesi ve sonraki aşamalarında ileri bilişsel bozuklukla birlikte düştüğünü gösterilmiştir (Falsetti ve ark., 2022).

4.1.6.3. Tip 2 diabetes mellitus

Tip 2 diabetes mellitus (T2DM), insülin direnci, glukoz metabolizması bozukluğu ve insülin direnci ile karakterize edilen bir metabolik bozukluk kategorisine girer ve sonunda pankreasta β hücrelerinin tahribatına yol açar (Inaishi ve Saisho, 2020). Giderek artan kanıtlara göre, T2DM, demans ve AH gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilidir. Beyin atrofisi, azalmış serebral glukoz metabolizması ve santral sinir sisteminde meydana gelen insülin direnci AH ve T2DM'nin ortak özellikleridir (Verdile ve ark., 2015). Her iki hastalık da bilişsel bozulma ve inflamasyon gibi ortak özellikler sergiler. A β tarafından tetiklenen inflamasyon, A β_{1-42} peptidlerinin üretimini daha da artırır. Nöronal insülin direnci, insülini de parçalayan bir enzim olan insülin parçalama enzimi tarafından A β birikimine yol açar (de Nazareth, 2017). İnsülin parçalama enzimi, insülin için rekabetçi bir substrat olarak işlev gören A β oligomer birikimini engelleyemez ve bu insülin direnci, hem A β hem de tau oligomer üretimini kolaylaştırır (Chatterjee ve Mudher, 2018).

4.1.6.4. Obezite

Orta yaş obezitesi, Batı dünyasındaki yetişkinlerin %10'unun üzerinde etkili bir sorundur. Epidemiyolojik çalışmalar, orta yaşta yüksek vücut kütle indeksi ile ileri yaşta AH ve demans riski arasında bağımsız bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bir meta-analiz, 35 ila 65 yaşları arasındaki yaklaşık 600,000 katılımcıyı içeren 19 çalışmanın sonuçlarını inceleyerek obezitenin

ileri yaşıta demans riskini artırdığını göstermiştir. Ayrıca, hastaların otopsi sonuçları ve beyin görüntüleme çalışmaları, obezitenin AH veya hafif bilişsel bozukluk teşhisi konmuş hastalarda daha büyük kortikal atrofi ile ilişkilendirildiğini göstermektedir (Albanese ve ark., 2017).(Chuang ve ark., 2016). Bununla birlikte, ilginç bir şekilde, vücut kütle indeksinin demans teşhisi öncesinde azaldığı ve bazılarına göre bu azalmanın demansın bir öngörü işareti olabileceği gözlemlenmiştir. Ancak, 65 yaşından önce kilo kaybının demansı önlemeye yönelik uzun vadeli etkileri veya kilo kaybının etkisi hakkında yapılan müdahale çalışmaları henüz mevcut değildir (Serrano-Pozo ve Growdon, 2019).

4.1.6.5. Stres, depresyon ve uyku bozukluğu

Savunmasız bireylerde kronik ve kalıcı stres, hipertansiyon, obezite ve metabolik sendrom gibi AH ile birlikte görülen bozukluklar ve psikiyatrik bozukluklar için belirlenmiş bir risk faktörüdür (Caruso ve ark., 2019). AH'nin patogenezinde önemli bir rol oynayan stres, hayvan modeli çalışmalarıyla incelenmiştir. Stres, hipotalamus, hipofiz ve adrenal eksenini adı verilen sürecin aşırı aktivasyonu ile karakterizedir ve kortizol üretiminde artışa yol açarak beyinde A β peptidi birikimini artırabilir. Bu birikim, özellikle hipotalamus ve prefrontal korteks gibi beyin bölgelerinde gözlenir (Silva ve ark., 2019). Carroll ve arkadaşları bu hiperaktivasyonun neden olduğu uzun süreli stresin, farelerde hiperfosforile tau birikiminde ve nörodejenerasyonda da bir artışa neden olduğunu gözlemlemiştir (Carroll ve ark., 2011).

Yirmi yıl önceki ilk büyük nüfus tabanlı çalışmalar ve sonraki epidemiyolojik çalışmalar, depresyonun bilişsel gerileme ve özellikle AH'deki demans gelişme riskini artıran bir faktör olarak tanımlamıştır. Meta-analizlerden gelen artan kanıtlar, depresyonun demans riskini iki katından fazla artırdığını gösterdi, bu da bir nedensellik faktörü hipotezini işaret etmektedir. İleri araştırmalar, depresif belirtilerin şiddeti ile demans riski arasında derecelendirilmiş bir ilişki olduğunu doğrulamaktadır ve bu risk, şiddetli depresyon durumlarında daha belirgin hale gelmektedir. Ayrıca, çalışmalar depresyon episodlarının sayısı ile demans geliştirme riski arasında güçlü bir ilişki olduğunu önermektedir, her depresyon epizodu ile her türlü demans riskinde %14'lük bir artış işaret etmektedir (Dafsari ve Jessen, 2020).

Uyku, AH patogenezinde rol oynayan önemli faktörlerden biridir. Beynin kendini yenilemesinde görev alır ve hafızayı güçlendirir (Liguori ve ark., 2021). İyi kaliteli uyku, günün ve gecenin döngüsüdür, yani gündüz aktivitesi gece uykusuyla takip edilir. Birçok çalışma, uyku değişikliklerinin hücresel yapıyı değiştirdiğini ve bu nedenle beyin A β temizleme

mekanizmasını etkilediğini bulmuştur. Kaliforniya Üniversitesi'nden bir araştırmacı ekibi, 20 sağlıklı bireyin beyinde bir gece tam uyku ve bir gece uyku yoksunluğu sonrası A β yükünü ölçtüğü bir çalışma yürütmüştür. Bir gece uyku yoksunluğunun, normal bir gece tam uyku sonrası beyindeki talamus ve sağ hipokampüsteki A β yükünde önemli bir artışa neden olduğu gözlemlenmiştir (Shokri-Kojori ve ark., 2018). Benzer şekilde uyku bozuklukları da demans riskinin artmasına neden olabilir. Shi ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı bir meta-analiz, uyku bozukluğu olan bireylerin demans geliştirme riskinin arttığını gösterdi. Daha spesifik olarak, uykusuzluk sorunu yaşayan bireylerin AH geliştirme riskinin yüksek olduğunu gösterdi (Shi ve ark., 2018). Lucey ve arkadaşları gelecekte AH gelişme riskini azaltmak için ortalama 8-9 saatlik uyku önerisinde bulunmuşlardır (Lucey ve Bateman, 2014).

4.1.6.6. Sigara ve alkol kullanımı

Tütün kullanımı ve obezite, dünyada ölüm riski taşıyan önde gelen faktörler arasında yer almaktadır. Sigara içmek, AH riskini çeşitli mekanizmalar aracılığıyla etkileyebilir. Bilindiği üzere sigara içmek, serbest radikallerin üretimini artırma, oksidatif stresi artırma ve bağışıklık sisteminde proinflamatuvar etkiyi teşvik etme potansiyeline sahiptir, bu da fagositlerin aktivasyonuna ve dolayısıyla oksidatif hasara yol açmaktadır. Ayrıca, sigara içmek, AH riskini artıran beyin damar hastalığı, felç, kalp hastalığı gibi serebrovasküler hastalıklara yol açabilir. Bazı yüksek gelirli ülkelerde sigara içme oranında azalma görülse de birçok düşük ve orta gelirli ülkede sigara içenlerin sayısı hala artmaktadır (Rasmussen Eid ve ark., 2019; Silva ve ark., 2019). Durazzo ve arkadaşlarına göre, bugün literatürde sunulan kanıtların toplamı, demans insidansını azaltmak amacıyla sigara içmenin kesilmesinin önerilmesi için yeterli olacak kadar güçlüdür (Durazzo ve ark., 2014).

Alkol tüketimi, AH riskini etkileyen faktörlerden biridir ve bu konu üzerine yapılan araştırmalar önemli bulgular sunmuştur. Özellikle aşırı ve kronik alkol kullanımı, nörodejeneratif hastalıkların riskini artırabilir. Araştırmalar, düzenli aşırı alkol tüketiminin beyin hücreleri üzerinde zararlı etkilere neden olabileceğini ve bilişsel işlevlerin bozulmasına katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, düşük veya ölçülü miktarda alkol tüketiminin bazı çalışmalarda bilişsel gerileme riskini azaltabileceği öne sürülmüştür. Alkolün AH riski üzerindeki rolü karmaşıktır ve tüketilen miktar, sıklık ve kişisel faktörler gibi birçok değişkeni içermektedir. Sağlık açısından en iyisi, alkol tüketimini ılımlı düzeylerde sınırlamak

ve kişisel sağlık durumunu göz önünde bulundurarak doktor tavsiyelerine uymaktır (Ball ve Darby, 2022; Peng ve ark., 2020).

4.1.7. AH'de tedavi yaklaşımları

4.1.7.1. Farmakolojik ve farmakolojik olmayan yaklaşımlar

AH'nin mevcut ilaç tedavileri, demansın bilişsel semptomları ile davranışsal ve psikolojik semptomlarının ilerlemesini sınırlamak için iyileştirici olmaktan ziyade semptomatik temellidir. FDA tarafından dört ilacın piyasada kullanımı onaylanmıştır. Bunlar antikolinesteraz inhibitörleri grubundan olan donepezil, galantamin, rivastigmin ve anti-glutaminerjik bir ilaç olan memantindir (Se Thoe ve ark., 2021).

Antikolinesteraz inhibitörleri, belirli nöronlar arasında bilgi aktarımını sağlayan ve hafızada rol oynayan bir molekül olan beyindeki asetilkolin seviyesini arttırmak için tasarlanmış moleküllerdir. Bu tedavilerin amacı AH'li kişilerin santral sinir sisteminde gözlenen asetilkolin eksikliğini düzeltmektir. Anti-glutaminerjikler, NMDA reseptörlerinin rekabetçi olmayan bir antagonist etkisi yoluyla glutamat seviyelerini düzenlemek için kullanılır. Glutamat, beynin öğrenme ve ezberleme fonksiyonlarında rolü olan bir nörotransmitterdir. Yüksek glutamat düzeylerinin nöronların ölümüne neden olan patolojik etkilere neden olduğu düşünülmektedir. Bu ilaç tedavileri hastalığın gelişimini geciktirmek, bilişsel işlevleri geçici de olsa stabilize etmek veya iyileştirmek, davranış bozukluklarını kontrol altına almak amacıyla kullanılmaktadır. İyileştirici olmasa da bu tedaviler yine de AH'li kişiler ve onlara bakan kişiler için bağımsızlığın korunmasına ve yaşam kalitesinin iyileştirilmesine yardımcı olur. Ancak etkinliği yalnızca kısmi ve en iyi ihtimalle geçici olan bu tedaviler, AH'nin nedeninden ziyade yalnızca sonuçlarını etkiler. Bu tedaviler, nörodejenerasyon süreci ortaya çıkmadan önceki erken asemptomatik aşamada daha faydalı olabilir (Cummings ve ark., 2018; Cummings ve ark., 2019; Fish ve ark., 2019).

İlaç tedavilerinin yanı sıra farmakolojik olmayan tedaviler de nörodejeneratif hastalıkların tedavisine alternatif teşkil etmektedir. Bu tedavilerden bahsederken terapistler ve psikologlar gibi farklı sağlık profesyonellerinin rolünü vurgulamak önemlidir. Mesleki terapi, bu hastaların kendilerine güvenini artırarak günlük yaşam aktivitelerinin bilişsel ve davranışsal egzersizler aracılığıyla geliştirilmesine izin verdiği için tedavinin önemli bir parçasını temsil eder. Psikolojik terapi, AH hastaları için temel bir rol oynar, çünkü depresyon veya anksiyete gibi

süreçlerle başa çıkmalarını sağlayan gerekli araçları sunar. Bu, AH'de yaygın olarak görülen ve bilişsel ve işlevsel düzeylerde önemli sonuçları olan klinik belirtilere sahiptir (Matilla-Mora ve ark., 2016; Zucchella ve ark., 2018) on olarak, herhangi bir hastalığın en iyi tedavisinin iyi bir önleme stratejisinde yattığını vurgulamak önemlidir. Bu bağlamda, fiziksel egzersiz içeren sağlıklı bir yaşam tarzını benimsemek, Akdeniz diyeti ve iyi bir uyku alışkanlığı, bilişsel gerilemeyi azaltma ve AH riskini azaltma ile ilişkilendirildiği için etkili stratejilerden biri olarak kanıtlanmıştır. Bilişsel terapi, AH'nin önlenmesinde en iyi sonuçları veren farmakolojik olmayan bir tedavi olarak konumlandırılmıştır. Bu terapi, bilişsel uyarım ve eğitim egzersizlerinin geliştirilmesi ile karakterizedir (L. Y. Wang ve ark., 2020).

4.1.7.2. Yeni tedavi yaklaşımları

Birçok ilaç denemesi KBB'deki geçirgenlik sorunları nedeniyle başarısız olmaktadır. Bu sorunun üstesinden dozu artırarak gelinmeye çalışılsa da ikincil istenmeyen etkilerin ortaya çıkma riski çalışmaların ilerlemesine engel olmaktadır (Anthony ve ark., 2021; Chakraborty ve ark., 2017). Tedavi geliştirme eğilimi, tek bir patolojik hedeften, nöroinflamatuvar ve nörodejeneratif süreçlere doğru daha karmaşık bir mekanizmaya kaymaktadır. İlaçların yeniden konumlandırılması farmakolojik gelişmeyi hızlandırabilirken, farmakolojik olmayan müdahaleler, özellikle tekrarlayan transkraniyal manyetik stimülasyon ve transkraniyal doğrudan akım stimülasyonu gibi klinik uygulama potansiyeline sahiptir. Gelecekte, hekimlerin hassas tıp temelinde uygun müdahaleleri bireysel olarak seçmeleri mümkün olabilir (Yu ve ark., 2021).

Biyobelirteçler, normal biyolojik ve patojenik süreçleri değerlendirmek için kullanılan göstergelerdir. Tedavi yöntemlerinin farmakolojik etkilerini izlemek için kullanılmasının yanında AH'de yaşlı hastaların sağlık durumunu ve hastalık şiddetini değerlendirmek için kullanılabilir. Yıllar boyunca A β proteinlerini hedefleyen ilaçlara artan vurgu olmasına rağmen, bu ilaçlar henüz çok sayıda olumlu sonuç vermemiştir. AH için prognostik ve tanısal biyobelirteçler mevcut olsa da yüksek maliyet ve sınırlı erişim nedeniyle sadece sınırlı sayıda hasta bu klinik olarak mevcut biyobelirteçlerle test edilmiştir. Bu nedenle, AH hastaları üzerinde büyük bir etki yaratacak şekilde herhangi bir klinik ortamda yapılabilen uygun maliyetli ve uygulanabilir bir kan testi geliştirmek önerilmektedir (Teunissen ve ark., 2022). Plazma A β_{42} ve A β_{40} seviyeleri şu anda AH için kabul edilmiş biyobelirteçlerdir. Yapılan çalışmalarda A β seviyelerinin yaşlı insanlarda AH'nin öntanı olarak kullanılabileceği tespit

edilmiştir. Bu biyobelirteçlerin zaman içinde bilişsel bozulma veya AH başlangıcıyla nasıl değiştiğini araştırılmıştır. Seviyelerin izlenmesi sonucunda, takip süresi boyunca $A\beta_{42}$ seviyeleri artan kişilerin, düşük seviyelere sahip olanlara göre AH geliştirme olasılığının anlamlı derecede daha fazla olduğu görülmüştür (Olsson ve ark., 2016).

4.2. AH Tedavisinde Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nörolojik bozuklukların tedavisindeki ana sınırlamalardan biri, ilaçların beyne iletilmesinin zorluğudur. Beyin, serebral mikrodamarların endotel hücreleri tarafından oluşturulan seçici bir bariyer olan KBB ile çevrilidir. Mikrodamarların yüzeyi yetişkinlerde ortalama 12-18 m² ile kan-beyin alışverişi için en büyük arayüzdür. KBB, iyon ve besin taşınmasını düzenleyerek beyin homeostazisinin korunmasından ve beyni nörotoksik moleküllere karşı korumaktan sorumludur. BBB'nin işlevini yerine getirebilmesi için benzersiz bir anatomisi vardır. Beyin endotel hücreleri sıkı bağlantılarla birbirine bağlanır ve fenestrasyonları yoktur. Bu bariyeri aşmak için çeşitli alternatifler ortaya atılsa da olarak, geçirgenlik problemini çözenin en yenilikçi bir yolu, ilaçları nanopartiküllerin (NP) içine yüklemektir. Avrupa Komisyonu'na göre nanomalzemeler, 1-100 nm boyut aralığında en az %50 partikül içeren malzemelerdir (Lombardo ve ark., 2020). NP'ler aktif etken maddeler ile birleştirilmiş kolloidal elementlerdir ve biyolojik sistemlerde kontrollü ilaç salımının yanında hedef dokuda ilaç dağıtımını sağlayan bir sistem olarak kabul edilir. Geleneksel ilaç dağıtım yöntemlerinin karşılaştığı düşük biyoyararlanabilirlik, hızlı ilk geçiş metabolizması gibi önemli kısıtlamaları aşma potansiyeline sahiptir. (Hanafi-Bojd ve ark., 2015; Santonocito ve ark., 2021). Polifenoller, proteinler ve peptitler gibi bazı biyoaktif maddelerin gastrointestinal sistemlerde düşük çözünürlük ve emilime sahip oldukları gözlemlenmiştir ve bu da biyolojik sistemlerde zayıf terapötik etkinliklerini ve klinik denemelerdeki başarısızlığın nedenini açıklamaktadır (Munin ve Edwards-Lévy, 2011; Hajieva, 2017). NP'ler, ilacı güvenli bir şekilde taşınmasını sağlayarak asidik ortamın üstesinden gelir ve daha düşük bir dozda maksimum etkinlik sağlayarak bu engelleri aşar. Ayrıca, şekil değiştirebilen fizikokimyasal özellikleri sayesinde, düşük çözünürlüğe sahip bir ilaç adayı bile hedeflenen bölgeye etkili bir şekilde taşınabilir ve farmakokinetik profilini iyileştirebilir (Saraiva ve ark., 2016).

4.3. Botanik Bilgiler

4.3.1. *Sideritis* cinsi

Sideritis cinsi, Lamiaceae familyasına aittir. Kuzey Yarımküre'nin ılıman ve tropikal bölgelerine yayılmış 150'den fazla türü içerir ve *Sideritis* ve *Marrubiastrum* (Moench.) Mendoza-Heuer olmak üzere iki alt cins ayrılır. Esas olarak Balkan Yarımadası ve Akdeniz bölgesinde dağılım gösterir. Türkiye'de ortalama 45, Yunanistan ve Balkanlar genelinde ise yaklaşık 10 tür bulunur. Tür sayısı, türler arasındaki yüksek düzeyde polimorfizm, ekotip çeşitliliği ve türler arası melezlenme de dahil olmak üzere taksonomik işlem ve kavramlarına bağlıdır ve bu nedenle net değildir (Aneva ve ark., 2019).

Sideritis cinsleri, Türkiye'de genellikle "dağ çayı" ve "adaçayı" olarak adlandırılır ve halk tıbbında bitki çayı olarak yaygın bir şekilde kullanılır. Halk tıbbında bitkinin toprak üstü kısımlarının kaynatma ve infüzyonları, antiinflamatuar, antimikrobiyal, anti-ülseratif, diüretik, antispazmodik, antioksidan, analjezik, antikonvülsan, antifungal ve gaz giderici etkileri de dahil olmak üzere geniş bir yararlı özellik yelpazesi nedeniyle oral veya topikal olarak uygulanır. Bu özellikler, *Sideritis* cinsini iltihap, soğuk algınlığı, astım, bronşit ve gastrointestinal rahatsızlıklar gibi çeşitli durumların tedavisinde değerli kılar (Şimşek Sezer ve Uysal, 2021; Żyżelewicz ve ark., 2020). Ayrıca, yapılan çalışmalar bu bitkilerin T2DM, Parkinson hastalığı ve AH gibi hastalıkların tedavisinde de etkili olduğunu göstermektedir (Hofrichter ve ark., 2016)

AH üzerine yapılan *Sideritis* türleri üzerine yapılan çalışmalarda, bu etkinin yüksek antioksidan aktivite ve nörokoruyucu potansiyellerinden kaynaklandığı anlaşılmıştır. *Sideritis* türlerinin içerikleri değerlendirildiğinde, fenolik bileşikler, flavonoidler, tanenler ve monoterpenoitler gibi ana fitokimyasal içeriklere sahip oldukları görülmüştür (Turkmenoglu ve ark., 2015; Ververis ve ark., 2023; Zengin ve ark., 2016). Yapılan araştırmalar, luteolin, rosmarinik asit ve apigenin gibi bazı flavonoidlerin, AH'ye karşı potansiyel koruma sağlayabileceğini göstermektedir (Dourado ve ark., 2020; Hase ve ark., 2019; Kwon, 2017).

4.3.1.1. *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm. (SGV)

Çok yıllık, 30-90 cm uzunluğunda, basit veya dallanmış bitkiler. Gövdeler kısa, yayık glandular tüylü, seyrek eglandular tüysüz veya tüylü. Orta gövde yaprakları lenseolattan linear-lanseolata kadar değişen şekillerde, lamina 5-12x1-2 cm boyutlarında, uçları mukronattan akuminata

kadar, kenarları tam veya seyrek dentikulat-serrat, sapsız veya 6 cm'ye kadar saplı, internodlar 8 cm'ye kadar. Vertisillastrumlar 5-16(-24), 6 çiçekli, 1.5-6 cm aralıklı. Brakteler çoğunlukla uzun-kaudat, 2-6 cm. Kaliks 9-13 mm uzunluğunda, 4 mm uzunluğa kadar kadar eglandular tüylerle yoğunca kaplı, dişler üçgenden linear-lanseolata kadar değişen şekillerde, 3.5-5.5 mm, akuttan akuminata kadar, glandsız veya kısa glandlı. Korolla sarı, 12-14 mm uzunluğunda, iç tarafta tüylü (Davis, 2019).



Şekil 1. *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm. bitkisi (Fotoğraf: Dr. Öğr. Üyesi İ. Şenkardeşler, 2021)

4.3.1.2. *Sideritis Libanotica* Labill. subsp. *Linearis* (Bentham) Bornm. (SLL)

Çok yıllık, 20-60(-95) cm uzunluğunda, basit veya dallanmış, yatık beyaz-tomentoz, glandsız veya yeşilimsi, çıplaklaşan, sıklıkla mikroglandlı. Gövde yaprakları 4-8 çift, internodlar 3-10 cm, ortadaki yapraklar lineardan linear-lanseolata kadar değişen şekillerde, 1-4(-6)x0.3-1 cm boyutlarında, uçları mukronat, akut veya akuminat, kenarları ince serrat-dentikulat veya tam. Vertisillastrumlar 2-15, her biri 6 çiçekli, (1-)-2-9 cm aralıklı. Ortadaki brakteler ovat-kordattan orbikulara kadar ve reniform, 8-20x7-13 mm boyutlarında, mukronat veya akuminat, akumen 2-8(-15) mm uzunluğunda. Kaliks 5.5-9 mm uzunluğunda, hemen hemen yoğun tüylü, bazen serpiştirilmiş şekilde salgı tüylü, dişleri 2.5-3.5 mm uzunluğunda, lanseolat, tüylü uçlu. Korolla sarı, (7-)-10-13 mm uzunluğunda, tüylü ve iç tarafta kahverengi çizgili (Davis, 2019).



Şekil 2. *Sideritis Libanotica* Labill. subsp. *Linearis* (Bentham) Bornm. bitkisi (Fotoğraf: Dr. Öğr. Üyesi İ. Şenkardeşler, 2023)

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Materyaller

PLGA (Asit terminalli, laktit:glükolit 50:50, Molekül ağırlığı 24,000-38,000 Da), PEG (Molekül ağırlığı ~4000 g/mol), hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar ve kullanılan solventler Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, ABD)'den temin edilmiştir. A β ₁₋₄₂ GenScript Biotech Corporation'dan (NJ, ABD) satın alınmıştır. ELISA Kitleri; Bioassay Technology Laborator, Korain Biotech Co. Ltd. (Shanghai, China)'dan temin edilmiştir. qRT-PCR Kitleri ; QIAGEN (Venlo, Hollanda)'dan temin edilmiştir. qRT-PCR analizde kullanılan primerler Sebtebiolab Biyoteknoloji (Ankara, Türkiye)'den satın alınmıştır.

5.2. Bitki Materyalinin Temin Edilmesi

SGV'nin toprak üstü kısımları, 2022 yılında Türkiye'nin Karadeniz bölgesinde, Kastamonu'da toplandı. SLL'nin toprak üstü kısımları ise 2022 yılında Türkiye'nin Akdeniz bölgesinde, Kahramanmaraş'ta toplandı. Her iki bitki de çiçeklenme döneminde toplandı. Bitki materyalleri Dr. Öğr. Üyesi İsmail ŞENKARDEŞ tarafından tanımlandı ve Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbariumu'nda (MARE Numaraları: 22881, 19155) saklandı.

5.3. Ekstrelerin Hazırlanması

SGV ve SLL'nin toprak üstü kısımları gölgede 25°C sıcaklıkta kurutuldu. Kuruduktan sonra bitki materyalleri uygun ağırlıkta ince toz haline getirildi, bu işlem mekanik bir öğütücü (Renas, RBT1250) kullanılarak gerçekleştirildi. Toz haline getirilen kurumuş toprak üstü kısımlar, EtOH-d.H₂O (7:3, v/v) solvent karışımını kullanarak masere edildi. Maserasyon işleminden sonra sıvı kısım süzgeç kağıdından süzülüp alındı. Alınan süzüntülerin solventleri bir lyofilizör (Scanvac, CoolSafe) cihazı kullanılarak uçuruldu ve ham ekstreler elde edildi. Elde edilen ekstreler, çalışma gününe kadar 4°C'de buzdolabında saklandı.

5.4. *In Vitro* Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

5.4.1. 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH) radikali giderme aktivite tayini

0,5-5 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrelerden 10'ar μ L alınarak, 240 μ L 0,1 mM DPPH çözeltisi ilave edildi. Karışım bir dakika boyunca vortex ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca karanlıkta bekletildi. Absorbans, bir mikropilaka okuyucu

(Epoch, BioTek) kullanılarak 517 nm dalga boyunda referansa karşı ölçüldü. Aynı prosedür, askorbik asit standart çözeltileri için de uygulandı. % DPPH radikali giderme kapasitesi aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplandı:

$$\% \text{ DPPH radikali giderme kapasitesi} = [(A0 - A1)/A0] \times 100]$$

A0: Kontrol çözeltisinin absorbansı

A1: Bitki ekstraktları ve standart çözeltilerin absorbansı

Başlangıç DPPH konsantrasyonunda %50 azalmaya neden olan ekstre/standart konsantrasyonunu belirleyen IC₅₀ değeri, incelenen konsantrasyonlara karşı % serbest radikal giderme aktivite değerlerinin yerleştirilmesi ile hesaplandı. IC₅₀ değeri mg/mL cinsinden ifade edildi. Deney üç kez yapıldı ve verilerin ortalamaları ile standart sapma hesaplandı (Fu ve ark., 2010).

5.4.2. Demir indirgeme antioksidan gücü tayini (FRAP)

FRAP yöntemi, 25 mL 300 mM asetat tamponu (pH 3,6), 2,5 mL 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin çözeltisi ve 2,5 mL 20 mM FeCl₃·6H₂O içeren bir FRAP reaktifi hazırlayarak gerçekleştirildi. Bu reaktif daha sonra 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından, FRAP ayırıcının 190 µL'si 10 µL ekstre veya standart ile karıştırılarak, ekstre yerine distile su konularak hazırlanan köre karşı absorbans artışı 593 nm'de ölçüldü. Ekstre'nin FRAP değeri, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM ve 0,4 mM konsantrasyonlarına sahip FeSO₄·7H₂O stok çözeltisi kullanılarak hazırlanan bir kalibrasyon tablosu yardımıyla belirlendi. Fe²⁺ için kalibrasyon denklemi $A = 4,585x + 0,0541$ ($R^2 = 0,9926$) olarak elde edildi. Ekstrelerin FRAP değerleri mM Fe²⁺/mg ekstre olarak ifade edildi ve standart olarak kullanılan butilhidroksianisol (BHA) ile karşılaştırıldı (Taşkın ve ark., 2021).

5.4.3. Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC)

CUPRAC reaktifini hazırlamak için, sırasıyla bakır(II) çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve 1 M amonyum asetat tamponundan her birinden 60 µL alındı ve karıştırıldı. Daha sonra, 60 µL ekstre ve 10 µL etanol karışıma eklenerek oluşan çözüm sallandı ve ağzı kapalı bir şekilde oda sıcaklığında 60 dakika boyunca bekletildi. Bu inkübasyon süresinin sonunda, çözeltinin absorbansı numuneyi içermeyen bir referans çözeltisine karşı 450 nm'de ölçüldü. Standart olarak Trolox kullanıldı ve 1 mM Trolox stok çözeltisi, bir Trolox standart eğrisi oluşturmak için hazırlandı. 1 mM, 0,8 mM, 0,6 mM, 0,4 mM, 0,2 mM ve 0,1 mM konsantrasyonlarda

çalışma çözeltileri, stok çözeltiyi etanol ile seyrelterek hazırlandı. Farklı konsantrasyonlardaki Trolox çözeltileri aynı şekilde CUPRAC yöntemi ile değerlendirildi. Bir kalibrasyon eğrisi hazırlandı ve eğri için denklem $A = 5.281x + 0.05055$ ($R^2 = 0.9935$) olarak belirlendi. Ekstrelerin CUPRAC değerleri mM Trolox/mg ekstre olarak ifade edildi ve standart olarak kullanılan askorbik asit ile karşılaştırıldı (Dziurka ve ark., 2021).

5.5. *In Vitro* Antikolinesteraz Aktivite Tayin Yöntemi

Asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyon aktivitesi, Ellman ve ark. tarafından tarif edilen yöntemde yapılan bazı değişikliklerle bir mikropilaka okuyucu (Epoch, BioTek) kullanılarak belirlendi (Ellman ve ark., 1961). Reaktif çözeltileri hazırlamak için taze hazırlanmış pH 8,0'de 50 mM Tris-HCl tamponu kullanıldı. AChE çözeltisi ve örneklerden 20'şer μ L alındı ve 40 μ L Tris-HCl tamponu ile karıştırıldı. Ardından 25°C'de 10 dakika boyunca inkübe edildi. Daha sonra, karışıma 20 μ L asetiltiyokolin iyodür (ATCI) substratı (50 mM) eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından, 100 μ L (20 mM) 5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) karışıma eklenerek absorbans bir referansa karşı 412 nm'de ölçüldü. Aynı prosedür standart olarak kullanılan galantamin için uygulandı. Her deney üç kez gerçekleştirildi ve sonuçlar kontrol karşısında enzim inhibisyonunun yüzdesi olarak ifade edildi.

5.6. NP'lerin Üretilmesi

PLGA/PEG Kopolimerinin Sentezi: Bu kopolimer, Zentner ve arkadaşları tarafından bildirildiği gibi halka açma yönteminde bazı değişiklikler yapılarak sentezlenmiştir (Zentner ve ark., 2001). PEG 4000 (0.9 g), suyu çıkarmak için 150 °C'de, 5 mmHg vakumda 2 saat ısıtıldı. Katalizör olarak kalaylı oktoat (0,04 mg) ilave edilmiş ve karışımlar, 5 mmHg vakum altında 160 °C'de 6 saat ısıtıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, kopolimerler diklorometan içinde çözüldürüldü, ardından safsızlıkları ve reaksiyona girmeyen materyali çıkarmak için distile suda üç kez yeniden kristalleştirildi. Saflaştırılmış kopolimerler, gece boyunca 37 °C'de 5 mmHg vakum altında kurutuldu.

NP'lerin İlaç Kapsüllemesinin Hazırlanması: Ekstre yüklü NP'ler, nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanmıştır (Chen ve ark., 2011). 50 mg PLGA-PEG kopolimerine ağırlıkça %0,05 ekstre eklenmiş ve 5 mL asetonda çözüldürüldü. Polimer çözeltisi vortekslenirken 0,7 mL etanol ilave edildi. Karışımlar daha sonra emülgatör olarak ağırlıkça %0,1 TPGS içeren sulu bir çözelti ile

650 rpm karıştırma hızında karıştırıldı. Daha sonra sabit hızda karışmakta olan karışıma ağırlıkça %1 polisorbata 80 (P80) damla damla ilave edildi. 4 saat sonra süspansiyon yıkandı ve 5 °C, 15.000xg'de 1 saat boyunca santrifüjlendi.

5.7. Üretilen NP'lerin Fizikokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi

5.7.1. Zeta potansiyeli (ζ) ölçümü

Parçacık yüzeyindeki elektrik yükünü yansıtan ve kolloidal sistemlerin fiziksel stabilitesini gösteren zeta potansiyeli, Malvern Zetasizer 3 000 HSA (Malvern Instruments, UK) kullanılarak elektroforetik hareketlilik belirlenerek ölçüldü. P80 ile kaplı PLGA-PEG ile üretilen NP'lerden oluşan numune, 50 IS/cm'lik bir iletkenliğe ayarlanan sodyum klorür solüsyonu (%0.9 w/v) ve iki kez distillenmiş su içinde ölçüldü. Ölçümler üç kez tekrarlandı, ölçümlerin ortalama değeri sunuldu (Sun ve ark., 2015).

5.7.2. İlaç enkapsülleme verimliliği

İlaç enkapsülleme verimliliği (EE), NP içindeki ilaç miktarının solüsyon içerisine konulan toplam ilaç miktarına ağırlık olarak oranıdır. 5 mg dondurularak kurutulmuş NP'ler 5 mL metanol ile 1 saat vortekslendi ve 0,22 μ m membran filtreden süzüldü. Daha sonra filtrattaki ilaç içeriği 278 nm'de ultraviyole (UV) spektrofotometre ile analiz edildi (Jose ve ark., 2014). Ölçümler üç kez tekrarlandı. İlaç enkapsülleme verimliliği, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

İlaç enkapsülleme verimliliği = NP içindeki gerçek ilaç miktarı / NP içindeki teorik ilaç miktarı \times %100

5.7.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Tüm örneklerin yüzeyi SEM'den önce 1 dakika süreyle altınla kaplandı. Sentezlenen NP'lerin şekli, boyutu, morfolojisi ve dağılımı SEM (EVO LS 10, ZEISS) cihazı kullanılarak karakterize edildi (Cam ve ark., 2021).

5.7.4. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopu (FTIR)

NP'lerin kimyasal yapısı ve içeriği FTIR ile değerlendirildi. Jasco FT/IR 4700 spektrometre kullanılarak ekstraların NP'lere başarılı bir şekilde yüklenip yüklenmediği analiz edildi.

Ölçümler iletim modunda, 400 ile 4000 cm^{-1} arasında ve oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Analiz için OPUS Viewer (sürüm 6.5) yazılımı kullanıldı (Cam ve ark., 2021).

5.7.5. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)

Ölçümlerde önce cihazın kalibrasyonu talimatlara uyarak yapıldı. Ardından DSC analizi, Perkin Elmer Jade DSC ve Pyris yazılımı (PerkinElmer Inc., Mass., ABD) kullanılarak, dinamik argon atmosferi altında (20 ml dk^{-1}) $0-400^\circ\text{C}$ arasında 10°C dk^{-1} 'lik bir ısıtma hızında gerçekleştirildi (Cam ve ark., 2021).

5.7.6. X ışını toz kırınımı (XRD)

NP içeriklerinin yapılarını ve kristalize formlarını analiz etmek için $\text{Cu K}\alpha$ radyasyonu ile D / Max-BR difraktometresi (RigaKu, Tokyo, Japonya) kullanıldı. Analizler 40 mV ve 30 mA 'da 2θ aralığında $5-90^\circ$ aralığında yapıldı ve veriler OriginPro 7.0 yazılımı (OriginLab Corporation, MA, ABD) kullanılarak difraktoграмmlara dönüştürülüp değerlendirildi (Cam ve ark., 2021).

5.7.7. *In vitro* ilaç salım profili

NP'ler içinde kapsüllenmiş ekstrelerin salım hızı ve modeline ilişkin bir tahmine sahip olmak için, ekstre yüklü NP formülasyonları üzerinde *in vitro* ilaç salım testi yapıldı. Önce ekstrelerin $2-10 \mu\text{g/mL}$ arasında değişen standart çözeltilerinden doğrusal bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Ardından 20 mg NP , $4 \text{ mL PBS (pH 7.4)}$ içinde yeniden süspanse edildi ve 37°C 'de bir çalkalayıcı içine yerleştirildi. Belirlenen zamanlarda (1., 2., 4., 8., 24., 48., 72., 120., 144., 168. ve 240. sa), süspanسیون $12.000 \times \text{g'de}$ 10 dakika santrifüjlendi ve yüzeydeki süpernatant çekildi sonra aynı miktarda taze PBS eklendi. İşlem 3 kez tekrarlandı. Örnekler 425 nm 'de UV spektrofotometre kullanılarak ölçüldü (Cam ve ark., 2021).

5.7.8. *In vitro* salım kinetiği

Ekstrelerin NP'lerden salınımını değerlendirmek ve zaman içinde ilaç plazma konsantrasyonundaki değişikliği *in vitro* olarak simüle edildi İlaç salınım profillerini hesaplamak için Korsmeyer-Peppas, sıfır-derece, birinci-derece, Higuchi ve Hixson-Crowell modellerini içeren beş farklı matematiksel model kullanıldı (Topal ve ark., 2022). Bu modeller farklı değişkenleri ve kinetik sabitleri içerir ve bunlar sırasıyla K , K_0 , K_1 , K_h ve K_{hc} olarak

temsil edilir. Belirli bir zaman noktasındaki ilaç salınımının kesirsel miktarı, Q olarak gösterilir ve difüzyon üssü, n ile belirtilir.

Tablo 1. İlaç salınım kinetiği matematiksel modelleri ve ilgili denklemler

Kinetik Modelleri	Eşitlikler
Korsmeyer-Peppas	Kt^n
Zero-order	$Q = K_0t$
First-order	$\ln(1-Q) = -K_1t$
Higuchi	$Q = K_h t^{1/2}$
Hixson Crowell	$Q^{1/3} = K_{hc}t$

5.8. *In Vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

İnsan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y) (CRL-2266™, ATCC), %10 (v/v) FBS %1 (v/v) P/S ilavesi yapılmış EMEM/Ham's F12'nin 1:1 karışımını içeren tam bir ortamda 37°C, %5 CO₂ ve %95 nispi nemde inkübe edildi. Hücrelerin çoğaltılması sırasında, hücreler PBS ile yıkayıp, hücre kültürü şişesinde ayrılmasını kolaylaştırmak için tripsin-EDTA ile inkübe edildi. Hücrelerin tripsinden uzaklaştırılması için 1200 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Pellet, taze besiyerinde pipetaj yapılarak tekrar süspende edildi. Hücre sayımından sonra, hücreler uygun bir seyreltmeyle T75 hücre kültürü kaplarına aktarıldı ve her 3 günde bir pasajlandı (Alonso ve ark., 2021).

5.8.1. A β_{1-42} çözeltilisinin hazırlanması

Ticari olarak satın alınan liofilize A β_{1-42} solüsyonu Pilot ve ark. tarafından açıklanan yöntemle göre hazırlandı ve 72 saat 37 °C'de inkübe edildi (Pilot ve ark., 1999).

5.8.2. Hücre canlılığı analizi

Hazırlanan hücre hattındaki hücreler %80 oranında kültür yüzeyini kapladığında PBS ile yıkandıktan sonra % 0,25 Tripsin-EDTA kullanılarak kaldırıldı ve 96 kuyucuklu plakalara

(Corning) ($0,5 \times 10^4$ hücre/kuyu) hücre ekimi yapıldı. Bitki ekstraları, ekstre yüklü NP'ler ve $A\beta_{1-42}$ 6 farklı dozda hazırlandı. Ana stok DMSO'da hazırlandı ve hücreye verilen oran % 0,1 olacak şekilde ayarlandı. 24 saat inkübasyon sonrası yeterli yoğunluğa gelmiş hücrelere her doz için üçerli kuyular olmak üzere ekstre verildi ve 24, 48 ve 72 saat inkübasyon yapıldı. Bu saatlerin sonunda total metabolik aktivitenin ölçümüne dayanan 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ajanı kullanılarak hücre canlılığı analizi yapıldı. Bunun için, hücre kültüründe terapötik inkübasyonlar sonlandığında, kuyuların her birine 10 μ L, 5 mg/mL MTT ajanı eklendi. 96 kuyucuklu plakalar 3 saat 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nispi nemde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonrası hücre üzerindeki vasat çekildi ve 100 μ L DMSO eklenerek oluşan formazan kristalinin çözünmesi sağlandı. Daha sonra 5 dk boyunca çalkalayıcı üzerinde düşük devirde çalkalandıktan sonra çoklu plaka okuyucu (ELISA okuyucu, BioTek Epoch) cihazında 570 nm'de okutularak absorbans değerleri belirlendi (Sucu ve ark., 2019). Numunelerin absorbans değerleri aşağıdaki formülde belirtilen yerlere yazılarak her bir deney grubunun hücre canlılık oranı hesaplandı. (%) CompuSyn (Paramus, NJ) yazılımı aracılığıyla sonuçlar değerlendirildi ve ekstraların IC₅₀ değerleri tespit edildi (Chou ve Martin, 2005).

$$\text{Hücre canlılık oranı} = (A_{\text{numune}} - A_{\text{kör}} / A_{\text{kontrol}} - A_{\text{kör}})$$

$$\% \text{Hücre canlılık oranı} = (A_{\text{numune}} - A_{\text{kör}} / A_{\text{kontrol}} - A_{\text{kör}}) \times 100$$

$$A_{\text{numune}} = \text{Test grubunun absorbansı}$$

$$A_{\text{kontrol}} = \text{Kontrol grubunun absorbansı}$$

$$A_{\text{kör}} = \text{Kör grubunun absorbansı}$$

5.8.3. Ekstrelerin kombinasyon indekslerinin (CI) tespiti

Kütle etki yasasının medyan etki denkleminin teorisi, doz ve etkinin birbirinin yerine geçebileceğini ve tüm doz-etki eğrilerinin medyan etki grafiğiyle düz çizgilere dönüştürülebileceğini gösterir. Bu nedenle *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar için küçük boyutlu deneyler kullanılarak farmakodinamik analiz yapılmasına olanak sağlar. Ayrıca, medyan etki denkleminin genişletilmesi sinerjizmi (CI<1), additifi (CI=1) ve antagonizmi (CI>1) tanımlayan kombinasyon indeks denkleminin CompuSyn yazılımı tarafından otomatik olarak simüle edilebileceğini kanıtlamıştır (Chou, 2018). Bundan dolayı 2 ekstrenin CI potansiyeli gösteren ortanca etki dozu olan Dm (IC₅₀) değerlerinin saptanmasında da CompuSyn (Paramus,

NJ) yazılımını kullanılmaktadır. Buna göre ekstrelerin kombinasyon indeksi aşağıda anlatıldığı şekilde hesaplandı.

Kombinasyonun uygun dozunu belirlemek için önce her iki ekstre için ayrı ayrı MTT deneyleri gerçekleştirildi ve bulunan ortalama absorbans değerleri kullanılarak fraksiyonel etki (Fa) (1-hücre canlılığı) değerleri hesaplandı. Bu Fa değerlerine karşılık gelen dozlar, CompuSyn bilgisayar programına girildi. Kombine kullanım dozları, en yüksek dozu veren ekstre dozu sabit tutularak belirlendi. Daha sonra ekstrelerin IC₅₀ değerleri ayrı ayrı hesaplandı. Belirlenen kombinasyon dozu ve süresinde tekrar MTT deneyleri gerçekleştirildi.

5.8.4. SH-SY5Y hücrelerinde anti-Alzheimer etkinliğinin değerlendirilmesi

SH-SY5Y hücreleri 96 oyuklu plakalara oyuk başına yaklaşık $0,5 \times 10^4$ hücre olacak şekilde ekildi. Plakalar, hücrelerin yapışmasını sağlamak için 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Hücrelere, 24 saat boyunca 5 µM Aβ₁₋₄₂ peptidi ile maruziyet yapıldı. Bu sürenin ardından eski besiyeri alındı. Ekstrelerin ve NP'lerin IC₅₀ dozlarını içeren besiyerleri ile 24, 48 ve 72 saat boyunca maruziyete bırakıldı. Sürelerin sonunda hücre canlılığı MTT protokolü kullanılarak belirlendi ve kontrol hücrelerinin yüzdesi olarak ifade edildi (Castillo ve ark., 2020; Mishra ve ark., 2016).

5.8.5. RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) analizi

SH-SY5Y hücreleri 6 oyuklu plakalara oyuk başına yaklaşık 1×10^6 hücre olacak şekilde ekildi. Gece boyunca inkübasyonun ardından kontrol grubu hariç diğer grupların olduğu kuyucuklara 5 µM Aβ₁₋₄₂ peptidi ile maruziyet yapıldı. Bu sürenin ardından eski besiyeri alındı. Ekstrelerin ve NP'lerin IC₅₀ dozlarını içeren besiyerleri ile 24 saat boyunca maruziyete bırakıldı. Sürenin sonunda elde edilen hücrelerin total RNA'sı MiniRNeasy Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak elde edildi. BioTek Synergy H1 Microplate Reader ile elde edilen RNA'ların safsızlık oranı tespit edildi. Ardından Qiagen First Strand Kit kullanılarak 600 ng cDNA sentez edildi. SYBR Green RT-qPCR Master Mix talimatlarına uyularak numuneler hazırlandı ve gerçek zamanlı PCR değerlerinin ölçümü için QIAGEN Rotor-Gene Q cihazı (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Ct değerleri tespit edilen numunelerin kantitatif analizi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılarak yapıldı (Xiong ve ark., 2021). Gerçek zamanlı PCR için kullanılan ileri (F) ve geri (R) gen primer dizileri Tablo 2'de verilmiştir. Hesaplamalarda housekeeping gen olarak B-Aktin kullanılmıştır.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan primer dizileri

GSK-3 β	İleri: 5'-AGTGGTGTGGATCAGTTGGT-3' Geri: 5'-ACGGCTACACAGTGCAATTG-3'
MAPT	İleri: 5'-ACTGAGAACCTGAAGCACCA-3' Geri: 5'-TCCTGGCTTGTGATGGATGT-3'
Siklin-D1	İleri: 5'-TACACCGACAACCTCCATCCG-3' Geri: 5'-ATGGAGGGCGGATTGGAAAT-3'
β -Katenin	İleri: 5'-CTTACACCCACCATCCCACT-3' Geri: 5'-CCTCCACAAATTGCTGCTGT-3'
Presenilin-1	İleri: 5'-TGGCTCATCTTGGCTGTGAT-3' Geri: 5'-CGGGTCTCCTTCTGCCATAT-3'
Akt	İleri: 5'-CTGCCCTTCTACAACCAGGA-3' Geri: 5'-ATGATCTCCTTGGCGTCCTC-3'
β -Aktin	İleri: 5'-CATGGAATCCTGTGGCATCC-3' Geri: 5'-CACACAGAGTACTTGCCTC-3'

5.9. Akut Toksikite Çalışmaları

Akut toksisite çalışmaları kapsamında toplam 26 adet Wistar Albino ırkı sıçanlar kullanıldı. Tüm sıçanlar, çalışma süresi boyunca oda sıcaklığında 22 \pm 3 °C, %50-60 nemli ortamda ve 12 saatlik ışık-karanlık döngüsünde deney hayvanları kafes sistemlerinde muhafaza edilmiş ve ad libitum beslendi. Çalışma, Orijinal Kılavuz 420 (OECD 420) baz alınarak yapıldı. Geleneksel ölümcül doz (LD50) belirleme çalışmalarının aksine hayvan kullanımını azaltmak için

belirlenen sabit dozların denenmesi prensibine dayanmaktadır. OECD 420 test prensibi (OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS Test No. 420: Acute Oral Toxicity Fixed Dose “Akut Oral Toksikite Sabit Doz Prosedürü”) doğrultusunda tek bir cinsiyetten hayvan gruplarına, 2000, 300, 50 ve 5 mg/kg'lık sabit dozlar kullanılarak aşamalı bir prosedürde doz verildi. Başlangıç doz seviyesi, ciddi toksik etkilere veya ölüme neden olmadan bazı toksisite belirtileri üretmesi beklenen doz olarak, bir gözlem çalışmasına dayalı ön çalışma (Tablo 3) olarak seçilmiştir. Bahsi geçen prensiplere uygun olarak gerçekleştirilen Akut Toksikite çalışmasında; test edilmesi planlanan çözelti öncelikle ön çalışma olarak doz belirleme amaçlı her grup için 2 hayvana sırasıyla 2000 mg/kg, 300 mg/kg, 50 mg/kg ve 5 mg/kg dozda uygulandı. Tüm hayvanlar mortalite ve toksikasyon belirtileri yönünden gözlemlendi. Gözlem süresi sonucunda elde edilen bulgular sonucu ana çalışmanın başlama dozu 2000 mg/kg (Tablo 4) olarak belirlendi.

Tablo 3. Ön çalışma hayvan grupları

Grup	Hayvan Sayısı
2000 mg/kg	2 (SGV) + 2 (SLL)
300 mg/kg	2 (SGV) + 2 (SLL)
50 mg/kg	2 (SGV) + 2 (SLL)
5 mg/kg	2 (SGV) + 2 (SLL)
SGV: <i>Sideritis germanicopolitana</i> Bormm. subsp. <i>Viridis</i> Hausskn. ex Bormm., SLL: <i>Sideritis libanotica</i> Labill. subsp. <i>linearis</i> (Bentham) Bormm..	

Tablo 4. Ana çalışma hayvan grupları

Grup	Hayvan Sayısı
2000 mg/kg	5 (SGV) + 5 (SLL) + 5 (SGV NP) + 5 (SLL NP) + 5 (Boş NP) + 5 (Kontrol)
SGV: <i>Sideritis germanicopolitana</i> Bormm. subsp. <i>Viridis</i> Hausskn. ex Bormm., SLL: <i>Sideritis libanotica</i> Labill. subsp. <i>linearis</i> (Bentham) Bormm., NP: Nanopartikül.	

5.10. *In Vivo* Anti-Alzheimer Değerlendirme Çalışmaları

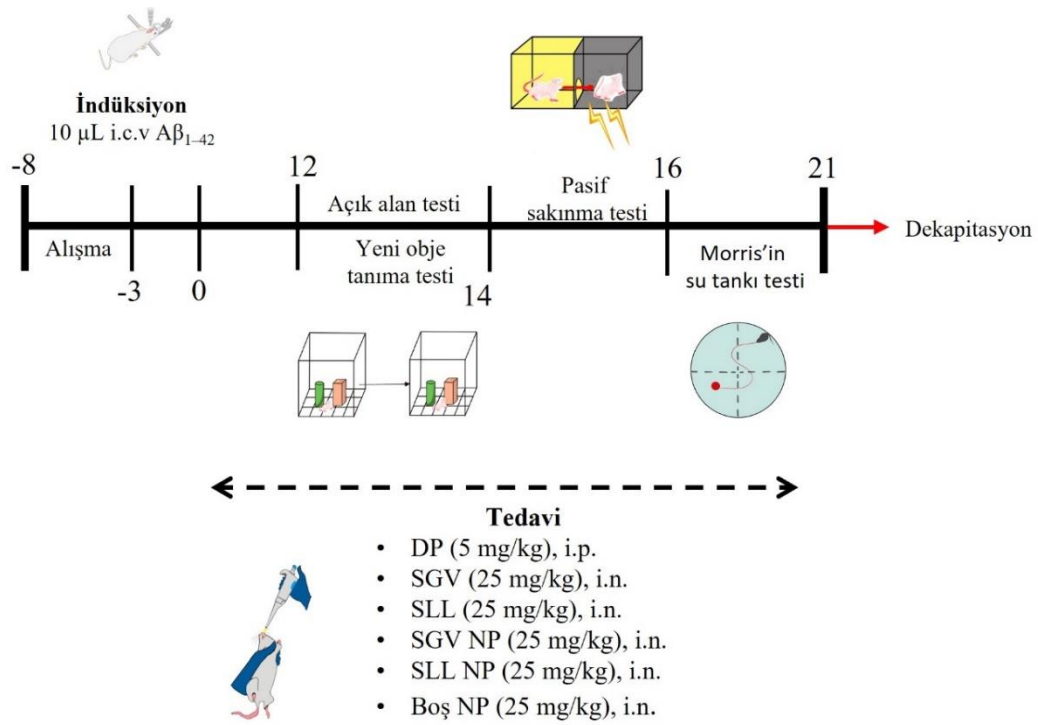
5.10.1. Çalışmanın protokolü

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 56.2021mar numarası ile onaylandıktan sonra gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmalar, Marmara Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama Merkezi ve Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı'nda yürütüldü. Bu çalışmada, Marmara Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (DEHAMER, 56.2021mar, 13.06.2021) temin edilen 3-4 aylık dişi/erkek Sprague-Dawley sıçanları (250-300 gram) kullanıldı. Deneysel süresince, sıçanlar 12 saat karanlık/aydınlık ışıklandırılmalı, 20-22 °C sıcaklık ve %45-50 nem seviyesine sahip odalarda tutuldu. Çalışma süresince, sıçanlar şeffaf kafeslerde tutuldu ve standart sıçan yemi ile çeşme suyu ile beslendi. Çalışma başlamadan önce, hayvanların eğitime başlamaları için bir haftalık bir alıştırma aşaması yapıldı. Çalışma sonunda, kadavraların tıbbi atık prosedürlerine uygun bir şekilde imha edilmesi sağlandı. Protokol aşamaları Anti-Alzheimer etkinliğin değerlendirilmesi için sıçanlar 8 gruba ayrılmıştır:

- Grup 1 ($A\beta_{1-42}$): Alzheimer modeli oluşturmak için anestezi altındaki sıçanlara 10 μ L $A\beta_{1-42}$ intraserebroventriküler yolla bilateral olarak uygulanmıştır. (n=8)
- Grup 2 (Sham Kontrol): Anestezi altındaki sıçanlara $A\beta_{1-42}$ 'yi taklit etmesi için 10 μ L PBS intraserebroventriküler yolla bilateral olarak uygulanmıştır. (n=8)
- Grup 3 ($A\beta_{1-42}+DP$): Anestezi altındaki sıçanlara 10 μ L $A\beta_{1-42}$ intraserebroventriküler yolla bilateral olarak uygulanmıştır. Cerrahi operasyondan kaynaklanabilecek anksiyetenin giderilmesi için 3 gün beklenmiştir. Tedavi süresince her gün DP, 5 mg/kg dozda intraperitoneal yoldan uygulanmıştır (Tiwari ve ark., 2023). (n=8)
- Grup 4 ($A\beta_{1-42}+SGV$): Anestezi altındaki sıçanlara 10 μ L $A\beta_{1-42}$ intraserebroventriküler yolla bilateral olarak uygulanmıştır. Cerrahi operasyondan kaynaklanabilecek anksiyetenin giderilmesi için 3 gün beklenmiştir. Tedavi süresince SGV, 25 mg/kg dozda intranasal yoldan her gün uygulanmıştır (Becker, 1990). (n=8)
- Grup 5 ($A\beta_{1-42}+SLL$): Anestezi altındaki sıçanlara 10 μ L $A\beta_{1-42}$ intraserebroventriküler yolla bilateral olarak uygulanmıştır. Cerrahi operasyondan kaynaklanabilecek anksiyetenin giderilmesi için 3 gün beklenmiştir. Tedavi süresince SLL, 25 mg/kg dozda intranasal yoldan her gün uygulanmıştır (Becker, 1990). (n=8)
- Grup 6 ($A\beta_{1-42}+SGV$ NP): Anestezi altındaki sıçanlara 10 μ L $A\beta_{1-42}$ intraserebroventriküler yolla bilateral olarak uygulanmıştır. Cerrahi operasyondan

- kaynaklanabilecek anksiyetenin giderilmesi için 3 gün beklenmiştir. Tedavi süresince SGV NP, 25 mg/kg dozda intranasal yoldan gün aşırı olarak uygulanmıştır. (n=8)
- Grup 7 ($A\beta_{1-42}$ +SLL NP): Anestezi altındaki sıçanlara 10 μ L $A\beta_{1-42}$ intraserebroventriküler yolla bilateral olarak uygulanmıştır. Cerrahi operasyondan kaynaklanabilecek anksiyetenin giderilmesi için 3 gün beklenmiştir. Tedavi süresince SLL NP, 25 mg/kg dozda intranasal yoldan gün aşırı olarak uygulanmıştır. (n=8)
 - Grup 8 ($A\beta_{1-42}$ +Boş NP): Anestezi altındaki sıçanlara 10 μ L $A\beta_{1-42}$ intraserebroventriküler yolla bilateral olarak uygulanmıştır. Cerrahi operasyondan kaynaklanabilecek anksiyetenin giderilmesi için 3 gün beklenmiştir. Tedavi süresince boş NP, 25 mg/kg dozda intranasal yoldan gün aşırı olarak uygulanmıştır. (n=8)

İntraserebroventriküler $A\beta_{1-42}$ uygulamasından 3 gün sonra başlayan tedaviler ve testler 21 günün sonunda dekapitasyon ile tamamlandı (Şekil 3).



Şekil 3. Çalışma sürecinde izlenen protokol

5.10.2. İntraserebroventriküler $A\beta_{1-42}$ uygulaması

AH modeli oluşturmak için sıçanların ağırlıkları tartıldı. Ardından anestaziye almak için 100 mg/kg ketamin + 1 mg/kg klorpromazin i.p. olarak uygulandı. Hayvanların baş kısmı traş

edildikten sonra stereotaksik cihazına (Narishige Scientific Instrument Lab) sabitlendi. Başlangıç noktası olarak stereotaksik cihazının iğnesi bregmaya sabitlendi. Enjeksiyon bölgesi için koordinatlar, Paxinos ve Watson'ın Sıçan Beyni Stereotaktik Koordinatlar Atlası'nda (Paxinos ve Watson, 2006) verilen talimatlara uygun olarak belirlendi Ardından sağ ve sol yönde 1.5 mm, lambda yönünde 0.8 mm gidilerek delinecek noktalar belirlendi. Sonra matkap ile kemikteki işaretlenen noktalardan delikler açıldı. Beyin zarı delindikten sonra iki laterale 3.6 mm içeri girilerek Hamilton iğnesi ile 5µL Aβ₁₋₄₂ 1 µL/dk olacak şekilde uygulandı. Uygulama sonrası delikler kapatıldı ve cerrahi dikiş atılarak hayvanlar tekli kafese alınarak sıcak ortama alındı. Kontrol grubu hayvanlara aynı hacimde PBS verildi (Prakash ve ark., 2013).

5.10.3. Davranış testleri

5.10.3.1. Açık alan testi

Açık alan testi, deney hayvanlarında lokomotor aktiviteyi değerlendirmek için uygulandı. Test aparatı, hayvanların daha önce görmediği kare tabanlı Pleksiglass materyalden yapılmış üstü açık siyah yüzeyli bir kutudur (50*50*40 cm). Zemin her biri 10*10 cm olan 25 eşit kareye bölünmüştür ve iki bölgeden oluşmaktadır: Çevresel bölge (kutu duvarlarından içeriye doğru birer karelik kısım, 16 kare) ve merkez bölge (kutunun ortasındaki 9 karelik kısım). Her hayvan kutunun içine test için ayrı ayrı alındı. Test 5 dakika süreyle uygulandı ve bir diğer hayvan teste alınmadan önce kutunun yüzeyi etanol ile temizlendi. Hayvanların kutu içindeki davranışları video kamera (Canon EOS 250D, Japonya) ile kaydedildi ve katedilen mesafe ve şahlanma sayısı değerlendirildi. Geçilen karelerin sayısı, katedilen mesafe olarak değerlendirildi ve şahlanma sayısı ile beraber lokomotor aktivitenin bir ölçüsü olarak kabul edildi (Abdel-Aal ve ark., 2011).

5.10.3.2. Morris'in su tankı testi

Su havuzu, paslanmaz çelikten üretilen bir tanktır. Dairesel olan bu tankın çapı 160 cm, yüksekliği ise 35 cm'dir. Testi gerçekleştirmek için tank 4 sabit noktadan 4 kadran oluşturacak şekilde bölündü. Bu havuz içerisinde havuzla aynı renkte (görüntüyle ilgili herhangi bir yanlış pozitif sonucu elimine etmek için) 10x10x10 cm ölçülerinde bir kaçış platformu yerleştirildi. Bu platform çalışma boyunca havuzun sabit bir kadranında ve su yüzeyinin 1,5 cm altında tutuldu. Sıçanlar yüzleri duvara bakar bir halde kaçış alanı bulunmayan bir kadranın kenarında

bir başlangıç noktasına yavaşça bırakıldı. 75 saniye içerisinde kaçış platformunu bulamayan sıçanlar kibarca platforma yönlendirildi ve 20 saniye boyunca üzerinde kalmasına izin verildi. Hayvanlara 4 ardışık gün boyunca 10'ar dakika ayırarak 4 deneme yapıldı ve bu süre zarfında platforma ulaşmak için geçen süre not edildi. Prob günü kaçış platformu çıkarıldı ve hayvanlar çalışmayı sonlandırmadan önce 60 saniye boyunca serbest bir şekilde yüzmeye bırakıldı. Bu prob çalışmasında hayvanın hedef kadrana ulaşma süresi ve hedef kadranda geçirdiği süre hesaplandı. Bu test uzaysal öğrenme ve hafızanın bir ölçüsü olarak kabul edildi, görüntüler kamera (Canon EOS 250D, Japonya) ile kayıt altına alındı (Abdel-Aal ve ark., 2011).

5.10.3.3. Pasif sakınma testi

Aparat üzerinde aralarında geçiş kapısı bulunan bir duvarla ayrılmış aydınlık ve karanlık olmak üzere iki farklı bölmeden oluşmaktadır. İki bölmenin de ayrıtları 20x25x30 cm'dir. Bölmelerden biri ışık yardımıyla aydınlık tutulmaktadır. Test kazanma ve sakınma olmak üzere 2 ardışık gün uygulandı. Kazanma deneyinde, her bir sıçan tek tek ışıklı bölmeye yerleştirilecek ve karanlık bölmeye geçtiğinde ızgara zemini üzerinden ayaklarına elektrik şoku uygulandı. Ardından sıçan bölmeden alınarak kafesine geri konuldu. Sakınma deneyi 24 saat sonra gerçekleştirildi. Sıçanlar yine ışıklı bölmeye konuldu. Işıklı bölmeye konduktan sonra karanlık bölmeye geçiş süresi kaydedildi. 300 saniye içerisinde karanlık bölmeye geçmeyen hayvanların deneyi sona erdirildi ve geçiş süresi 300 saniye kabul edildi (Abdel-Aal ve ark., 2011).

5.10.3.4. Yeni obje tanıma testi

Siyah pleksiglastan (50x50x30 cm³) yapılan bir düzenekte, yarı karanlık bir ortamda gerçekleştirilen yeni obje tanıma testi için hayvanlara alıştırmaya yapıldı. Test, her hayvanın 60 dakika arayla 3 dakika boyunca düzeneğe yerleştirilmesiyle gerçekleşti. İlk aşamada, hayvanlar aynı iki nesneyi tanımaya çalıştılar. Ardından, 60 dakika sonra aynı hayvanlar tekrar düzeneğe alındı ve bir nesne değiştirildi. Her iki aşama, kamera ile kaydedilerek hayvanların yeni nesneye olan ilgisi, eski nesneye olan ilgiyle karşılaştırıldı. Bu, hayvanların öğrenme ve bellek fonksiyonlarının bir göstergesi olarak kabul edildi. Değerlendirme: Sıçanların yeni ve eski obje tanıma testi, hayvanın burnunun nesneden en fazla 2 cm'lik uzaklıkta bir bölgede olması olarak tanımlandı. Her iki aşamada da kamera sistemi kullanılarak hayvanların her iki nesneye olan ilgisi kaydedildi. Bu kayıtlar temelinde, aşağıdaki formüller kullanılarak fark indeksi ve tercih indeksi hesaplandı (Aykaç ve ark., 2019).

Fark İndeksi: $(Z_y - Z_e) / (Z_y + Z_e)$

Tercih İndeksi: $Z_y / (Z_y + Z_e)$

5.11. Alınan Doku Örneklerinde Yapılan Analizler

5.11.1. Beyinden alınan dokularda A β ₁₋₄₂ düzeyinin ELISA ile ölçülmesi

Beyin homojenatları elde etmek için iki aşamalı bir protokol kullanıldı. Serebellum haricindeki bir yarım küre, proteaz inhibitörlerini içeren lizis tamponunda (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 50 mM NaCl, 2 mM EDTA) homojeni edildi. Elde edilen homojenat, %2 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) içinde süspansiyon haline getirildi. Ardından 4 °C'de, 12.000 rpm'de 1 saat santrifüjlendi ve süpernatantlar toplandı. Daha sonra, süpernatantlar guanidin tamponu içine yerleştirildi ve tekrar santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar çözünmez A β fraksiyonunu oluşturdu. Çözünür ve çözünmez A β ₁₋₄₂ seviyeleri ELISA kitleri kullanılarak ölçüldü ve beyin doku ağırlığına göre standardize edildi (Huang ve ark., 2017).

5.11.2. Histolojik analizler

Dekapitasyon işlemi sonrasında elde edilen dokular seri şekilde serum fizyolojik ile yıkandı ve ardından %10 nötral tamponlu formalin içinde 72 saat boyunca bekletildi. Daha sonra dokular, %70, %90, %96 ve %100'lük alkol solüsyonlarından geçirilerek dehidre edildi. Dokular, 2x10 dakika boyunca ksilende tutularak şeffaflaştırıldı. Sonrasında, parafinde 60°C'lik bir etüvde gece boyunca bekletildi ve gömme cihazı kullanılarak kasetlere yerleştirildi. Genel morfolojik değerlendirme için parafin bloklardan yaklaşık 4 μ m kalınlığında kesitler alındı ve bu kesitlere Hematoksilin ve Eosin (H&E) boyası uygulandı. Beyin dokusu kesitleri, hipokampal ve korteks bölgeleri de dahil olmak üzere, LEICA DM 1000 ışık mikroskobu ile fotoğraflandı (Huang ve ark., 2016).

5.11.3. İmmünohistokimyasal analizler

Beyin dokusunun analizi için şu adımlar izlendi: İlk olarak, deney gruplarından alınan beyin dokusu örnekleri korteks ve hipokampus bölgelerine ayrıldı ve daha sonra β -amiloid ve Tau immünohistokimyası için kullanılmak üzere %10 nötral tamponlu formalin içinde 72 saat boyunca fikse edildi. Daha sonra, 4 μ m kalınlığında parafin kesitler hazırlandı ve bu kesitler 37°C'deki bir etüvde bir gece boyunca bekletildi. Kesitlerin parafin içeriğini çıkarmak için 3x5 dakika ksilende tutulup, ardından %96'lık alkolde yıkanarak endojen enzimleri engellemek

amacıyla %3'lük hidrojen peroksit içinde 20 dakika bekletildi. Antijen geri kazanımını sağlamak için ısıtılmış sitrat tampon kullanıldı (pH 6.0, 60°C'de) ve kesitler mikrodalga ile işlem gördü. Kesitler PBS ile yıkandıktan sonra bloklama solüsyonunda 10 dakika bekletildi. Sonrasında, serebral korteks ve hipokampus kesitleri anti- β -amiloid ve anti-Tau primer antikolar ile inkübe edildi; negatif kontrol için bazı kesitler ise yalnızca PBS ile işlem gördü. Daha sonra, biyotinlenmiş sekonder antikolar ve streptavidin-peroksidaz konjugatları ile inkübe edildi. Kesitler tekrar PBS ile yıkandı, sıvı diaminobenzidin (DAB) kullanılarak belirginleştirildi ve hematoksin ile zıt boyama yapıldı. Son olarak, her iki primer antikorun ekspresyonu, ışık mikroskopu kullanılarak 100 μ m ölçekte belgelenmiştir (Gocmez ve ark., 2019).

5.11.4. Konfokal görüntüleme

Parafin bloklardan yaklaşık 4 μ m kalınlığında alınan kesitlere deparafinizasyon işlemi (60 0C etüvde ve sonrasında ksilende bekletme) yapıldı. Kesitler daha sonra %96 alkol'den 20'şer dakika olmak üzere 2 kere geçirilerek dehidrate edildi. Kurutulduktan sonra DAPI ile kapatılarak konfokal mikroskobunda (LEICA DMI8) görüntü alındı.

5.12. İstatiksel Değerlendirme

Ölçümler sonucu elde edilen verilerin istatistik analizleri GraphPad Prism 9 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Analiz sonuçları ortalama \pm standart sapma olarak verildi, gruplar arası değerlendirmeler tek yönlü ve iki yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Bonferroni post hoc testi kullanılarak yapıldı. $p < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. *In Vitro* Antioksidan Aktivite Sonuçları

6.1.1. DPPH radikali süpürücü aktivite tayini

Numunelerden elde edilen SGV ve SLL ekstrelerin serbest radikal süpürücü aktiviteleri, DPPH yöntemi kullanılarak belirlendi. Numunelerin ve standart olarak kullanılan askorbik asidin antioksidan aktiviteleri, IC₅₀ değerlerini karşılaştırarak değerlendirildi. Aktivite sonuçları Tablo 5'te verildi. Bulgulara göre, SGV bitkisi daha güçlü DPPH radikal temizleme aktivitesi sergiledi. Ancak, her iki ekstre de askorbik asitden daha düşük radikal temizleme aktivitesi gösterdi.

Tablo 5. SGV ve SLL ekstrelerinin DPPH radikali süpürücü aktiviteleri

Ekstreler	DPPH (IC ₅₀ : mg/mL)
SGV	0,023±0,005
SLL	0,070±0,004
Askorbik asit	0,004± 0,001

SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *Viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., DPPH: 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil. Veriler, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

6.1.2. FRAP tayini

Çalışmanın sonuçlarına göre, elde edilen FRAP değerleri karşılaştırıldığında, SGV ekstresinin SLL ekstresinden daha güçlü bir demir (III) iyonu indirgeme potansiyeline sahip olduğu gözlemlendi, ancak her iki bitki de BHA bileşiğinden daha düşük FRAP değerleri gösterdi. Aktivite sonuçları Tablo 6'da verildi.

Tablo 6. SGV ve SLL ekstrelerinin FRAP değerleri

Ekstreler	FRAP (mM FeSO ₄ /mg ekstre)
SGV	1,07± 0,18
SLL	0,62± 0,14
BHA	5,81 ± 0,01

SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *Viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., BHA: Butilhidroksianisol. FRAP: Demir indirgeme antioksidan gücü. Veriler, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

6.1.3. CUPRAC tayini

SGV ve SLL ekstralarının bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasiteleri incelendi ve sonuçlar Tablo 7'de sunuldu. Elde edilen verilere göre, SGV ekstresinin SLL ekstresine göre Cu(II)'yi Cu(I)'e indirgeme potansiyelinin daha güçlü olduğu belirlendi. Ancak, her iki ekstre de askorbik asitten daha düşük indirgeme gücü gösterdi.

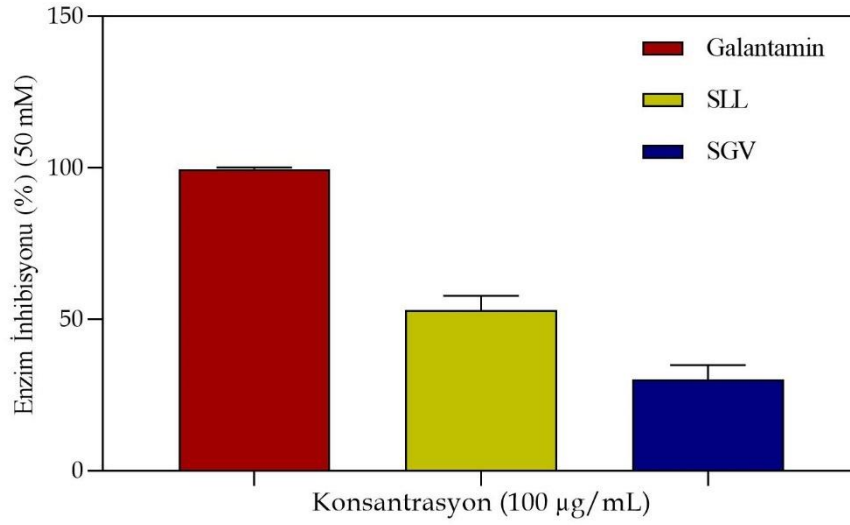
Tablo 7. SGV ve SLL ekstralarının CUPRAC değerleri

Ekstreler	CUPRAC (mM troloks eşdeğeri/mg ekstre)
SGV	2,99± 0,04
SLL	2,75±0,09
Askorbik asit	5,68±0,34

SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *Viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., CUPRAC: Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite. Veriler, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

6.2. *In Vitro* Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

SGV ve SLL ekstralarının AChE enzim inhibisyon yüzdeleri, Ellman yöntemi kullanılarak araştırıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4'te gösterildi. SGV ve SLL ekstraları AChE'ye karşı kıyaslandığında orta derecede inhibisyon aktivitesi sergiledi. Ekstreler birbirleriyle karşılaştırıldığında ise, SLL ekstresinin SGV ekstresine göre daha yüksek bir enzim inhibisyon değeri sergilediği belirlendi. Her iki bitki ekstresi de inhibe edici etkiye sahip olmalarına rağmen, referans bileşiği olan galantaminin AChE aktivitesinden daha düşük bir aktivite gösterdi.



Şekil 4. Bitkilerden elde edilen ekstraların antikolinesteraz aktiviteleri. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *Viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm. Veriler, ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

6.3. Üretilen NP'lerin Fizikokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi

6.3.1. Zeta potansiyeli (ζ), NP'lerin parçacık boyutu ve polidispersi indeksi (PDI) ölçümü

NP'lerin parçacık boyutu, zeta (ζ) potansiyeli, polidispersite indeksi ölçülmüştür ve sonuçlar Tablo 8'de gösterilmiştir. SGV ve SLL NP'lerin boyutu sırasıyla 178 \pm 1 nm ve 198 \pm 2 nm olarak ölçülmüştür. SGV ve SLL NP'lerinin ζ potansiyel değeri sırasıyla 1,23 \pm 0,03 mV ve 1,29 \pm 0,02 mV olarak ölçülmüştür. Ayrıca NP'lerin PDI değeri 0,293 \pm 0,05 ve 0,308 \pm 0,04 bulunmuştur. Her ölçüm üç kez tekrarlanmıştır.

Tablo 8. SLL ve SGV yüklü NP'lerin ζ potansiyeli, partikül boyutu ve polidispersi indeksi (PDI) değerleri

Örnekler	ζ potansiyeli (mV) \pm SD	Size (nm) \pm SD	PDI \pm SD
SGV NP	1,23 \pm 0,03	178 \pm 1	0,29 \pm 0,05
SLL NP	1,29 \pm 0,02	198 \pm 2	0,31 \pm 0,04

SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *Viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: Nanopartikül. Veriler, ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

6.3.2. İlaç enkapsülleme verimliliği (EE) ve yükleme kapasitesinin (LC) değerlendirilmesi

EE oranı, PLGA/PEG NP'lere yüklenmiş SGV ve SLL miktarını gösterir. Enkapsülenmiş SGV ve SLL'nin NP'lere oranı hesaplanmıştır ve sonuçlar Tablo 9'da gösterilmiştir. Sonuçlar, SGV ve SLL içeren NP'lerin EE değerinin %79,2±0.1 ve 77,7±0.1 olarak hesaplandığını göstermiştir. Ayrıca PLGA/PEG NP'lerinin LC'si %9,37±0,03 ve %8,88±0,04 olarak ölçülmüştür.

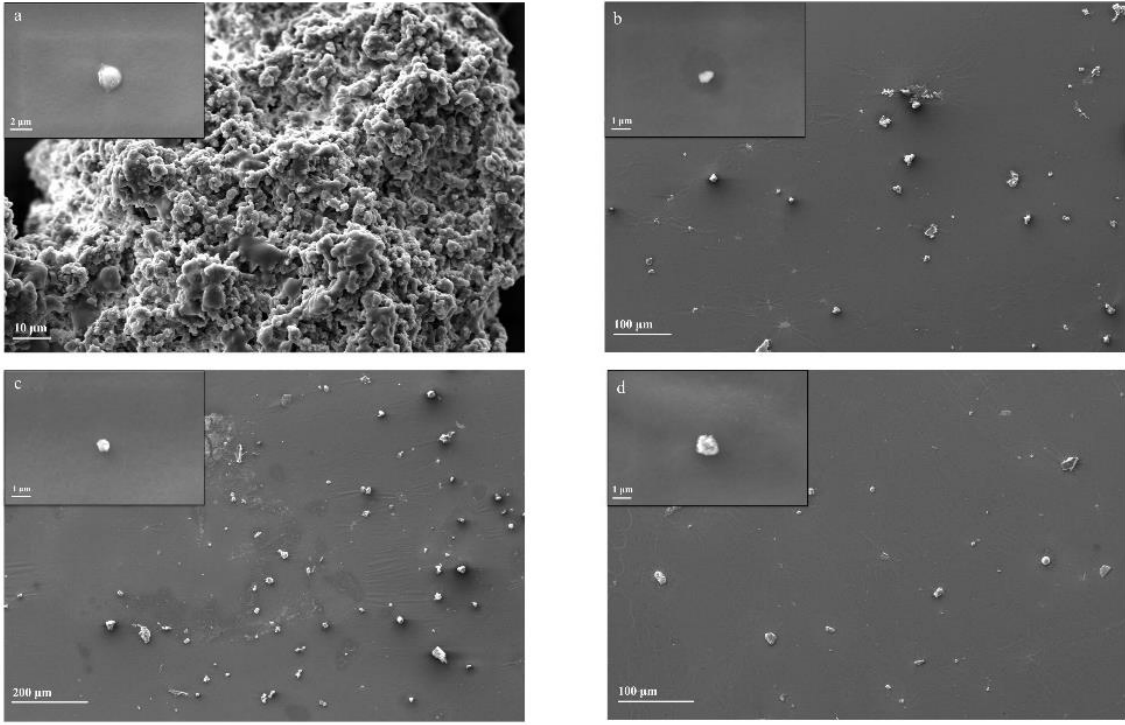
Tablo 9. SGV ve SLL yüklü NP'lerin EE ve LC'si

Parametre	SGV NP	SLL NP
Doğrusal Denklem	$y=0,0166 x \pm 0,0268$	$y=0,0166 x \pm 0,0302$
Eğim±SD	0,0166±0,0014	0,0166±0,0012
Intercept (Kesen)	0,0268±0,0012	0,0302±0,0009
R ²	0,9755	0,9869
% EE	79,2±0,1	77,7±0,1
% LC	9,37±0,1	8,88±0,1

SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *Viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: Nanopartikül, EE: Enkapsülleme verimliliği, LC: Yükleme kapasitesi. Veriler, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

6.3.3. NP'lerin morfolojisinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile analizi

Nanoçöktürme yöntemiyle üretilen NP'lerin yüzey morfolojisi SEM ile incelendi. 1 µm ile 200 µm arasındaki mesafeden alınan görüntülerde Boş PLGA-PEG NP, SGV NP, SLL NP ve SGV/SLL NP'lerin nanografikleri sırasıyla Şekil 5a, Şekil 5b, Şekil 5c ve Şekil 5d'de gösterildi. NP'lerin boyutları 200 nm'den küçük olduğu için iyi bir şekilde dağıldıkları gözlemlendi. Bu SEM nanografikleri, üretilen NP'lerin küresel şekilde, homojen ve standart boyutta olduğunu gösterdi.

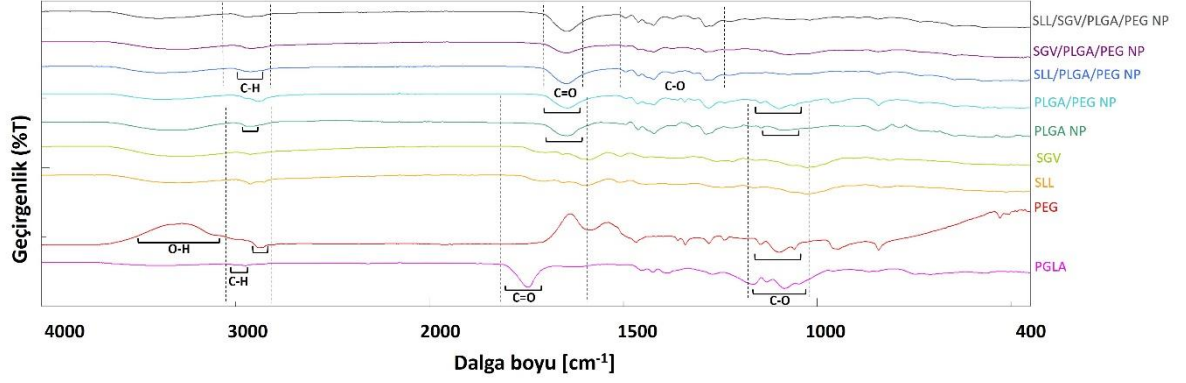


Şekil 5. NP'lerin morfolojisinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile analizi. (a) Boş PLGA-PEG NP, (b) SGV NP, (c) SLL NP ve (d) SGV/SLL NP. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *Viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: nanopartikül, PLGA: poli (laktik-ko-glikolik asit), PEG: polietilen glikol.

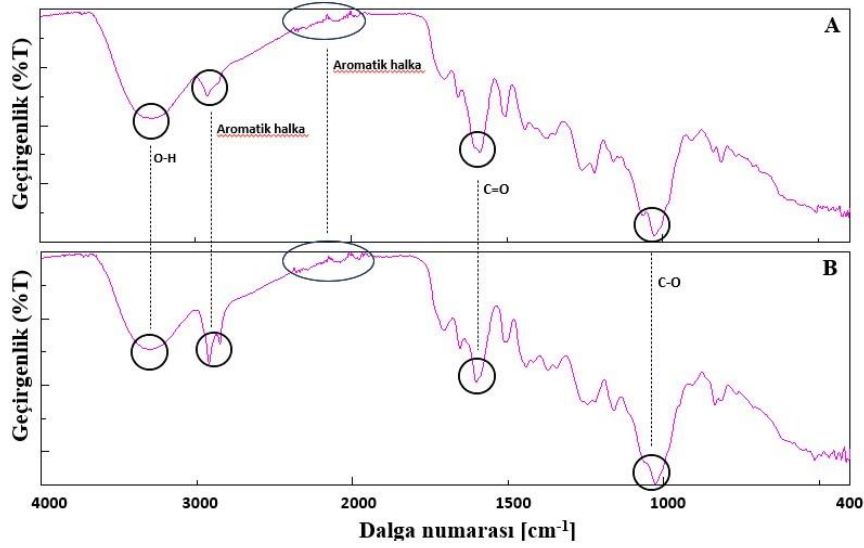
6.3.4. Ekstre ve NP'lerin Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopu (FTIR) ile analizi

Üretilen NP'lerin moleküler yapısı, FTIR ile incelendi (Şekil 6, Şekil 7). Yapılan analizlere göre, saf PGLA ve PEG spektrumlarına ait karakteristik pikleri 3300 cm^{-1} 'de geniş bir pik, 3000 cm^{-1} civarında küçük sinyaller ve $1100\text{-}1342\text{ cm}^{-1}$ aralığında çoklu pik, sırasıyla PEG'nin hidroksil, alkil ve C-O gruplarına karşılık geldi. PLGA'nın alkil, karbonil ve ester gruplarına karşılık gelen 3000 cm^{-1} 'de çiftler, 1750 cm^{-1} 'de merkezlenmiş keskin bir pik ve $1100\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ aralığında bir dizi pik ile tespit edildi. Bu gruplar PLGA NP spektrumunda da sol tarafa doğru hafif bir kayma ile gözlemlendi. PLGA/PEG NP spektrumu, kullanılan polimerlerin her birine ait belirli pik noktalarını göstermektedir. C-O gerilme pikinin çoklu noktaları PEG'den kaynaklanırken, karbonil grubundan kaynaklanan keskin pik PLGA tarafından oluşturuldu. 2921 cm^{-1} 'de bulunan ve yan pikler ile 2000 cm^{-1} civarında overton bantlarıyla bağlantılı olan nispeten keskin bir pik, C-H gerilme pikini ve aromatik halkaların overtonlarını temsil etti. Karbonil grubu, 1600 ve 1100 cm^{-1} civarında iki yoğun pik ile tespit edildi. Saf PLGA/PEG NP

spektrumu ile karşılaştırıldığında, ekstre yüklü PLGA/PEG NP spektrumlarında benzer değişiklikler gözlemlendi.



Şekil 6. NP'lerin moleküler yapısının Fourier dönüştürülmü kızılötesi spektroskopu (FTIR) ile analizi. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *Viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: nanopartikül, PLGA: poli (laktik-ko-glikolik asit), PEG: polietilen glikol.

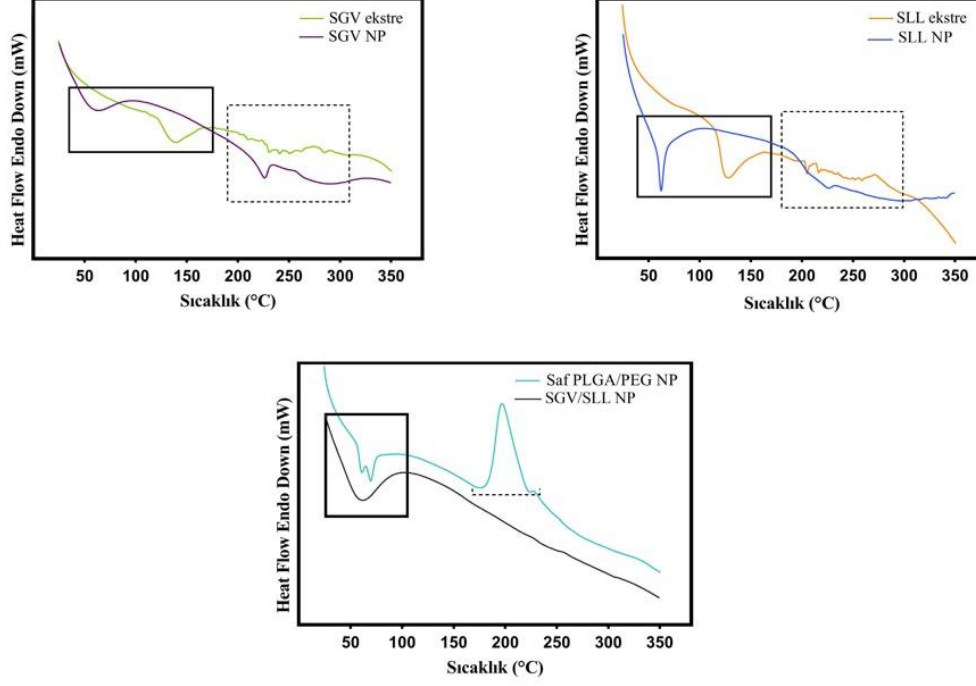


Şekil 7. SGV (A) ve SLL (B) ekstralarının moleküler yapısının Fourier dönüştürülmü kızılötesi spektroskopu (FTIR) ile analizi. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *Viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm.

6.3.5. Ekstre ve NP'lerin diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ile analizi

Kullanılan ekstraların ve üretilen NP'lerin termal analizleri DSC cihazı yardımıyla yapıldı (Şekil 8). Saf PLGA/PEG NP termogramının (Şekil 8) önemli noktaları, 68.5 ve 72.1 °C'de bulunan hafif iki kollu endotermik pik ve 199.5 °C'de ekzotermik pik görüldü. PLGA'nın 55 °C civarında camsı geçiş sıcaklığı (T_g) mevcuttur ve PEG, 66 °C'de erimiştir. Her iki ekstre

termogramında üretilen geniş endotermik pik, sırasıyla 133.83 ve 145.64 °C’de yoğunlaşan erime noktalarına karşılık geldi. SGV/SLL NP termogramında erime noktaları azaldı. Ayrıca SGV ekstresinin 208 °C’de, SLL ekstresinin de 294 °C’de endotermik pikleri tespit edildi. NP formlarında ise bu pikler camsı geçişe benzer bir pikle değişti.

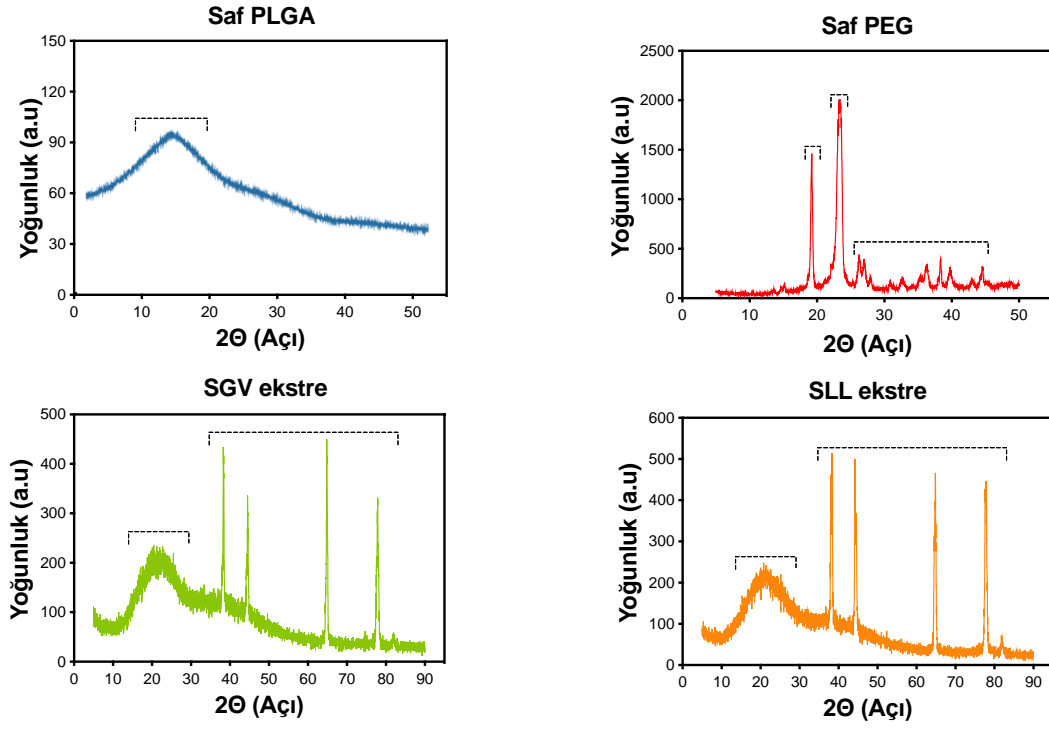


Şekil 8. Ekstrelerinin ve NP’lerin diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ile analizi. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *Viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: nanopartikül, PLGA: poli (laktik-ko-glikolik asit), PEG: polietilen glikol.

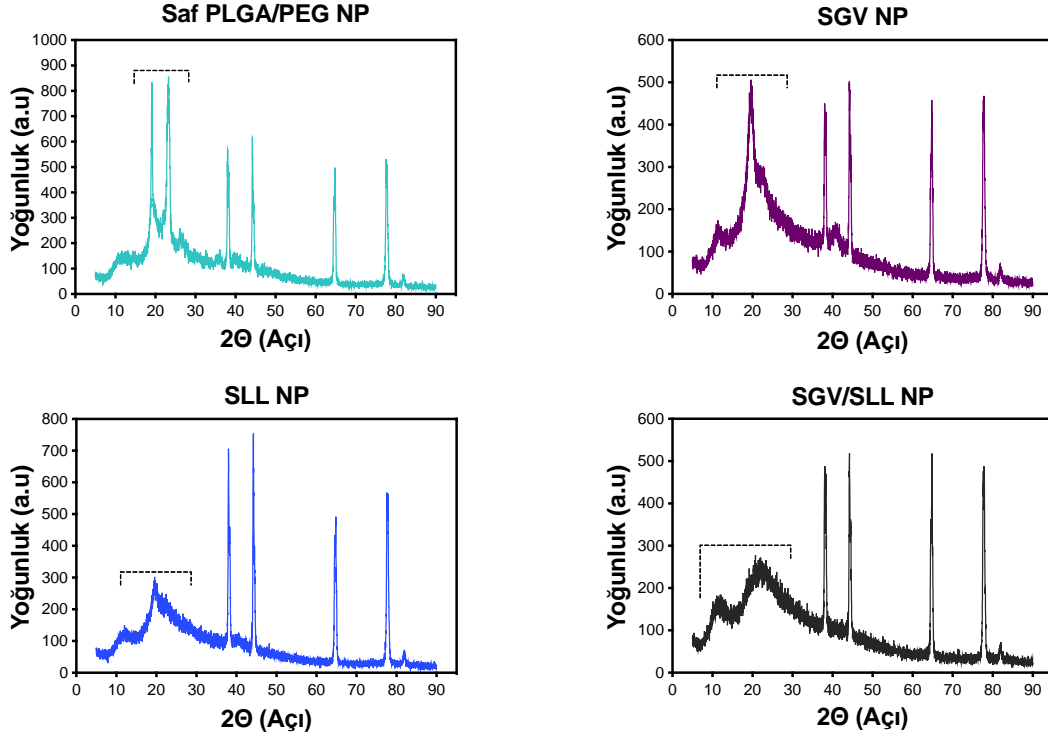
6.3.6. Ekstre ve NP’lerin X ışını toz kırınımı (XRD) ile analizi

Kullanılan ekstrelerin ve üretilen NP’lerin kristal yapısı XRD cihazı yardımıyla aydınlatıldı (Şekil 9, Şekil 10). Saf PLGA, amorf yapısını belirten $2\theta = 20^\circ$ civarında kubbe şeklinde bir pik sergiledi. Saf PEG’de ise kristalin üç boyutlu düzenini gösteren $2\theta = 19.26^\circ$ ve 23.48° civarında iki keskin ana pik ile $2\theta = 27^\circ$ ile $2\theta = 45^\circ$ arasında değişen birkaç küçük pik sergiledi. PLGA/PEG NP’de, PLGA’nın kubbe şeklindeki pik noktası, PEG’in ana pikine karıştı ve görünümünü hafifçe değişti. Öte yandan, PEG’in ana pik keskinliği, PLGA ile karıştıktan sonra azaldı. Her iki ekstrede de fark edilen keskin piklerin bulunduğu bölgeler tespit edildi. Ayrıca $2\theta = 23^\circ$ civarında geniş bir pik görüldü. Enkapsülleme sonrası, bu amorf tepe, PLGA/PEG NP’nin yüksek kristalizasyonu tarafından teşvik edilen yarı kristalin bir hale dönüştü. İlginç bir şekilde, SGV/SLL yüklü NP $2\theta = 10^\circ$ ile $2\theta = 30^\circ$ arasında yer alan iki farklı kubbe şeklinde pik

noktası sergiledi. İki yarı amorf maddeyi aynı anda formülasyona dahil etmek, amorf durumu destekledi ve tam faz ayrımına neden oldu.



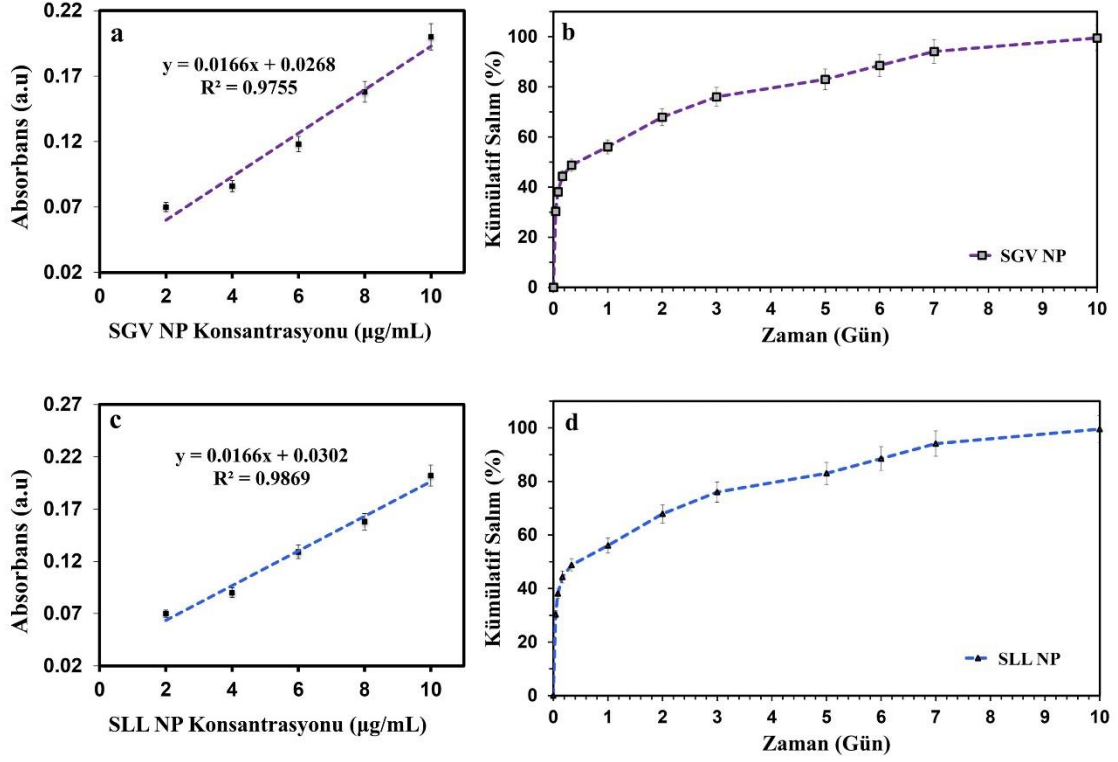
Şekil 9. Saf NP ve ekstrelerin X ışını toz kırınımı (XRD) ile analizi. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *Viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: nanopartikül, PLGA: poli (laktik-ko-glikolik asit), PEG: polietilen glikol.



Şekil 10. Polimer ve ekstre yüklü NP kompozitlerinin X ışını toz kırınımı (XRD) ile analizi. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *Viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: nanopartikül, PLGA: poli (laktik-ko-glikolik asit), PEG: polietilen glikol.

6.3.7. *In vitro* ilaç salım profili

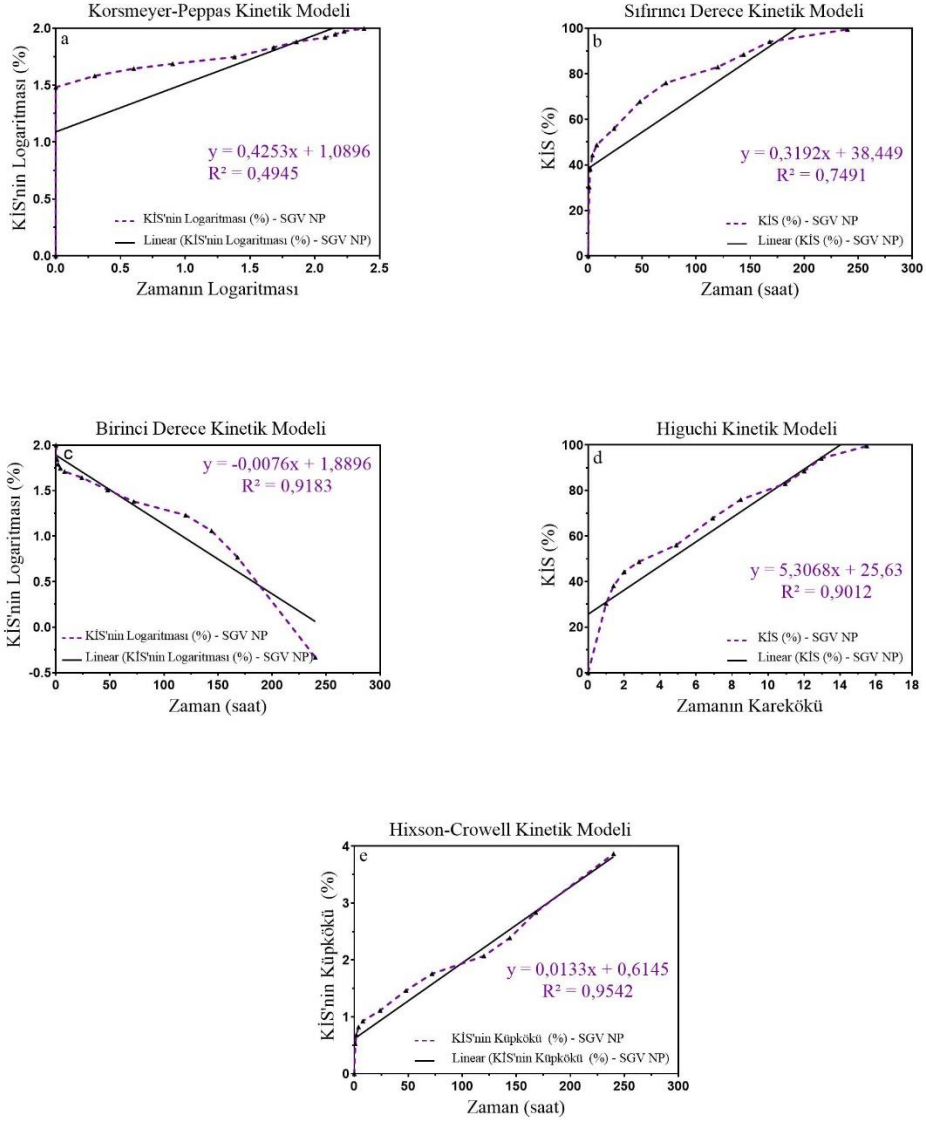
NP'lerden salınan ekstrelerin profilini çizebilmek için öncelikle SGV ve SLL ekstrelerinin 2, 4, 6, 8 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarında numuneleri hazırlandı ve belirlenen dalga boylarında (SGV: 204 nm, SLL: 206 nm) ölçümler yapıldı. Ardından iki ekstrenin de kalibrasyon eğrileri hazırlandı. (Şekil 11a-c). NP'lerden SGV NP ve SLL NP'nin salım profili, 240 saatlik bir süre boyunca değerlendirildi (Şekil 11b-d). Bu testte numuneler, 37°C'de PBS (pH 7,4) içinde konuldu ve çalkalayıcıda bekletildi. Belirli aralıklarla PBS'ten örnekler alındı. Sonrasında UV spektrofotometrede ekstrelerin belirlenen dalga boyunda NP'lerden salınan ekstre miktarı tespit edildi. NP'lerden SGV ve SLL'nin salım sonuçları, ilk 24 saat boyunca hızlı bir ilk salım (%50) ve ardından 120 saate kadar sürekli ve daha yavaş salım (%80) ile karakterize edilen kontrollü bir salım süreci gösterdi. NP'lerdeki SGV ve SLL'nin neredeyse tamamı (%99,5±0,4 ve %99,4±0,4) 240 saatte salındı.



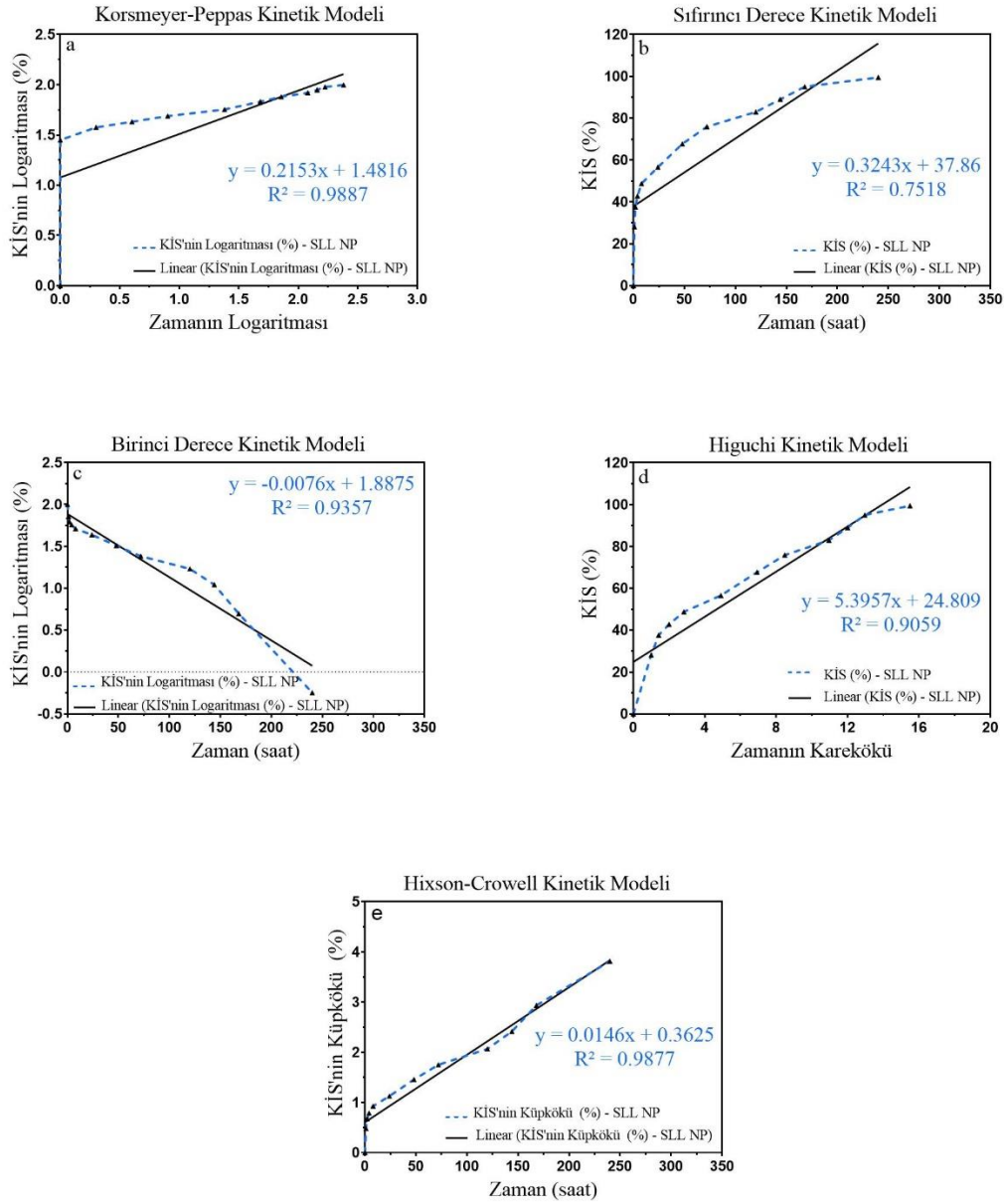
Şekil 11. Ekstre yüklü NP'lerin *in vitro* salım profili. (a) SGV NP kalibrasyon eğrisi, (b) SGV NP salım profili, (c) SLL NP kalibrasyon eğrisi, (d) SLL NP ilaç salım profili. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: Nanopartikül.

6.3.8. *In vitro* salım kinetiği

SGV ve SLL ekstrelerin NP'lerden salımının Korsmeyer-Peppas, sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi ve Hixson-Crowell kinetik modellerinden hangisine uygun olduğu Şekil 12 ve Şekil 13'te gösterilmiştir. Yapılan analizlerde R^2 değerleri SGV NP için sırasıyla 0,4945; 0,7491; 0,9183; 0,9012 ve 0,9542 iken SLL NP için sırasıyla 0,9887; 0,7518; 0,9357; 0,9059 ve 0,9877 bulunmuştur. Bu sonuçlara göre SGV NP'nin salımının 1'e en yakın değer olan Hixson-Crowell kinetik modeline göre, SLL NP'nin de Korsmeyer-Peppas kinetik modeline göre meydana geldiği tespit edilmiştir.



Şekil 12. SGV yüklü NP'lerin *in vitro* kinetik modellemeleri. (a) Korsmeyer-Peppas, (b) sıfıncı derece, (c) birinci derece, (d) Higuchi ve (e) Hixson-Crowell kinetik modelleri. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., KİS: Kontrollü ilaç salımı, NP: Nanopartikül.



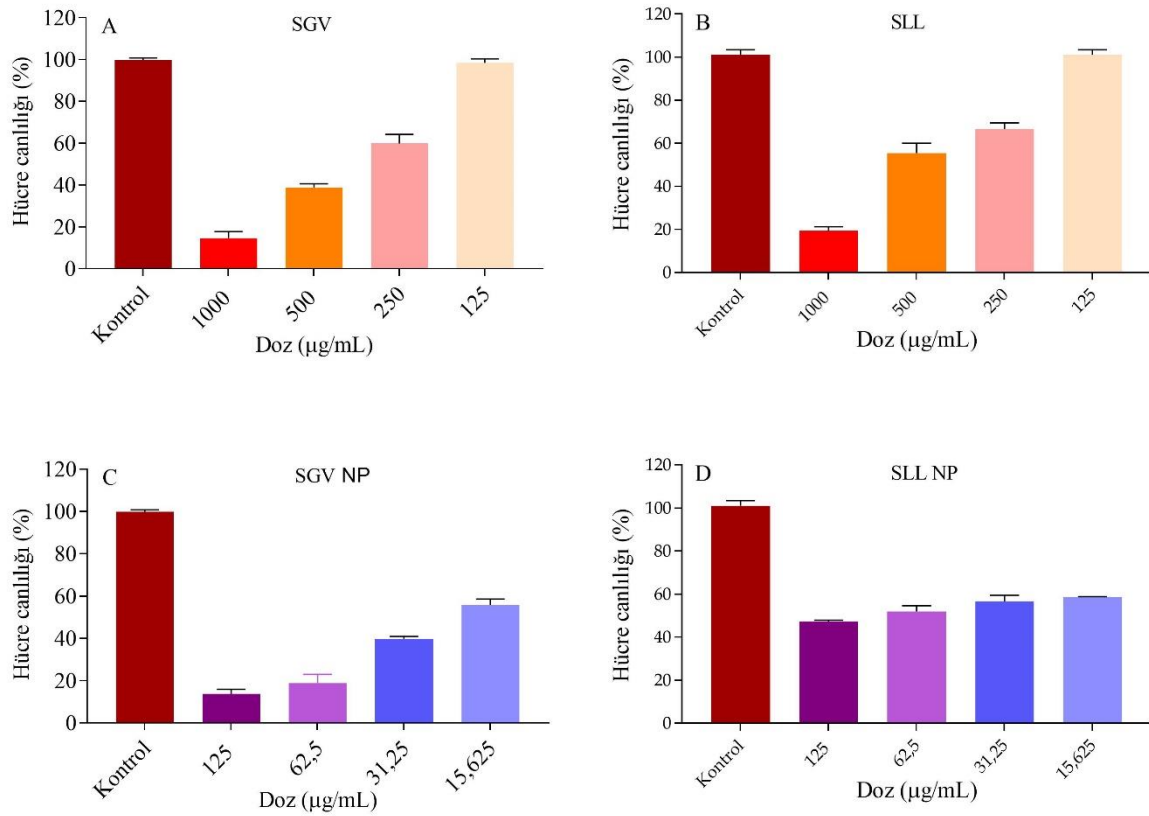
Şekil 13. SLL yüklü NP'lerin *in vitro* kinetik modellemeleri. (a) Korsmeyer-Peppas, (b) sıfırıncı derece, (c) birinci derece, (d) Higuchi ve (e) Hixson-Crowell kinetik modelleri. SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., KİS: Kontrollü ilaç salımı, NP: Nanopartikül.

6.4. *In Vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları Sonuçları

6.4.1. Hücre canlılığı analizi sonuçları

Bu tez çalışmasında, uygun doz olarak IC₅₀ değerleri kullanıldı. Bu dozları belirlemek amacıyla MTT analizi yapıldı. Ekstrelerin ve NP'lerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri doz bağımlı olarak incelendi. SGV ve SLL ekstralarının 24 saatte canlılıkları 1000 ; 500 ; 250 ve 125 µg/mL

dozlarında değerlendirildi ve canlılık oranları sırasıyla SGV için %14,7 ; %38,8 ; %59,9 ve %98,4 iken SLL için %19,3 ; %55,5 ; %66,6 ; %101,1 bulundu. SGV NP ve SLL NP'lerin canlılıkları 125 ; 62,5 ; 31,3 ve 15,6 µg/mL dozlarında değerlendirildi ve canlılık oranları sırasıyla SGV NP için %13,7 ; %18,8 ; %39,9 ve %55,8 iken SLL NP için %47,3 ; %51 ; %56,7 ; %58,5 bulundu (Şekil 14). Bu verilerin CompuSyn yazılımına girilmesi ile Dm (IC₅₀) değerleri SGV ekstresi için 302,4 µg/mL, SLL ekstresi için 607,8 µg/mL, SGV NP için 23,7 µg/mL ve SLL NP için 67 µg/mL olarak tespit edildi.

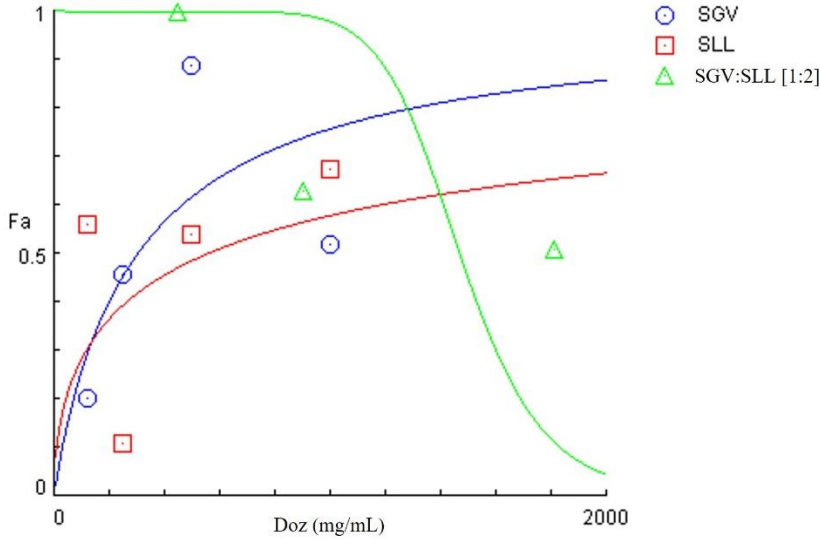


Şekil 14. Ekstre ve NP'lerin farklı konsantrasyonlarının doza bağımlı olarak hücre canlılığına etkisi. (A) SGV, (B) SLL, (C) SGV NP, (D) SLL NP. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: Nanopartikül.

6.4.2. Ekstrelerin kombine indekslerinin tespiti

Her iki ekstre için de MTT deneyi ile ayrı ayrı belirlenen Dm (IC₅₀) değerlerinin birbirine oranına göre her iki ekstrenin 24 saatte etkin dozları (~300 µg/mL/~600 µg/mL) olarak 1/2 oranında belirlendi. Bu orana göre kombinasyon için tekrar MTT analizi yapıldı ve sonuçlar

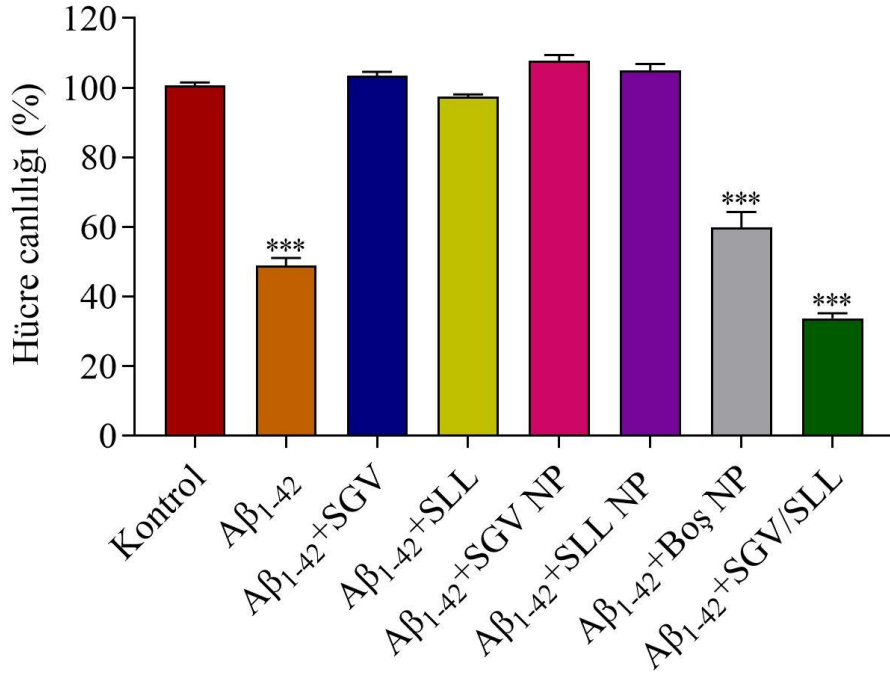
CompuSyn programına girildi. Sonuçların CompuSyn programına girilmesi ile CI değeri 3.38025 bulundu ve iki ekstrenin birlikte kullanılmasının antagonistik etkiye yol açacağı tespit edildi (Şekil 15).



Şekil 15. Ekstrelerin ve kombinasyonlarının doz-etki eğrisi. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., Fa: fraksiyonel etki.

6.4.3. SH-SY5Y hücrelerinde anti-Alzheimer etkinliğinin değerlendirilmesi

Ekstrelerin ve ekstre yüklü NP'lerin anti-Alzheimer etkinliğini incelemek için MTT analizi kullanıldı. AH modelini indüklemek amacıyla 5 μ M dozda $A\beta_{1-42}$ ile maruziyet yapıldı. Tedavi dozları olarak ekstrelerin ve NP'lerin belirlenen D_m değerleri kullanıldı. Boş NP uygulamasında NP'lerden düşük dozda olan D_m değeri (23,70 μ g/mL) tedavi dozu olarak seçildi. Tedavi gruplarının uygulanmasından 24 saat sonra MTT analizi yapıldı (Şekil 16). Hücre canlılığının yüzdesini belirlemek için $A\beta_{1-42}$ grubu ve diğer tedavi grupları $A\beta_{1-42}$ uygulaması yapılmayan kontrol grubuna göre kıyaslandı. Bu sonuçlara göre $A\beta_{1-42}$ grubu %49,7 ; $A\beta_{1-42}$ +SGV grubu %103,4 ; $A\beta_{1-42}$ +SLL grubu %97,4 ; $A\beta_{1-42}$ +SGV NP grubu 107,7 ; $A\beta_{1-42}$ +SLL NP grubu %105,1 ; $A\beta_{1-42}$ +Boş NP grubu %53,2 ve $A\beta_{1-42}$ +SGV/SLL grubu %33,7 canlılık gösterdi. Kontrol grubuna kıyasla $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{1-42}$ +Boş NP ve $A\beta_{1-42}$ +SGV/SLL gruplarının canlılıklarının anlamlı derecede düşüş görüldü ($p < 0.001$). Yapılan çalışma sonucunda ayrı ayrı NP'lere yüklenen ekstreler canlılığı artırırken, kombine kullanımda ise canlılık oranının düştüğü ve kombinasyon indeksi hesaplamalarına paralel bir sonuç verdiği gözlemlendi.

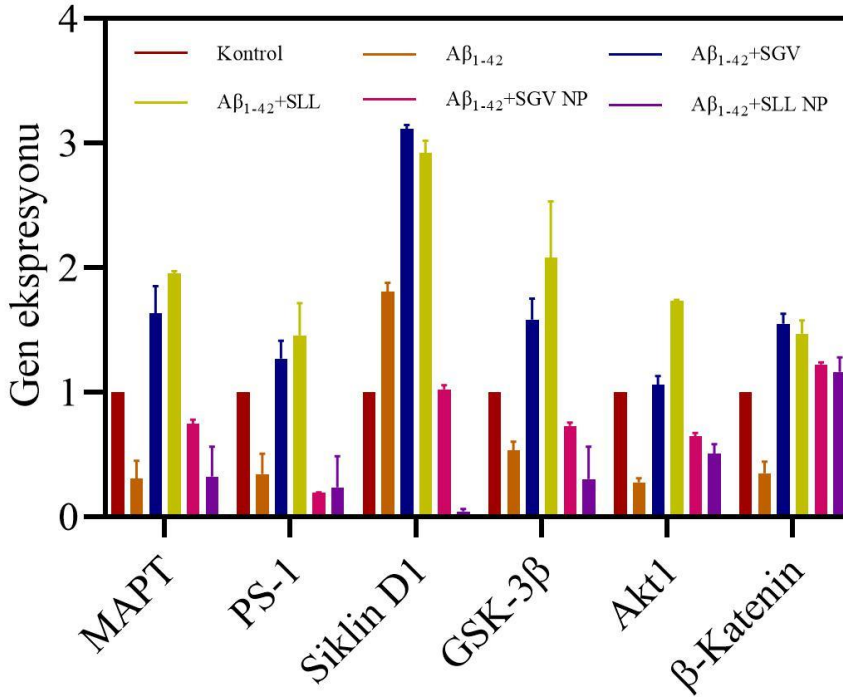


Şekil 16. SH-SY5Y hücrelerinde anti-Alzheimer etkinliğinin değerlendirilmesi. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: Nanopartikül, Aβ: Amiloid β. İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır. Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. *** p < 0.001

6.4.4. Gerçek zamanlı PCR sonuçlarının değerlendirilmesi

Bu tez çalışmasında ekstrelerin ve ekstre yüklü NP'lerin PI3K/AKT/GSK-3β ve Wnt/β-katenin yolları üzerindeki etkinliğini incelemek için SH-SY5Y hücre hattı kullanıldı. Hücre ekimini takip eden günde 5μM dozda Aβ₁₋₄₂ ile indükleme gerçekleştirildi ve 24 saat sonrasında tedavi gruplarının Dm (IC₅₀) dozları uygulandı. (SGV: 302,4 μg/mL, SLL :607,8 μg/mL, SGV NP: 23,7 μg/mL ve SLL NP: 67,1 μg/mL). Hücrelerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezinden sonra incelenen yollarla ilişkili olan 6 primer gen dizisi (MAPT, Presenilin 1, Siklin D1, GSK-3β, AKT-1 ve β-Katenin) ile yapılan gerçek zamanlı PCR analizi sonucunda Ct değerleri bulundu. Ct değerleri tespit edilen numunelerin kantitatif analizi 2^{-ΔΔCt} formülü kullanılarak yapıldı. Aβ₁₋₄₂ uygulaması yapılmayan kontrol grubu 1 birim kabul edildi ve sadece Aβ₁₋₄₂ uygulanan hastalık grubu ile tedavi grupları kontrol grubuna bölünerek kat değişimi değerleri elde edildi (Şekil 17). Elde edilen sonuçlara göre Aβ₁₋₄₂ grubunda MAPT 0,30 ; presenilin-1 0,34 ; GSK-3β 0,53 ; Akt1 0,27 ve β-Katenin 0,35 kat azalırken, siklin D1 1,81 kat artış gösterdi. Aβ₁₋₄₂ +SGV grubunda MAPT 1,63 ; presenilin-1 1,26 ; siklin D1 3,12 ; GSK-3β 1,58 ; Akt1 1,06 ve β-Katenin 1,55 kat artış gösterdi. Aβ₁₋₄₂ +SLL grubunda MAPT 1,95 ;

presenilin-1 1,45 ; siklin D1 2,92 ; GSK-3 β 2,08 ; Akt1 1,74 ve β -Katenin 1,47 kat artış gösterdi. A β_{1-42} +SGV NP grubunda MAPT 0,75 ; presenilin-1 0,19 ; GSK-3 β 0,73 ve Akt1 0,65 kat azalırken siklin D1 1,02 ve β -Katenin 1,22 kat artış gösterdi. A β_{1-42} +SLL NP grubunda MAPT 0,32 ; presenilin-1 0,23 ; GSK-3 β 0,30 ve Akt1 0,51 kat azalırken siklin D1 1,04 ve β -Katenin 1,16 kat artış gösterdi (Şekil 17).



Şekil 17. SH-SY5Y hücrelerinde MAPT, Presenilin 1, Siklin D1, GSK-3 β , AKT1 ve β -Katenin primerlerinin gen ekspresyonlarının değerlendirilmesi. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: Nanopartikül, A β : Amiloid β , PS-1: Presenilin-1.

6.5. Akut Toksikite Çalışmalarının Değerlendirilmesi

6.5.1. Mortalitenin değerlendirilmesi

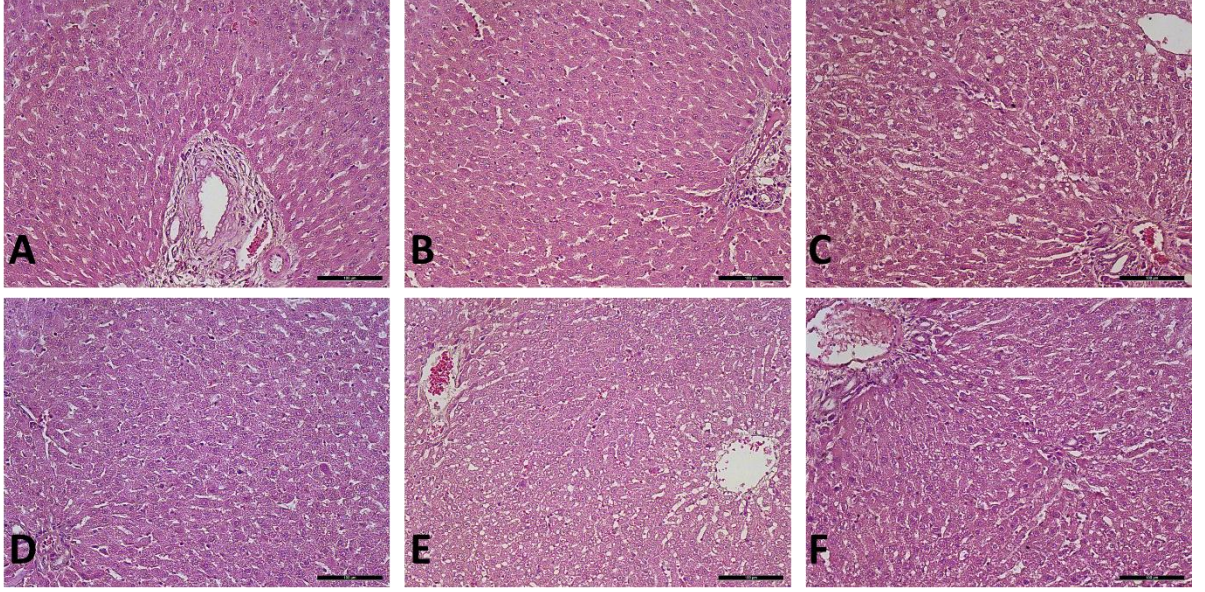
Ön çalışma ve ana çalışma sırasında herhangi bir ölüm görülmemiştir.

6.5.2. Klinik bulguların değerlendirilmesi

Ön çalışma ve ana çalışma sırasında sıçanlarda ağrı, ajitasyon, inleme, ciltte iritasyon gibi olumsuz olgular gözlemlenmedi. Hayvan gruplarının kilo değişimleri çevreye ilgileri, yem/su tüketimi ve dışkı formları normal olarak değerlendirildi.

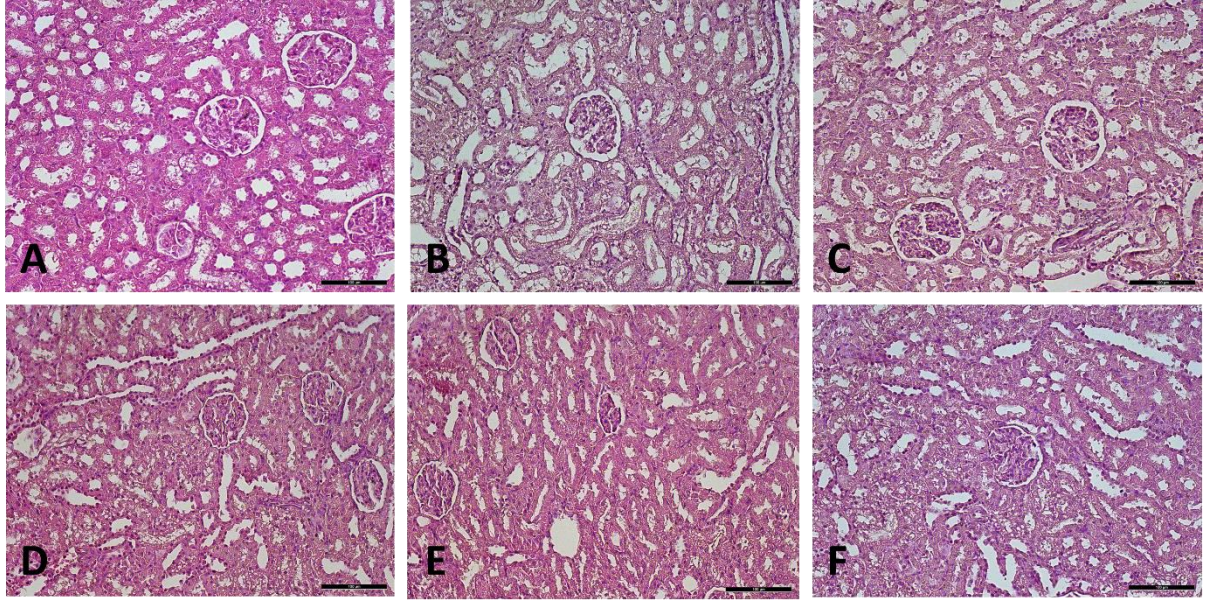
6.5.3. Histomorfolojik değerlendirme

Karaciğer, böbrek, dalak, akciğer, kalp ve olfaktor bulbus dokularında H&E boyaması yapılarak morfolojileri değerlendirildi. Karaciğer dokularının H&E boyaması, kontrol grubunda normal doku morfolojisi gösterdi. Tedavi gruplarına ait karaciğer dokularında belirgin hücresel dejenerasyon, sinüzoidal dilatasyon, inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ve sitoplazmik vakuolizasyon tespit edilmedi ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edilmedi (Şekil 18).



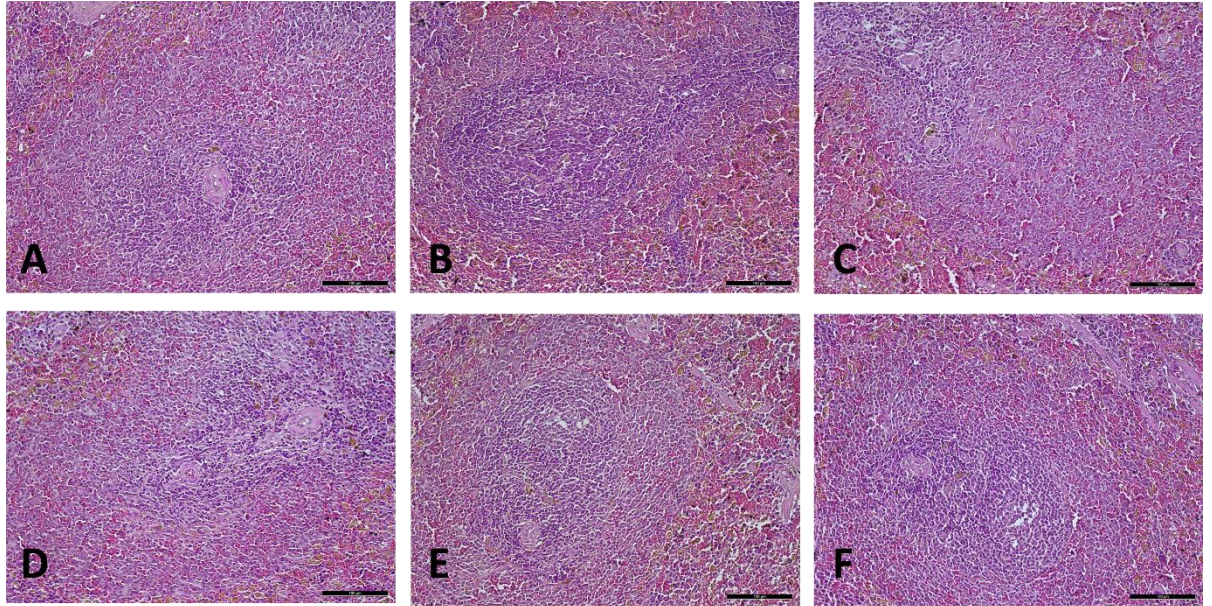
Şekil 18. Deney gruplarına ait H&E boyalı karaciğer dokularının fotomikrografları. A: Kontrol grubu, B: Boş NP grubu, C: SGV Ekstre grubu, D: SGV NP grubu. E: SLL Ekstre grubu, F: SLL NP grubu, Ölçek: 100 µm. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: Nanopartikül.

Kontrol grubundaki böbrek dokusu kesitlerinin H&E boyaması, kıvrımlı tübüllerin ve glomerülün genel bütünlüğünü ortaya çıkardı. Tedavi gruplarına ait böbrek dokularında vakuolizasyon, bazal membranın glomerüllerden ayrılması, nekroz, tübülo-interstisyel boşlukta artış ve tübüler dilatasyon gibi farklı histolojik değişiklikler tespit edilmedi (Şekil 19). Boş NP (Şekil 19B) gruplarında yer yer tübüller arası hemoraji gözlemlendi. Kontrol ile kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı histopatolojik fark gözlemlenmedi.



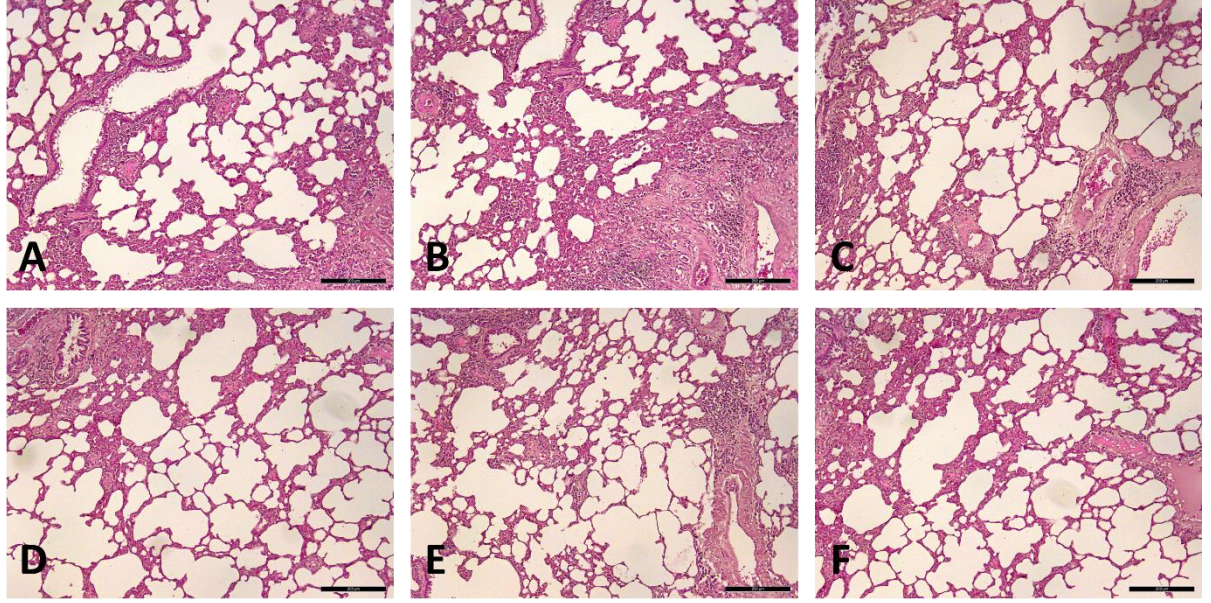
Şekil 19. Deney gruplarına ait H&E boyalı böbrek dokularının fotomikrografları. A: Kontrol grubu, B: Boş NP grubu, C: SGV Ekstre grubu, D: SGV NP grubu. E: SLL Ekstre grubu, F: SLL NP grubu, Ölçek: 100 µm. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: Nanopartikül.

Kontrol de dahil olmak üzere tüm gruplarda, dalakta normal kırmızı ve beyaz pulpalar gözlemlendi (Şekil 20).



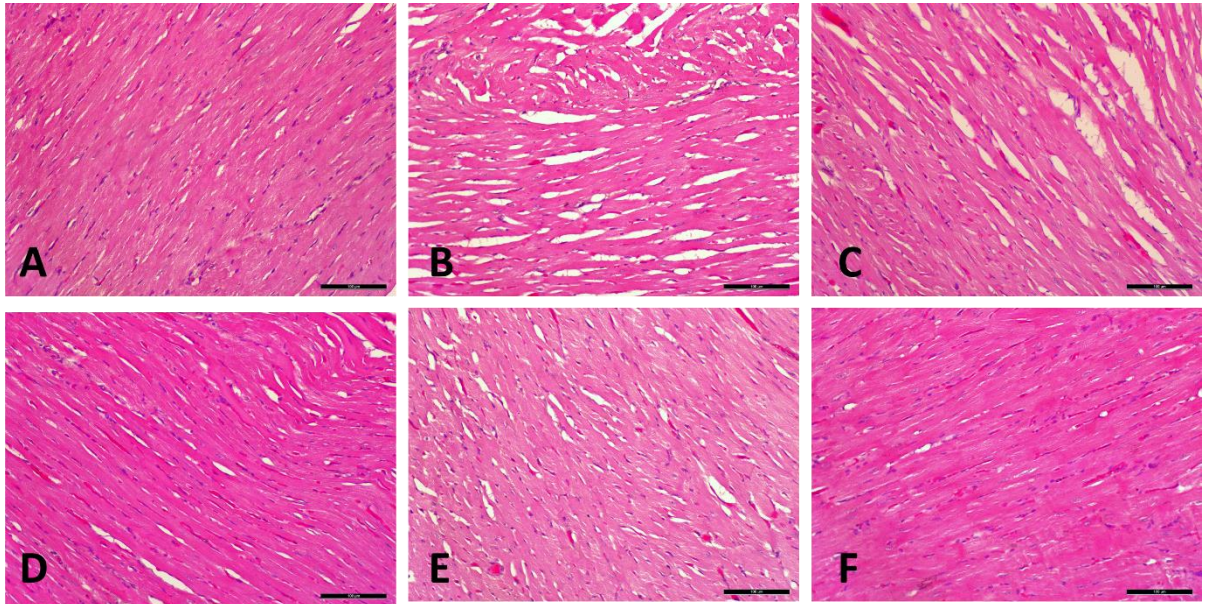
Şekil 20. Deney gruplarına ait H&E boyalı dalak dokularının fotomikrografları. A: Kontrol grubu, B: Boş NP grubu, C: SGV Ekstre grubu, D: SGV NP grubu. E: SLL Ekstre grubu, F: SLL NP grubu, Ölçek: 100 µm. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: Nanopartikül.

Akciğer dokularında tüm gruplar incelendi ve birbirleriyle kıyaslandı. İnceleme sonucunda hafif alveoler doku tıkanıklığı ve alveolar kalınlaşma fark edilmedi (Şekil 21).



Şekil 21. Deney gruplarına ait H&E boyalı akciğer dokularının fotomikrografları. A: Kontrol grubu, B: Boş NP grubu, C: SGV Ekstre grubu, D: SGV NP grubu. E: SLL Ekstre grubu, F: SLL NP grubu, Ölçek: 100 µm. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: Nanopartikül.

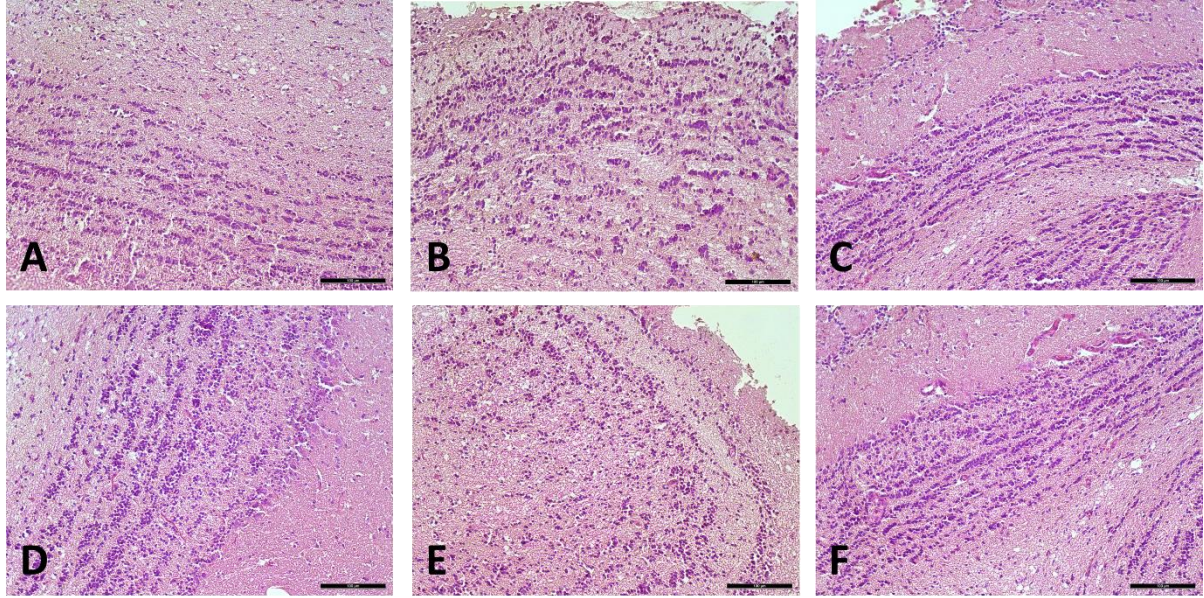
Kalp miyokardında tüm gruplar incelendi ve birbiriyle kıyaslandı. Dokularda tipik damar yapısına sahip normal kas hücrelerine sahip sağlam kas demetleri rapor edildi (Şekil 22).



Şekil 22. Deney gruplarına ait H&E boyalı kalp dokularının fotomikrografları. A: Kontrol grubu, B: Boş NP grubu, C: SGV Ekstre grubu, D: SGV NP grubu. E: SLL Ekstre grubu, F: SLL NP grubu, Ölçek: 100 µm. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: Nanopartikül.

Farklı deney gruplarından elde edilen olfaktor bulbus dokularına ait H&E ile boyanmış bölümleri, dışarıdan içeriye doğru altı iyi tanımlanmış katman gösterdi; koku alma siniri

katmanı, glomerüler katman, dış pleksiform katman, mitral hücre katmanı, iç pleksiform katman ve granüler hücre katmanı (Şekil 23). Hasar ve tedavi grupları incelendikten sonra, kontrol grubuyla aynı histolojik katmanları gösterdiler. Hücreler, sitoplazmik boşluklar, düzensizlik ve apoptoz gibi toksisite belirtileri olmadan normal göründü.

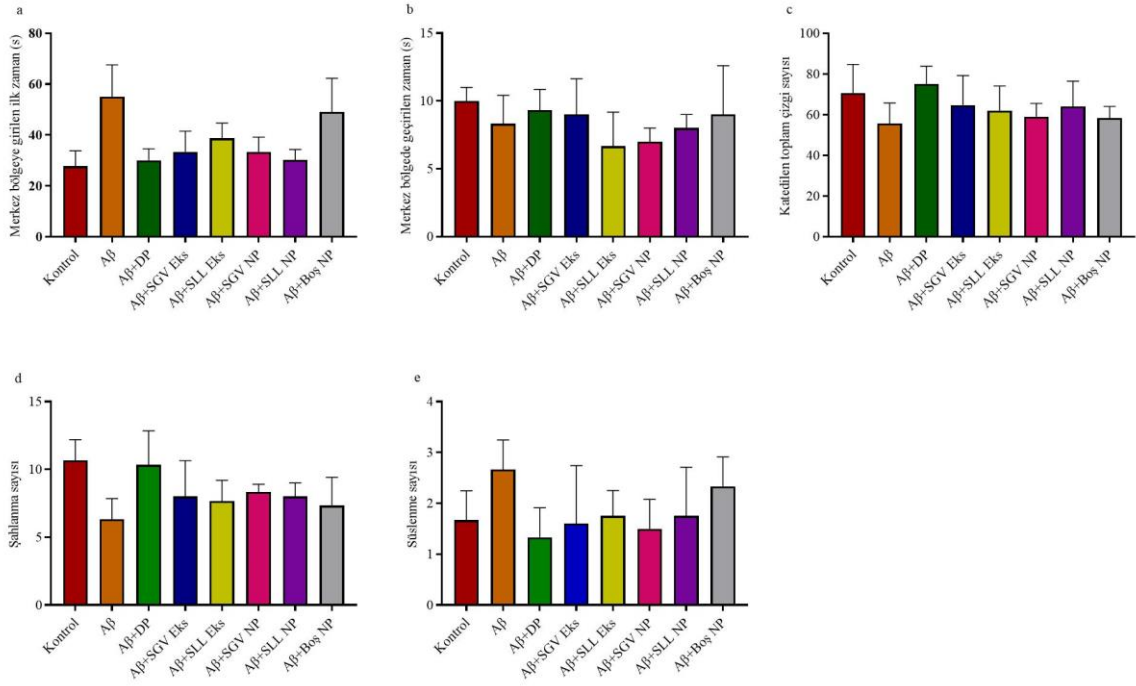


Şekil 23. Deney gruplarına ait H&E boyalı olfaktor bulbus dokularının fotomikrografları. A: Kontrol grubu, B: Boş NP grubu, C: SGV Ekstre grubu, D: SGV NP grubu. E: SLL Ekstre grubu, F: SLL NP grubu, Ölçek: 100 µm. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: Nanopartikül.

6.6. Deney Hayvanlarının Kognitif Durumlarının Değerlendirilmesi

6.6.1. Açık alan testi sonuçlarının değerlendirilmesi

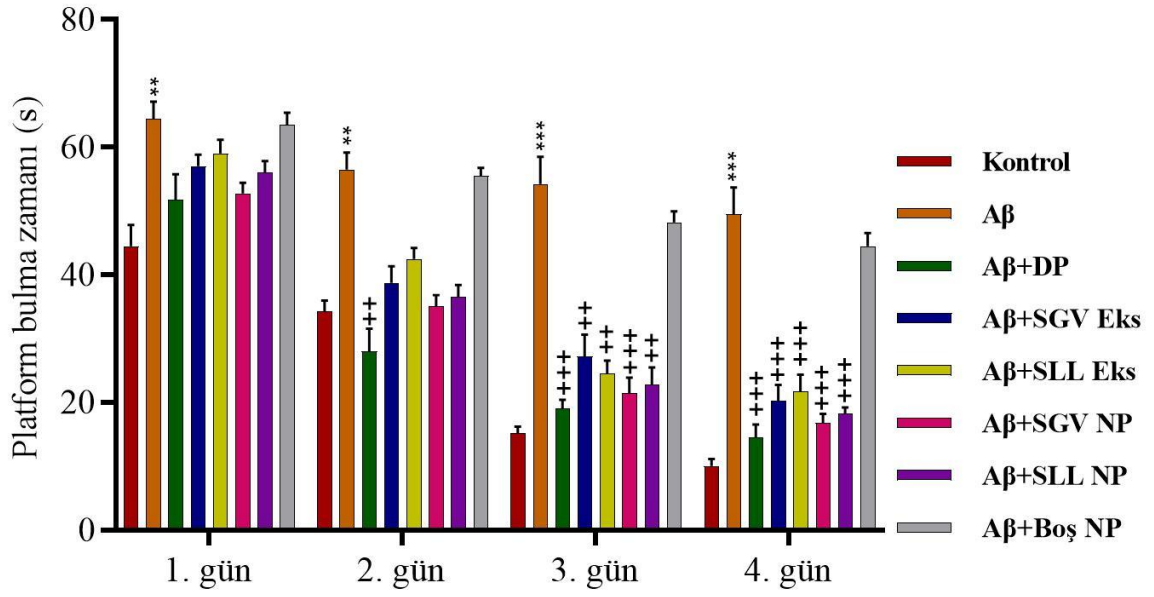
Bu tez çalışmasında hayvan gruplarının lokomotor aktivitelerini değerlendirmek için açık alan testi yapıldı. Deneyde hayvanlar zemini karelere bölünmüş bir kutu içerisine konuldu ve 5 dakika boyunca kayıt altına alındı. Bu kapsamda merkez bölgeye girilen ilk zaman (Şekil 24a), merkez bölgede geçirilen zaman (Şekil 24b), katedilen toplam çizgi sayısı (Şekil 24c), şahlanma sayısı (Şekil 24d) ve süslenme sayısı (Şekil 24e) değerlendirildi. Gruplar arasında yapılan kıyaslamada herhangi bir anlamlılık gözlemlenmedi.



Şekil 24. Açık alan testi uygulanan gruplardan alınan sonuçların değerlendirilmesi. (a) merkez bölgeye girilen ilk zaman, (b) merkez bölgede geçirilen zaman, (c) katedilen toplam çizgi sayısı, (d) süslenme sayısı ve (e) şahlanma sayısı. Aβ: Amiloid β, DP: Donepezil, SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Benth) Bornm., Eks: Ekstre, NP: Nanopartikül. İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır. Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir.

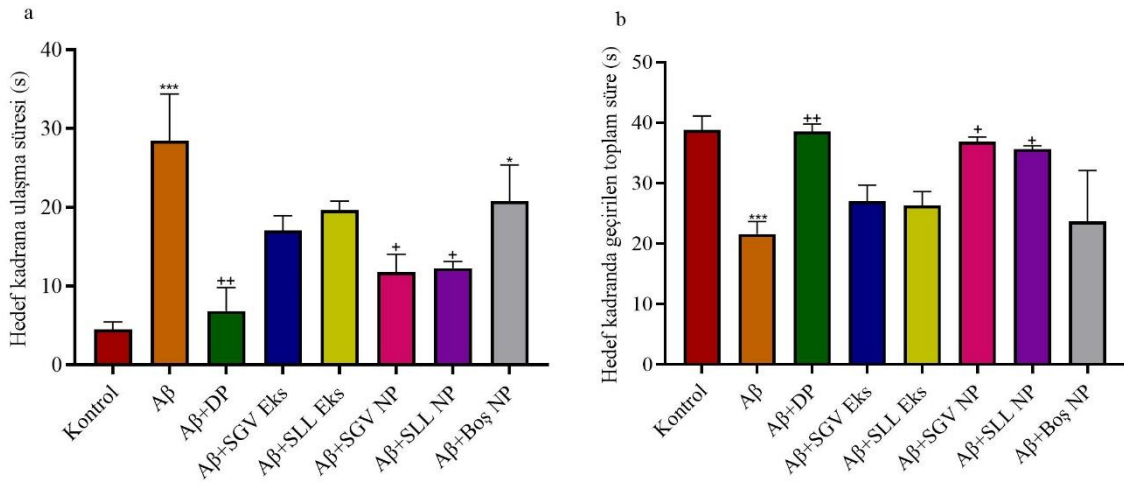
6.6.2. Morris'in su tankı testi sonuçlarının değerlendirilmesi

Morris'in su tankı testinde sıçanların platformu bulma süreleri 1, 2, 3, ve 4. Günlerde değerlendirildi (Şekil 25). Süreler incelendiğinde 1. ve 2. günde Aβ grubunun ($p < 0.01$) kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede daha uzun sürede platformu bulduğu, 3. ve 4. günde ise bulma süresinin ve anlamlılığın arttığı ($p < 0.001$) görüldü. Aβ grubuna kıyasla, Aβ+DP grubunda 1. gün anlamlı bir değişiklik gözlemlenmedi. 2. gün platformu bulma süresinde anlamlı bir düşüş görülürken ($p < 0.01$), 3. ve 4. günlerde ise bu sürenin daha da kısaldığı ($p < 0.001$) tespit edildi. Aβ grubuna kıyasla, Aβ+SGV Eks ve Aβ+SLL Eks grupları 1. ve 2. gün anlamlı bir değişiklik gözlemlenmedi. Aynı grupların 3. gün platformu bulma süresi anlamlı bir düşüş gösterdi ($p < 0.01$) ve 4. gün bulma platformu bulma süresi anlamlı derecede ($p < 0.001$) azalmaya devam etti. Aβ+SGV NP ve Aβ+SLL NP gruplarının Aβ grubuna kıyasla 1. ve 2. gün anlamlı bir değişiklik göstermezken 3. ve 4. günlerde platformu bulma süresi anlamlı derecede düştü ($p < 0.001$). Aβ+Boş NP grubu ise Aβ grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik göstermedi.



Şekil 25. Morris'in su tankı testi grupların öğrenme performanslarının değerlendirilmesi. Aβ: Amiloid β, DP: Donepezil, SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., Eks: Ekstre, NP: Nanopartikül. İstatistiksel analiz için iki yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır. Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslama: ** p <0.01 ve *** p <0.001, Aβ grubuyla kıyaslama: ++ p <0.01 ve +++ p <0.001.

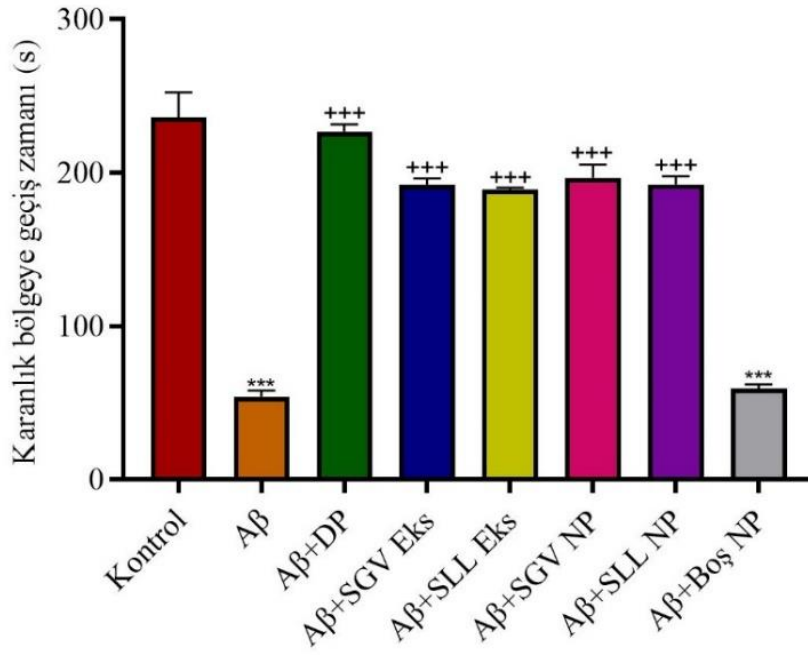
Morris'in su tankı testinin alıştırma günlerinde platformun yerini öğrenmesi beklenen sıçanların, prob test gününde platformun uzaklaştırılmasıyla hedef kadrana ulaşma süresi ve hedef kadranda geçirilen toplam süre değerlendirildi (Şekil 26). Kontrol grubuna kıyasla Aβ grubu (p <0.001) ve Aβ+Boş NP (p <0.05) grubunun hedef kadrana ulaşma süresinde anlamlı derecede yükselme gözlenirken hedef kadranda geçirilen toplam sürede sadece Aβ grubunda (p <0.001) önemli bir yükselme tespit edildi. Aβ grubuna kıyasla yapılan değerlendirilmelerde ise Aβ+DP (p <0.01), Aβ+SGV NP (p <0.05) ve Aβ+SLL NP (p <0.05) gruplarının hedef kadrana ulaşma sürelerinin anlamlı derecede düştüğü, hedef kadranda geçirilen toplam sürelerinin ise anlamlı derecede arttığı görüldü.



Şekil 26. Morris'in su tankı testinde grupların hedef kadrana ulaşma süresi (a) ve hedef kadranda geçen toplam sürenin (b) değerlendirilmesi. Aβ: Amiloid β, DP: Donepezil, SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., Eks: Ekstre, NP: Nanopartikül. İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır. Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslama: * p <0.05 ve *** p <0.001, Aβ grubuyla kıyaslama: + p <0.05 ve ** p <0.01.

6.6.3. Pasif sakınma testi sonuçlarının değerlendirilmesi

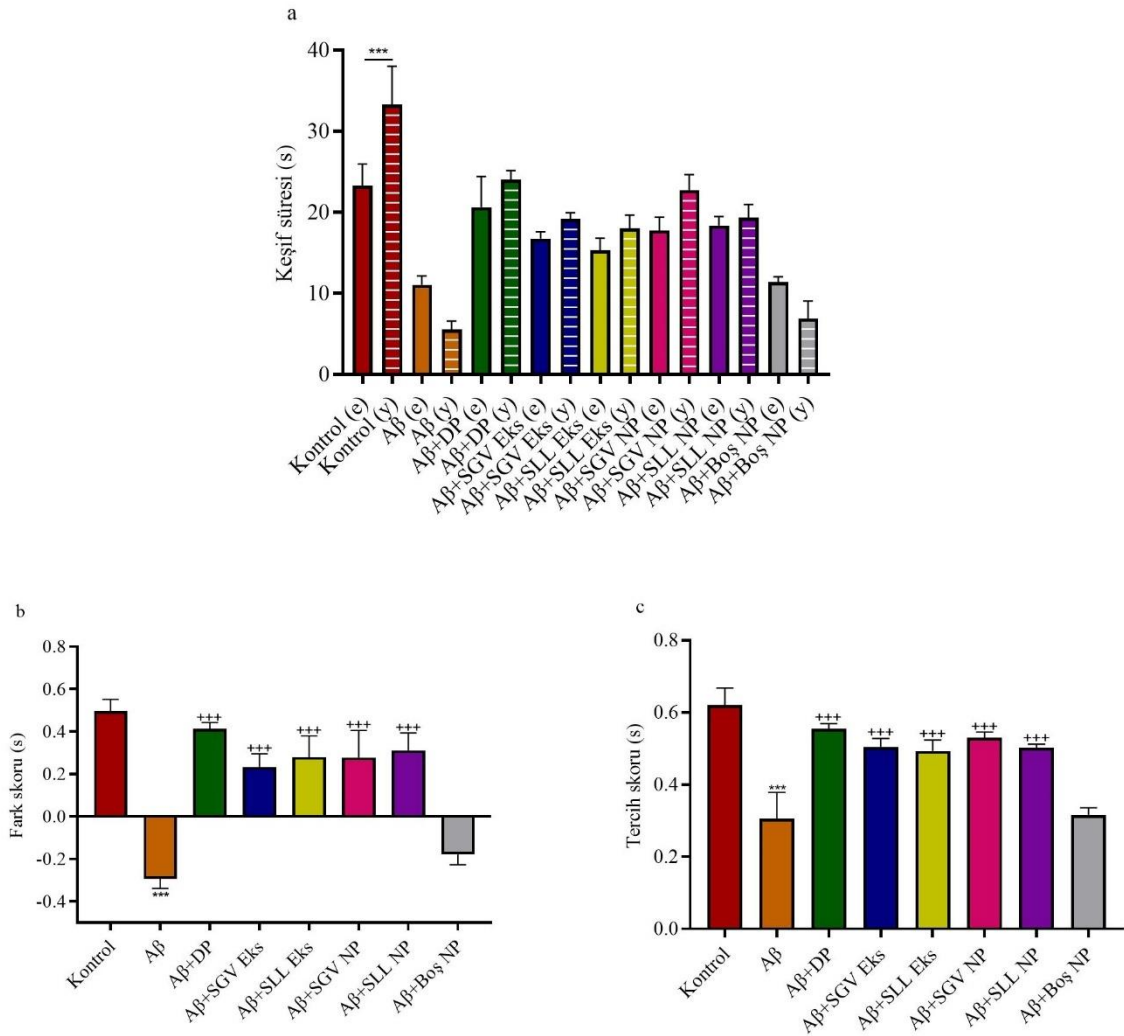
Pasif sakınma testinin sonuçları öğrenmenin gerçekleşip gerçekleşmediğini tespit etmek için elektrik şoku uygulanan ilk günün ardından ikinci günde hayvanların karanlık tarafa geçiş sürelerinin grup içi ortalaması alınarak belirlendi (Şekil 27). Elde edilen verilere göre ilk gün gruplar arasında anlamlı bir farklılık oluşmadı. Testin 2. gününde ise Aβ (p <0.001) ve Aβ+Boş NP (p <0.001) gruplarının karanlık tarafa geçiş süreleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksekti. Aβ+DP (p <0.01), Aβ+SGV Eks (p <0.05), Aβ+SLL Eks (p <0.05), Aβ+SGV NP (p <0.05) ve Aβ+SLL NP (p <0.05) grupları ayrı ayrı Aβ grubuyla kıyaslandıklarında ise karanlık tarafa geçiş süreleri oldukça anlamlı düzeyde artış gösterdi.



Şekil 27. Pasif sakinme testi grupların karanlık bölgeye geçiş zamanlarının değerlendirilmesi. Aβ: Amiloid β, DP: Donepezil, SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., Eks: Ekstre, NP: Nanopartikül. İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır. Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslama: * p < 0.05 ve *** p < 0.001, Aβ grubuyla kıyaslama: + p < 0.05 ve ++ p < 0.01.

6.6.4. Yeni obje tanıma testi sonuçlarının değerlendirilmesi

Yeni obje tanıma testinde hayvanların kısa süreli hafıza ve öğrenme yetenekleri değerlendirildi. İlk önce aynı cisimlere göstermiş oldukları ilgi 3 dakika boyunca kayıt altına alınırken, 1 saat sonra yapılan ikinci aşamada ise cisimlerden biri değiştirildi ve grupların yeni cisme olan ilgisi incelendi. Şekil 28a'da belirtilen sonuçlardan anlaşılacağı üzere deney süresince kontrol grubunun yeni obje ile ilgilenme süresi diğer gruplara kıyasla anlamlı düzeyde fazladır (p < 0.001). Aβ grubunun (p < 0.001) kontrol grubuna kıyasla yeni obje ile ilgilenme süresi anlamlı derecede düşüş gösterirken, Aβ+DP (p < 0.001), Aβ+SGV Eks (p < 0.001), Aβ+SLL Eks (p < 0.001), Aβ+SGV NP (p < 0.001) ve Aβ+SLL NP (p < 0.001) grupları Aβ grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artış göstermiştir (Şekil 28b-c).



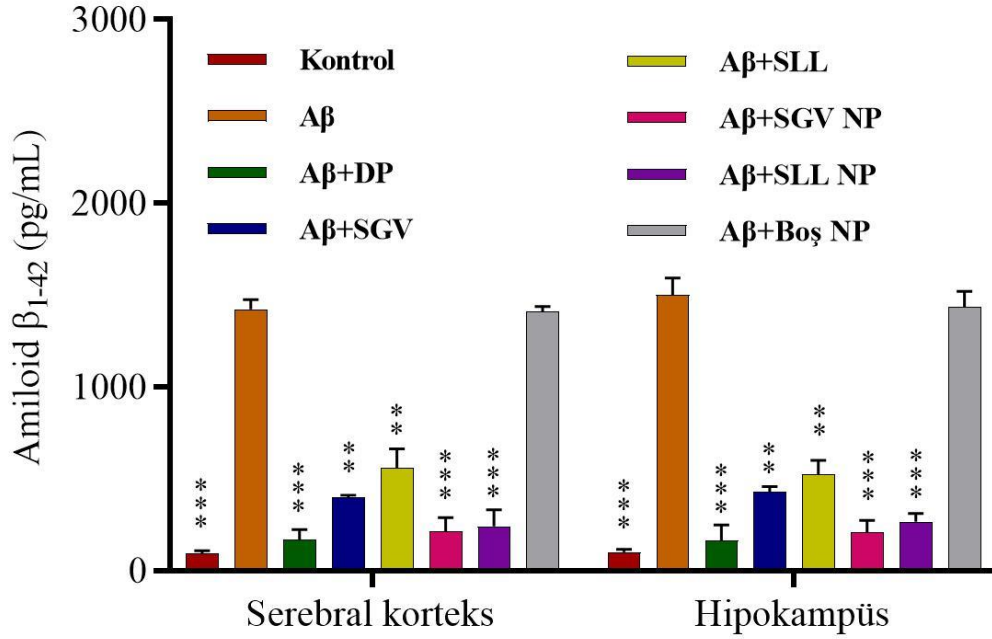
Şekil 28. Yeni obje tanıma testi uygulanan gruplardan alınan sonuçların değerlendirilmesi. (a) Keşif süresi, (b) Fark skoru, (c) Tercih skoru. Aβ: Amiloid β, DP: Donepezil, SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., Eks: Ekstre, NP: Nanopartikül. İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır. Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslama: *** p <0.001, Aβ grubuyla kıyaslama: +++ p <0.001

6.7. Alınan Doku Örneklerinde Yapılan Analizlerin Değerlendirilmesi

6.7.1. Beyin dokusunda Aβ₁₋₄₂ düzeyinin ELISA ile değerlendirilmesi

Dekapitasyon sonrasında alınan serebral korteks ve hipokampüsteki Aβ₁₋₄₂ düzeyleri ELISA kiti ile analiz edilmiştir (Şekil 29). Serebral korteks ve hipokampus dokusundaki Aβ₁₋₄₂ seviyeleri değerlendirildiğinde hastalık grubu olarak kabul ettiğimiz Aβ grubunun kontrol grubuna kıyasla (p <0.001) daha fazla miktarda Aβ₁₋₄₂ miktarı saptandı. Tedavi grupları Aβ

grubu ile kıyaslandığında ise A β +DP (p <0.001), A β +SGV (p <0.01), A β +SLL (p <0.01), A β +SGV NP (p <0.001) ve A β +SLL NP (p <0.001) gruplarında A β ₁₋₄₂ miktarları anlamlı düzeyde düşüş gösterirken A β +Boş NP grubunda A β ₁₋₄₂ miktarında anlamlı bir değişikliğin olmadığı belirlendi.

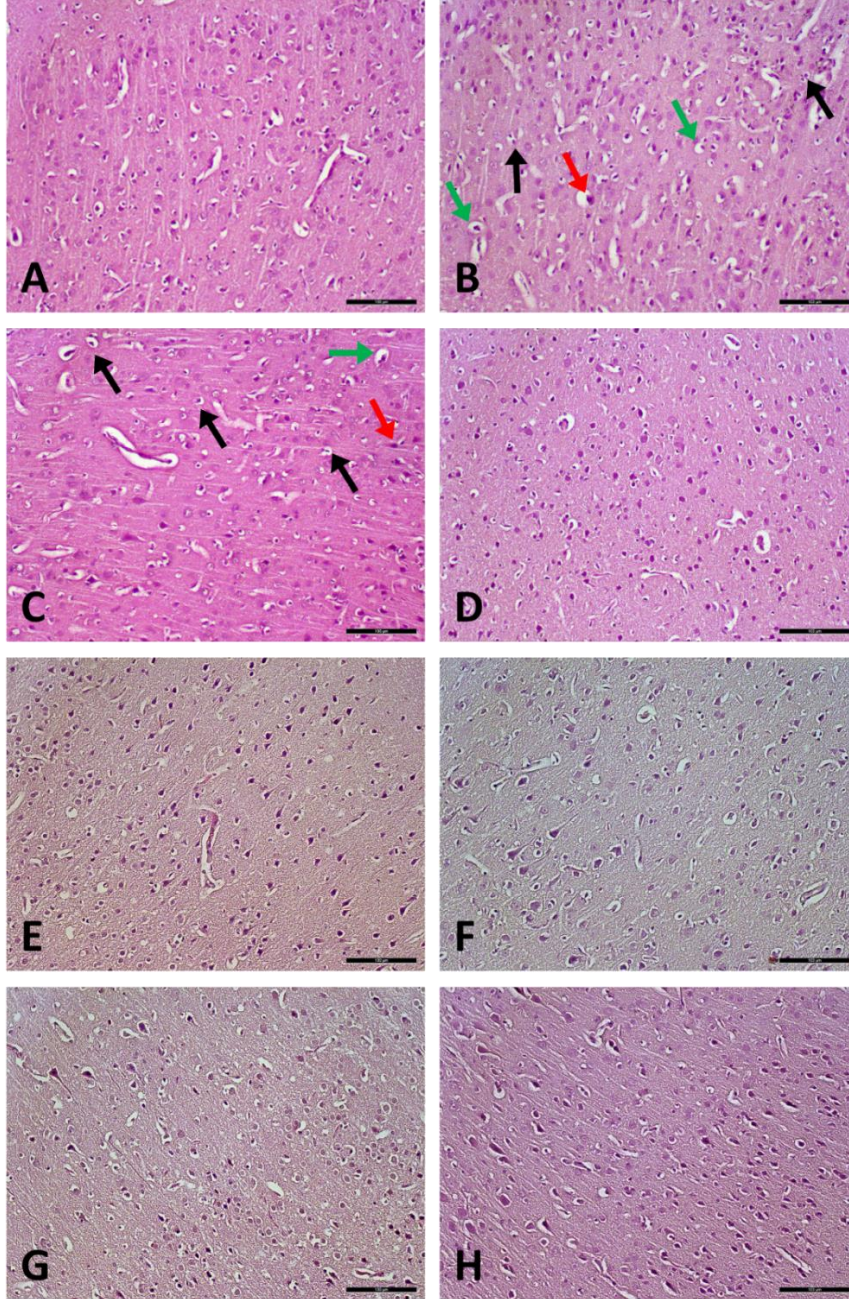


Şekil 29. Serebral korteks ve hipokampus dokularındaki A β ₁₋₄₂ düzeylerinin değerlendirilmesi. A β : Amiloid β , DP: Donepezil, SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: Nanopartikül. İstatiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. *** p <0.001, ** p <0.01

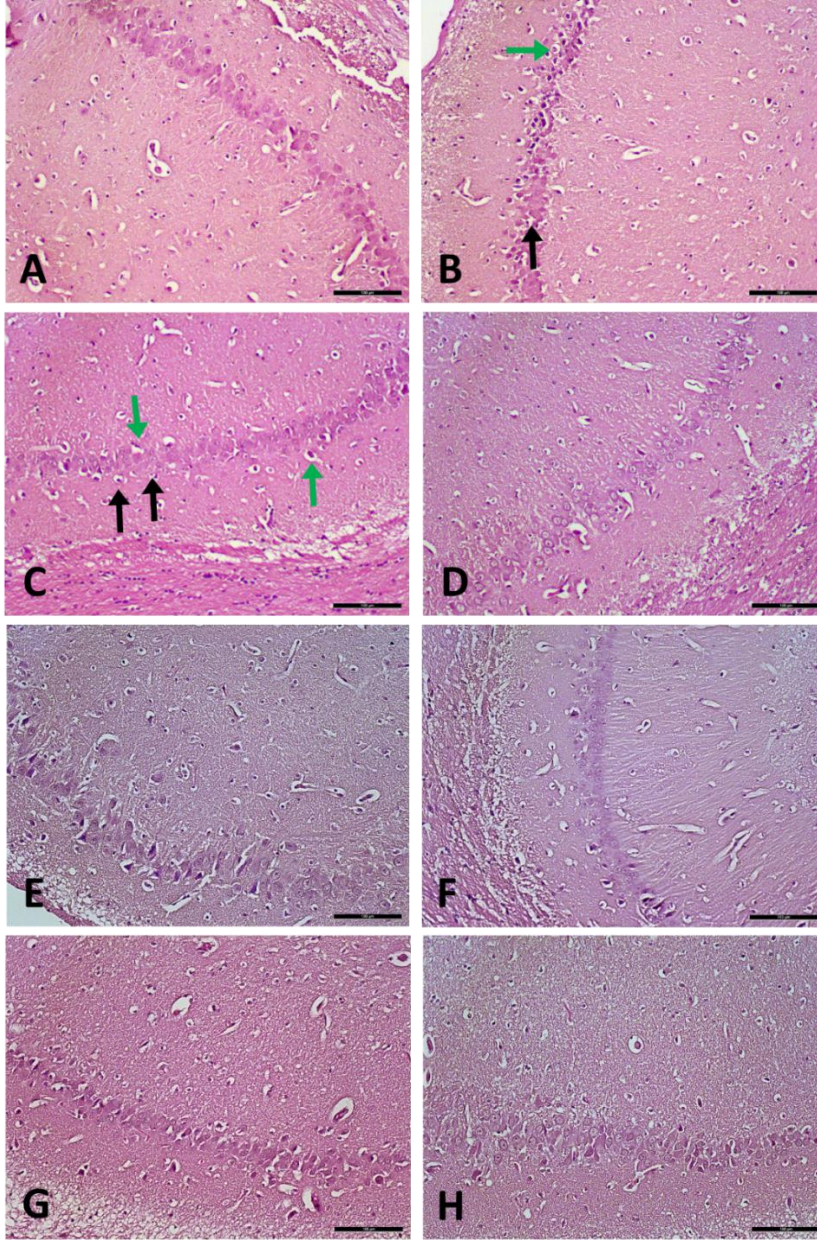
6.7.2. Alınan beyin dokularının histopatolojik analizlerin değerlendirilmesi

Histoloji analizi sırasında, hayvan gruplarının korteks (Şekil 30) ve hipokampus bölgeleri (Şekil 31) dikkatlice incelendi ve bu bölgelerdeki hastalık ve tedaviye bağlı değişiklikler, kontrol grupları ile karşılaştırıldı. Kontrol grubu, farklı beyin bölgelerindeki (serebral korteks, CA2 ve CA3 hipokampal bölgeler) nöronların normal histomorfolojik yapılarını sergiledi. A β grubu sıçanlar, kontrol ile karşılaştırıldığında serebral korteks ve hipokampal bölgelerin bazı nöronlarında artan nükleer piknoz/dejenerasyon ile fokal eozinofilik plaklar ve intraselüler/perivasküler ödem kaydedildi. A β +Boş NP grubu, A β ile kıyaslandığında benzer şekilde hasar kriterleri gösterdi. SLL ve SGV ekstrelerinin verildiği tedavi gruplarının, incelenen serebral korteks ve hipokampal bölgelerinde yer yer piknotik hücre ve hücresel

dağılıma gözlense de hasar ile kıyaslandığında iyileşme eğiliminde olduğu gözlemlendi. SLL ve SGV NP'lerin uygulandığı beyin bölgelerinin incelemesinde belirlenen hasar kriterlerini geriye çevirerek iyileşmeyi daha fazla arttırdığı ve hatta pozitif kontrole benzer bir morfoloji gösterdiği rapor edildi.



Şekil 30. Deney grupları arasında H&E boyalı beyin dokularının serebral korteks bölgelerine ait fotomikrograflar. A: Kontrol, B: A β , C: A β + Boş NP, D: A β +DP, E: A β +SLL, F: A β +SLL NP, G: A β +SGV, H: A β +SGV NP. Siyah ok: Nükleer piknoz ve dejenerasyon; Kırmızı ok: Fokal eozinofilik plaklar; Yeşil ok: Nöronal hücrelerde intraselüler ödem ve perivasküler ödem. Ölçek: 100 μ m. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: Nanopartikül, A β : Amiloid β , DP: Donepezil.

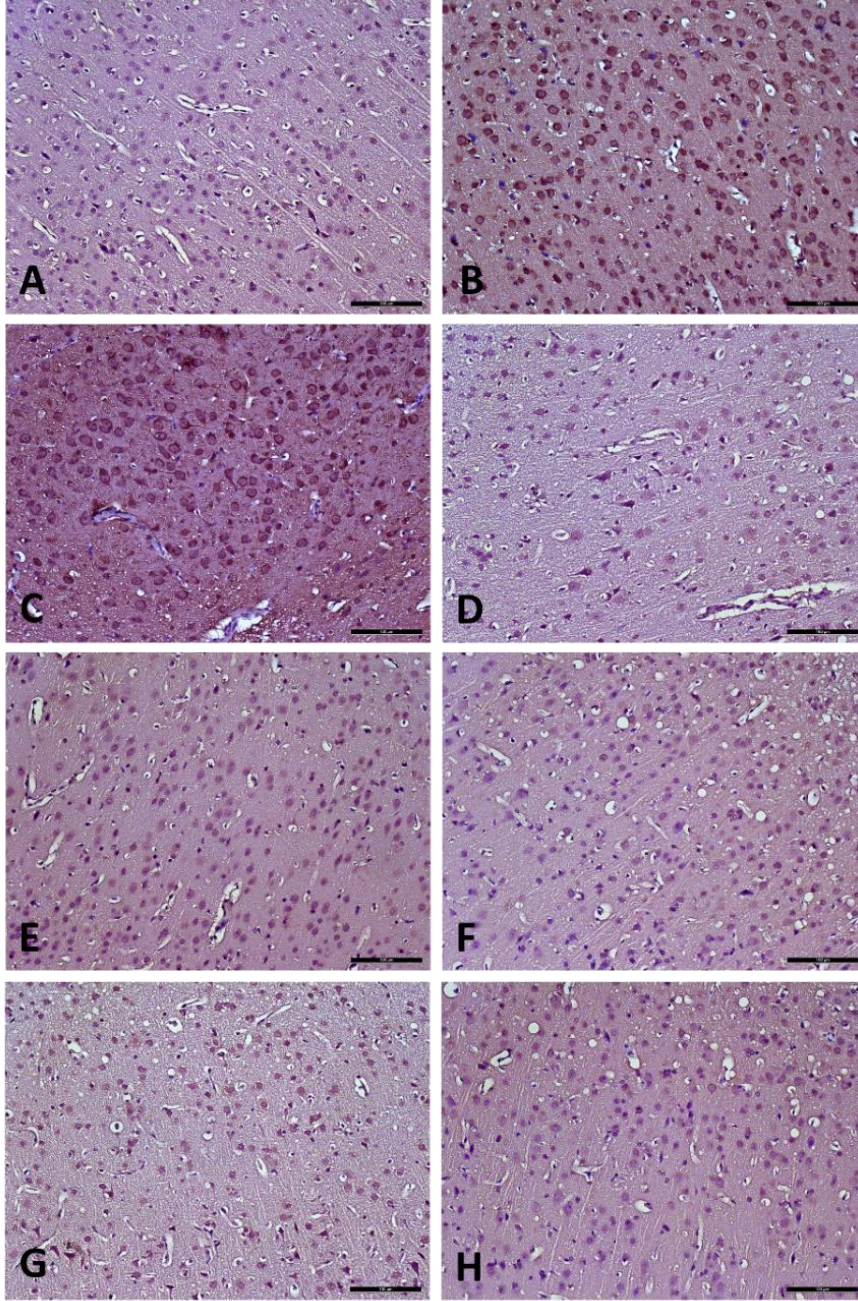


Şekil 31. Deney grupları arasında H&E boyalı beyin dokularının hipokampus bölgelerine ait fotomikrograflar. A: Kontrol, B: A β , C: A β + Boş NP, D: A β +DP, E: A β +SLL, F: A β +SLL NP, G: A β +SGV, H: A β +SGV NP. Siyah ok: Nükleer piknoz ve dejenerasyon; Yeşil ok: Nöronal hücrelerde intraselüler ödem ve perivasküler ödem. Ölçek: 100 μ m. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: Nanopartikül, A β : Amiloid β , DP: Donepezil.

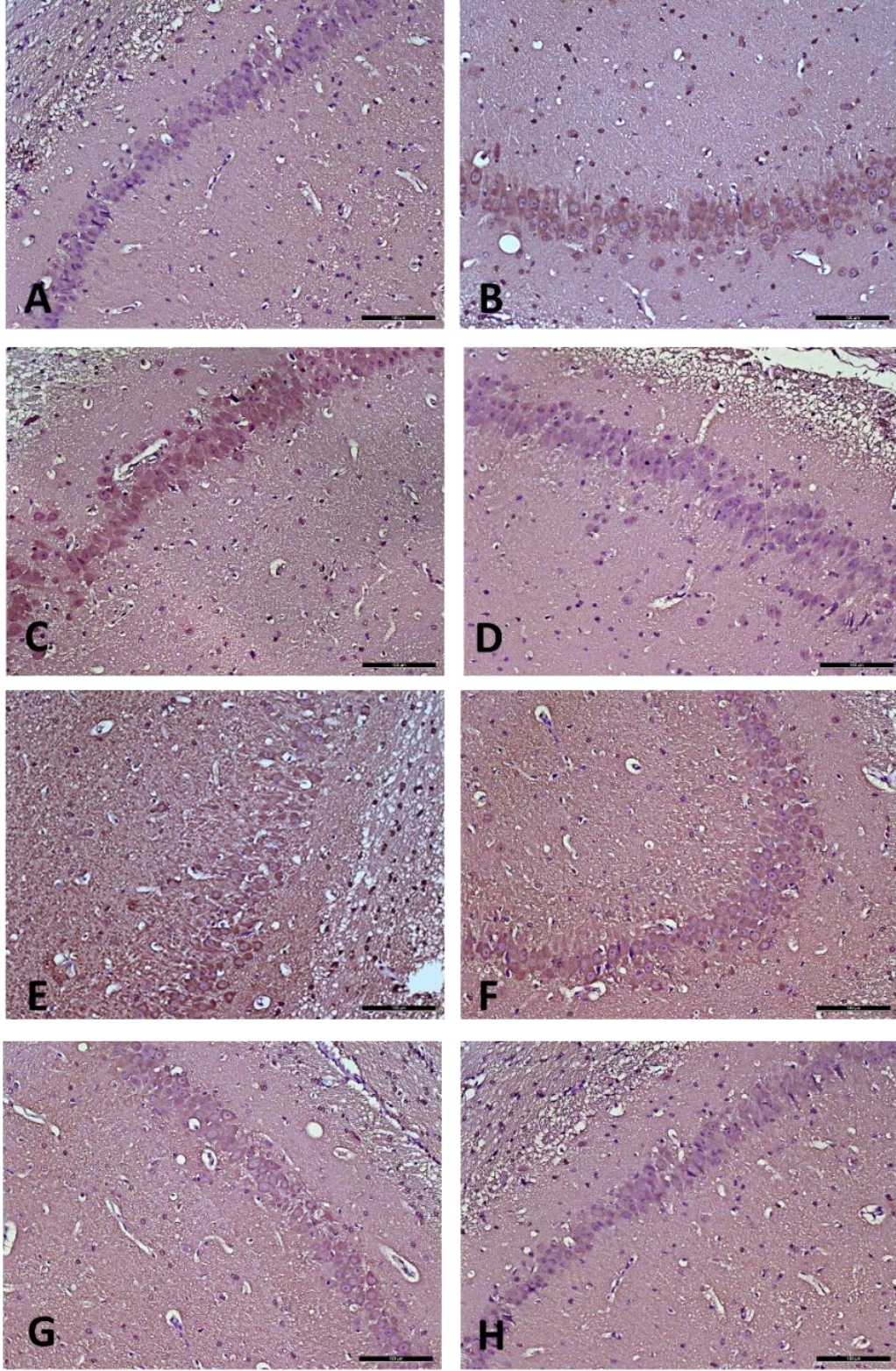
6.7.3. İmmünohistokimyasal analizlerin değerlendirilmesi

Bu tez çalışmasında serebral korteks ve hipokampusteki A β ₁₋₄₂ (Şekil 32 ve Şekil 33) ve fosforile tau seviyeleri (Şekil 34 ve Şekil 35) değerlendirildi. Çalışmada oluşturulan AH modeli kontrol ile kıyaslandığında, beyin dokusunun serebral korteks ve hipokampus (CA2 ve CA3) bölgesinde yoğun amiloid plakları ve tau protein ekspresyonu ortaya çıktı. Ekstre yüklü NP'ler ile tedavi edilen gruplarda da aynı şekilde beta amiloid ve tau protein ekspresyonları gözlemlendi.

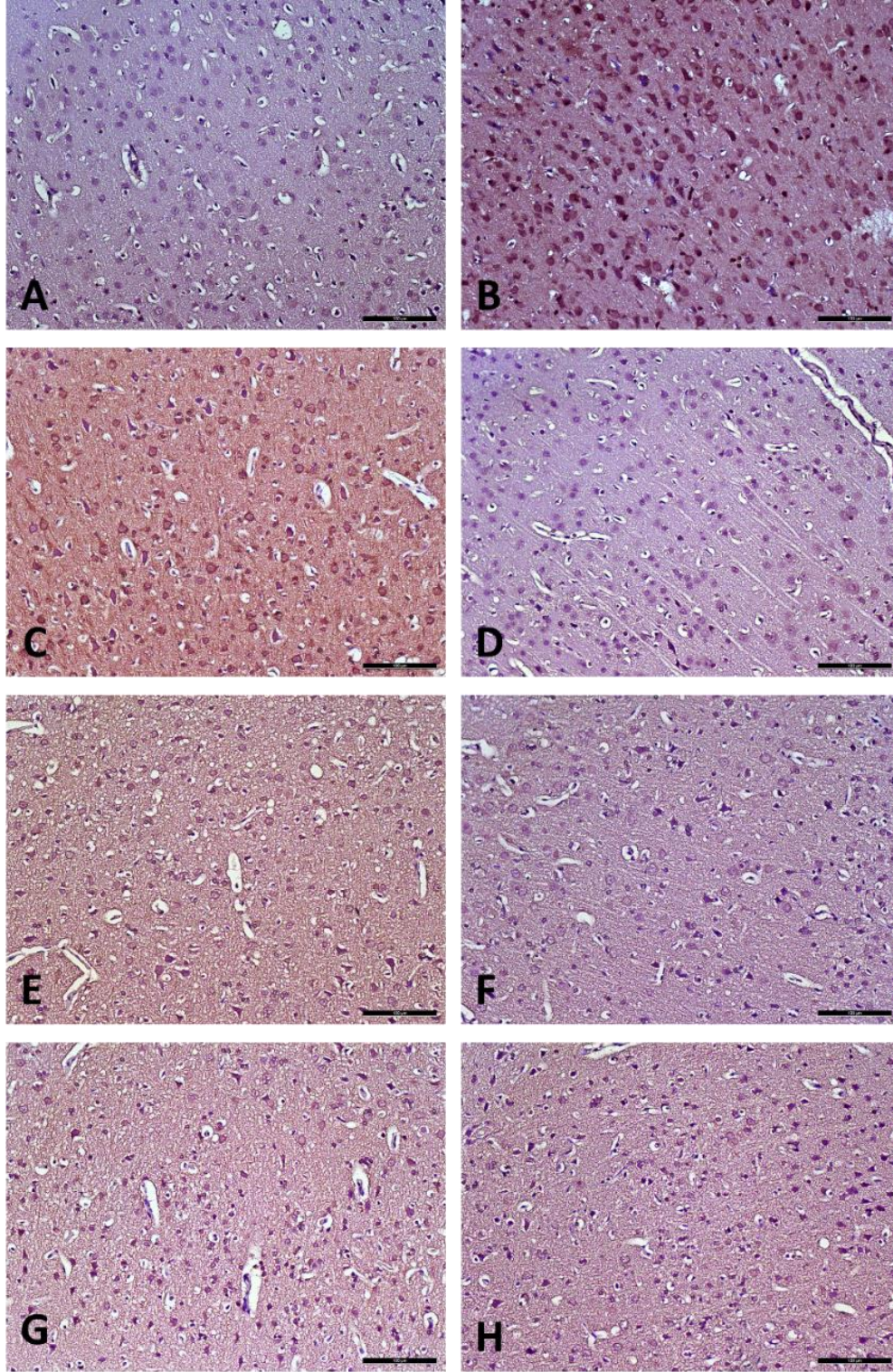
Hasar ile kıyaslandığında, pozitif kontrol ve SLL/SGV verilen gruplarda bu protein ekspresyonlarının azaldığı gözlemlendi. Ekstre yüklü NP formlarının bu protein ekspresyonları üzerinde daha etkili olduğu tespit edildi.



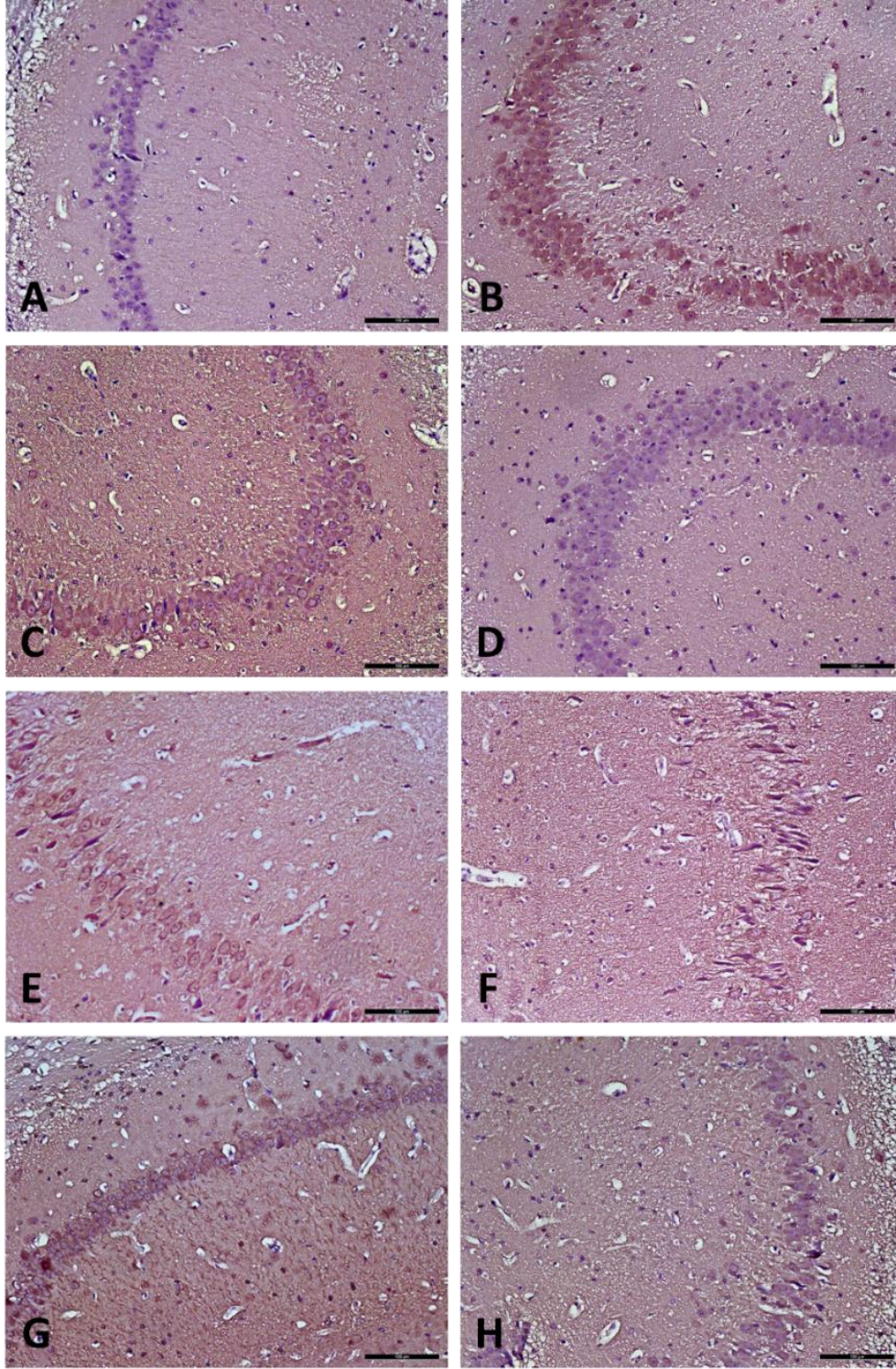
Şekil 32. Deney grupları arasında beyin dokularının korteks bölgelerine ait anti-A β immünohistokimyasal boyama. A: Kontrol, B: A β , C: A β + Boş NP, D: A β +DP, E: A β +SLL, F: A β +SLL NP, G: A β +SGV, H: A β +SGV NP. Kahverengi boyanma, immüno-pozitif hücreleri ifade eder. Ölçek: 100 μ m. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Benth) Bornm., NP: Nanopartikül, A β : Amiloid β , DP: Donepezil.



Şekil 33. Deney grupları arasında beyin dokularının hipokampus bölgelerine ait anti-A β immünohistokimyasal boyama. A: Kontrol, B: A β , C: A β + Boş NP, D: A β +DP, E: A β +SLL, F: A β +SLL NP, G: A β +SGV, H: A β +SGV NP. Kahverengi boyanma, immüno-pozitif hücreleri ifade eder. Ölçek: 100 μ m. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: Nanopartikül, A β : Amiloid β , DP: Donepezil.



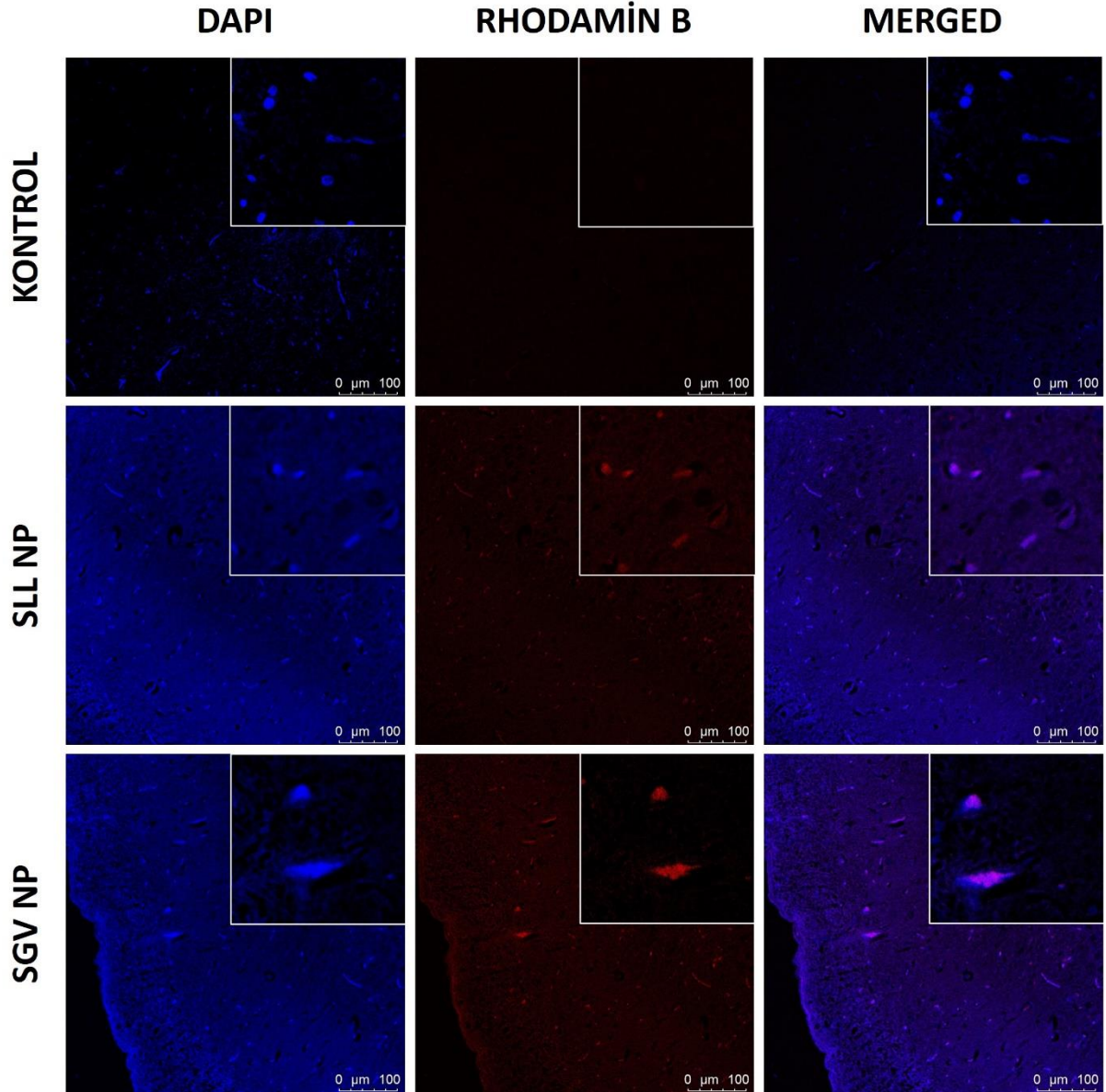
Şekil 34. Deney grupları arasında beyin dokularının korteks bölgelerine ait anti-Tau immünohistokimyasal boyama. A: Kontrol, B: A β , C: A β + Boş NP, D: A β +DP, E: A β +SLL, F: A β +SLL NP, G: A β +SGV, H: A β +SGV NP. Kahverengi boyanma, immüno-pozitif hücreleri ifade eder. Ölçek: 100 μ m. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: Nanopartikül, A β : Amiloid β , DP: Donepezil.



Şekil 35. Deney grupları arasında beyin dokularının hipokampus bölgelerine ait anti-Tau immünohistokimyasal boyama. A: Kontrol, B: A β , C: A β + Boş NP, D: A β +DP, E: A β +SLL, F: A β +SLL NP, G: A β +SGV, H: A β +SGV NP. Kahverengi boyanma, immüno-pozitif hücreleri ifade eder. Ölçek: 100 μ m. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: Nanopartikül, A β : Amiloid β , DP: Donepezil.

6.7.4. Konfokal görüntüleme sonuçlarının değerlendirilmesi

Bu tez çalışmasında ekstre yüklü NP'ler rhodamine B floresan boyası ile boyandı ve beyin dokusundaki konfokal mikroskop görüntüsü alındı (Şekil 36). Herhangi bir boyamanın yapılmadığı kontrol grubu ile yapılan kıyaslamada iki NP formülasyonunun da beyne ulaştığı ve ışığa verdiği tespit edildi.



Şekil 36. Tedavi ajanları yüklenen NP'lere bağlanan rhodamine B floresan boyanın beyin dokusundaki konfokal mikroskop görüntüsü. Ölçek: 100 µm. Küçük fotoğrafların ölçeği 50 µm. SGV: *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm., SLL: *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm., NP: Nanopartikül.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

AH, merkezi sinir sisteminin kademeli bilişsel gerilemesi ile karakterize ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Nöritik plaklar olarak hücre dışı A β birikiminin varlığı ve NFY'ler olarak hiperfosforile tau proteinin hücre içi birikimi, AH tanısı için birincil nöropatolojik kriter olmaya devam etmektedir. Demansın en yaygın türü olan AH, dünya çapında tahminen toplam 50 milyon insanı etkileyen küresel bir halk sağlığı sorunu olarak ortaya çıkmıştır. AH'nin sürekli artan prevalansı ve toplum üzerindeki ağır yükü, araştırmacıların AH patogenezinin altında yatan mekanizmaları incelemesini ve hastalığı iyileştirici tedaviler aramasını her zamankinden daha acil hale getirmektedir (Liu ve ark., 2020).

AH'nin kesin nedeni hâlâ belirsiz olsa da son çalışmalar yaşam tarzı, diyet, çevresel ve genetik faktörlerin hastalığın ilerlemesine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Bugüne kadar geliştirilen farmasötik yaklaşımlar hastalığın ilerlemesini engelleyememektedir. Son on yılda iki yüzden fazla umut vaat eden ilaç adayının klinik denemelerde başarısız olması, hastalığın ve nedenlerinin oldukça karmaşık olabileceğini düşündürmektedir. Şifalı bitkiler ve bitkisel ilaçlar artık tamamlayıcı ve alternatif müdahaleler olarak daha fazla ilgi kazanmakta ve AH için ilaç adaylarının geliştirilmesinde değerli bir kaynak oluşturmaktadır. Yapılan birçok bilimsel çalışma, çeşitli şifalı bitkilerin ve bunların temel fitokimyasallarının AH tedavisinde kullanımını destekler niteliktedir (Gregory ve ark., 2021).

Yıllar geçtikçe bitki ürünleri, mikrobiyal izolatlar ve bazı metabolik yan ürünler de dahil olmak üzere doğal olarak elde edilen çok sayıda küçük molekül, AH riskini azaltan ve mevcut tedavilere destek olan takviyeler olarak öngörülmüştür. Ancak ne yazık ki hiçbiri beklenen başarıyı sağlayamamıştır. Çoğu ilaç için en büyük zorluklardan biri, KBB'yi geçme yetenekleridir. Geçtiğimiz yıllarda nanoteknolojiye dayalı müdahaleler, ilaçların belirli hedeflere başarılı bir şekilde ulaştırılması sorununu çözmek için alternatif bir platform sunmuştur. Doğal ürünler ve nanoteknoloji arasındaki heyecan verici bu bağ, AH tedavisinde umut verici sonuçlar vermektedir. Antioksidan aktiviteleriyle en iyi bilinen bitki kaynaklı bileşikler olan flavonoidlerin potansiyel uygulamaları ve bunların nanomedikal yaklaşımlarla birleştirilmesi, iyi bilinen nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde oldukça etkili terapötik stratejilere yol açabilir (Prasanna ve Upadhyay, 2021).

Bu tez çalışmasında mevcut sorunların yanında potansiyel çözüm yollarını da göz önünde bulundurarak Türkiye'de endemik olarak yetişen ayrıca yüksek oranda flavonoid bileşiklere

sahip olan *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *Viridis* Hausskn. ex Bornm. (SGV) ve *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm. (SLL) bitkilerine ait ekstraler ile bu ekstrelerin yüklü olduğu NP'lerin intraserebroventriküler A β ₁₋₄₂ uygulamasıyla indüklenen sıçan beyinlerindeki lokomotor aktiviteye, öğrenmeye ve hafızaya olan etkileri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi İsmail ŞENKARDEŞ tarafından tanımlan bitki materyallerinin *in vitro* antioksidan ve antikolinesteraz aktivite tayinleri Doç. Dr. Turgut TAŞKIN eşliğinde yapılmıştır ve elde edilen sonuçlar literatür ile karşılaştırılmıştır. İki bitkinin de 7:3 EtOH:d.H₂O ekstreleri 3 farklı antioksidan aktivite yöntemiyle incelenmiştir. 3 yöntemde de SGV ekstresinin SLL ekstresinden daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Güvenç ve arkadaşlarının diğer *Sideritis* türleriyle yaptığı çalışmaya kıyasla SGV ve SLL ekstreleri oldukça daha yüksek DPPH radikal temizleme aktivitesi göstermiştir (Güvenç ve ark., 2005). Bir diğer çalışmada ise diğer *Sideritis* türlerinin DPPH radikal temizleme aktiviteleri SGV ve SLL ekstrelerine yakın bulunmuştur (Gülcan ve ark., 2022). FRAP ve CUPRAC tayinlerinde elde edilen sonuçlar da literatür ile uyumlu bulunmuştur. Bu sonuçlar bitki ekstralarının antioksidan aktiviteye sahip olduklarını ve yapılacak çalışmalarda kullanılacaklarını kanıtlamaktadır (Ceylan ve ark., 2019; Deveci ve ark., 2019). Antikolinesteraz aktivitelerinde ise SLL ekstresinin SGV'den daha yüksek inhibisyon aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Bu değişikliğin başlıca sebebi antioksidan etkiler, vücuttaki serbest radikalleri nötralize ederek hücrel hasarı azaltmaya yardımcı olur iken antikolinesteraz etkiler nörotransmitterlerin düzenlenmesi aracılığı ile oluşur (Zengin ve ark., 2016). Bu da ekstrelerin farklı mekanizmalar aracılığı ile anti-Alzheimer etkinlik gösterebileceği şeklinde yorumlanabilir.

Bu tez çalışmasında SGV ve SLL ekstreleri PLGA/PEG NP'leri içerisine yüklenmiştir ve üretilen NP'ler P80 ile kaplanmıştır. Çalışma için bu maddelerin seçilme sebepleri ise şunlardır: PLGA'nın biyolojik olarak uyumlu ve bozunabilir bir polimer olmasının yanında taşıyıcı sistemlerde kullanıldığında, taşıdığı ajanları korur ve kontrollü bir şekilde salınmasını sağlamaktadır. PEG, yüzey modifikasyonu için yaygın olarak kullanılan bir polimerdir. Özellikle nanoteknolojik ilaç taşıyıcıları ile kullanıldığında, yüzeylerini hidrofilik hale getirmekte ve bağlayıcı proteinlerin yüzeye yapışıp bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını önlemektedir. Bu, ilaç taşıyıcılarının dolaşımında daha uzun süre kalmasına ve hedef dokulara ulaşmasına yardımcı olmaktadır.

P80 ise KBB permeabilitesini artıran ve yaygın olarak kullanılmakta olan bir sürfaktandır. KBB'yi geçmek zorlu bir görev olduğundan bu tür ilaç taşıyıcılarının tasarımı ve kullanımı, ajanların beyne ulaşmasını kolaylaştırabilir (Chen ve ark., 2011; Joseph ve ark., 2021).

Saf ve işlenmiş materyallerin fizikokimyasal özellikleri çeşitli testler ile değerlendirilmiştir. Öncelikle SEM cihazı kullanılarak partiküllerin yüzey morfolojisi incelenmiştir. Ekstrelerin NP içine başarılı bir şekilde yüklenirken, homojen ve küresel şekilde dağılım gösterdikleri ve ilaç salımını engelleyecek herhangi bir agregasyon oluşturmadıkları tespit edilmiştir. Boyutu 200 nm'den küçük olan NP'lerin KBB'yi aşabildikleri ve kan dolaşımını arttırarak özellikle beyne daha iyi hedeflendirildikleri bilinmektedir (Kulkarni ve Feng, 2013). Bu bağlamda, ürettiğimiz NP'lerin hedeflendirme için uygun boyutta olduğu anlaşılmıştır. PLGA/PEG kopolimeri P80 ile kaplandığında NP'lerin zeta potansiyeli yaklaşık 1,2-1,3 mV olarak ölçülmüştür. Bu değerler partiküllerin pozitif yüke sahip olduklarını ve literatür ile eşleştiğini göstermektedir (Chen ve ark., 2011). FTIR analizleri ile ekstrelerin, ekstre yüklü NP'lerin ve boş NP'lerin moleküler yapısı aydınlatılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde PLGA ve PEG'e ait karakteristik pikler ekstre yüklü NP'lerde de gözlemlenmiş ve başarılı bir yükleme gerçekleştiği anlaşılmıştır (Kumara ve ark., 2014; León ve ark., 2017; Pereira ve ark., 2016; Sadeghi-Avalshahr ve ark., 2017). SGV ve SLL ekstrelerinin FTIR spektrumları oldukça güçlü kimyasal benzerlikler olduğunu göstermiştir. Bu, her iki bitkinin de *Sideritis* cinsi olması nedeniyle makul bir sonuç olarak değerlendirilebilir. *Sideritis* familyasının kimyasal yapısının belirlenmesine yönelik literatür taraması sonunda, bu yapıda hidroksil, aromatik halka ve karboksil gruplarının varlığı sonucuna varılmıştır (Demirtas ve ark., 2011). Saf PLGA/PEG NP spektrumlarının ekstre yüklü PLGA/PEG NP spektrumları ile karşılaştırıldığında benzer değişikliklerin gözlemlenmesi, enkapsüllemenin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini kanıtlamıştır. XRD analizleri ile saf ve işlenmiş materyallerin kristal yapısı aydınlatılmıştır. Saf PLGA'nın vermiş olduğu pik literatür ile uyumlu bulunmuştur (Mollaeva ve ark., 2021; Seju ve ark., 2011). Aynı şekilde saf PEG'in de vermiş olduğu pikler, Fu ve arkadaşları ve Jayaramudu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalar ile örtüşmüştür (Fu ve ark., 2015; Jayaramudu ve ark., 2016). PLGA ve PEG'in piklerinin birbirine karışması üç boyutlu davranışlarının uyumlu olduklarını, dolayısıyla birlikte kullanılacaklarını göstermiştir. PEG'in pik keskinliğinin azalması PLGA'nın düşük kristaliteye sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Her iki ekstrede de fark edilen keskin piklerin bulunduğu zenginleşmiş bölge, literatürde *Sideritis* cinsi için önerilen XRD deseni ile uyumlu bulunmuştur (Citak ve

ark., 2014; Turkmenoglu ve ark., 2015). Ayrıca, $2\theta = 23^\circ$ civarında görülen geniş pik, amorf bir fazın varlığını göstermiştir (Koromili ve ark., 2022). DSC cihazı ile yapılan termal analizlerde boş NP'lerde 68.5°C ile 72.1°C 'de bulunan endotermik pikler ve 199.5°C 'de bulunan ekzotermik pikler erime ve kristalleşme sürecine işaret etmektedir. 55°C civarında görülen Tg ve PEG'in 66°C 'de erimesi literatür ile uyumludur (Martins ve ark., 2018; Zheng ve ark., 2005). Her ikisinin de fizyolojik sıcaklığın üzerinde ve yakın zamanda olmaları piklerin üst üste binmesine neden olmaktadır. Bununla birlikte, enkapsülleme iki kollu tepeyi tek güçlü kubbe şeklinde bir tepe olarak birleştirmiş ve ekzotermik tepeyi ortadan kaldırmıştır. XRD bölümünde tartışıldığı gibi, iki yarı amorf ekstre eklenerek güçlendirilen PLGA/PEG NP'nin amorf fazı; bu deney tarafından da desteklenen bir önermeyi oluşturmuştur. Hem pik genişlemesi hem de kristallenmenin ortadan kaldırılması, artmış amorf olma belirtisidir. Ekstrelerde tespit edilen erime noktalarının NP formlarında düşmesi ekstrelerin ve matrisin birbirine homojen bir şekilde dağıldığı şeklinde yorumlanabilir (Koromili ve ark., 2022). Ekstre formlarında gözükken piklerin NP formunda Tg'ye benzer bir pike dönüşmesi bu formun termal dayanıklılığını artırdığını kanıtlamaktadır. NP'lerde gerçekleşen *in vitro* salım profili incelendiğinde bu tip sürekli ve yavaş salım Fachriyah ve arkadaşları ile asetilsalisilik asit için yapılan bir çalışmada görülmüştür (Fachriyah, 2017). SGV ve SLL'nin difüzyonu ve moleküler matris bozunması, SLL ve SGV'nin NP'lerden salınmasında önemli bir rol oynamıştır. Ekstrelerin boyutu NP'lerden daha küçük olduğu için SLL ve SGV, NP'lerin yüzeyinden veya gözeneklerinden kolayca difüze olabilmıştır (Fachriyah, 2017; Tang ve ark., 2018)

Sideritis cinsi bitki ekstrelerin MTT sonucu elde edilen Dm (IC₅₀) değerleri literatür ile kıyaslandığında bulunan değerler benzer çalışmalardaki doz aralıklarında olduğu tespit edilmiştir (Radojević ve ark., 2012). Belirlenen dozlarla yapılan anti-Alzheimer çalışmasında ekstre ve ekstre yüklü NP'lerin Dm (IC₅₀) dozlarının hücre canlılığını artırması hastalık üzerindeki etkinliğini kanıtlarken boş NP uygulanan grubun canlılığı çok az miktarda artırması NP'lerin hücre canlılığını desteklediğini fakat ekstre yüklenmeden anti-Alzheimer etkinlik gösteremediğini kanıtlamıştır. CompuSyn programından elde edilen kombinasyon dozlarının uygulanması ile hücre canlılığının A β_{1-42} grubundan daha düşük çıkması yapılan hesaplamalardaki antagonist etki sonucunu desteklemiştir. Kombine kullanımın tedavide sinerjik bir etki oluşturmayacağı tespit edildiği için *in vivo* çalışmalardan bu grup çıkarılmış ve gereksiz hayvan kullanımının önüne geçilmiştir.

Bu tez çalışmasında SGV ve SLL ekstrelerinin PI3K/Akt/GSK-3 β ile Wnt/ β -katenin yolları üzerinden etki gösterip göstermediği araştırılmıştır. AH patofizyolojisinin ana faktörlerinden biri tau proteininin hiperfosforilasyonudur ve bu yolak düzenlemede önemli rol oynamaktadır. GSK-3 β , uzun süreli belleği düzenlemekte ve sinaptik plastisiteye katkıda bulunmaktadır; ayrıca anormal tau proteininin aşırı fosforlanması da önemli rol oynamaktadır. PI3K, Akt'i etkinleştirir ve GSK-3 β 'nin inaktivasyonunu sağlar. Aktif GSK-3 β 'nin yol açtığı tau hiperfosforilasyonunu engellenir (Kitagishi ve ark., 2014). Aynı şekilde Wnt/ β -katenin yolağında rol oynayan Wnt proteinleri, Frizzled reseptör ailesinin hücre dışı sistin-zengin bölgesine bağlanan ve Wnt yardımcı reseptör düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü ile ilişkilendirilen proteinlerdir. Bu bağlanma, kanonik Wnt/ β -katenin sinyal yolunun aktivasyonunu başlatır. Wnt'in Fzd/LRP5/6 reseptör kompleksine bağlanması, GSK3 β aktivitesinin inhibisyonunu ve sitozolik β -kateninin stabilizasyonunu sonuçlandırır (Jia ve ark., 2019). Literatür sonuçlarının aksine ekstre ve ekstre yüklü NP'lerin uygulanması sonucu GSK-3 β geninin aktivasyonunun arttığı dolayısıyla ekstrelerin PI3K/Akt/GSK-3 β veya Wnt/ β -katenin yolları ile etki göstermediği anlaşılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre etki mekanizmasının aydınlatılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu ortaya konulmuştur.

Bu tez çalışmasında akut toksisite çalışmaları ana çalışmaya başlamadan önce ekstrelerin ve NP'lerin sıçanlar üzerindeki kısa süreli maruziyetin potansiyel zararlarını değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. OECD kılavuzu takip edilerek elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde seçilen en yüksek dozda dahi hayvanlarda herhangi bir mortalitenin görülmemesi, klinik bulguların normal sınırlar içinde olması ve histomorfolojik değerlendirmelerde incelenen karaciğer, böbrek, dalak, akciğer, kalp ve olfaktör bulbus dokularında kontrol grubuna kıyasla önemli farklılık göstermemesi akut bir toksisite oluşturmadıklarını kanıtlamıştır. Feistel ve arkadaşlarının farklı bir *Sideritis* cinsi ile yapmış olduğu çalışmalar elde ettiğimiz verileri desteklemekle beraber çalışmakta olduğumuz alt türlerinin belirtilen doz aralıklarında toksisiteye sahip olmadıklarını göstermektedir. Bu da, *Sideritis* cinsi bitki ekstrelerinin insanlarda tanınmış geleneksel tıbbi kullanımını destekleyen olumlu bir güvenlik profilini onaylamaktadır (Feistel ve ark., 2018).

Bu tez çalışmasında tedavi yolu olarak intranazal yol seçilmiştir. Bu uygulama yolunun seçilme sebepleri şunlardır: Farklı nörodejeneratif ve psikiyatrik bozukluklara yönelik akut veya kronik ilaç tedavileri birçok açıdan zorludur. Oral ilaçların düşük biyoyararlanımı, beyne ulaşabilen miktarının sınırlı olması, hızlı metabolize edilmesi, eliminasyonu, istenmeyen yan etkileri ve

ayrıca ek yüksek doz verilmesi hem hastalar için rahatsızlık hem de aileleri ve toplum için yüksek maliyet anlamına gelmektedir. Bileşiklerin beyine nüfuzunun düşük olmasının nedeni, beyni ksenobiyotiklere karşı KBB'yi aşmak zorunda olmalarıdır. İntranasal ilaç uygulaması, kan-beyin bariyerini aşmak, ilaçların sistemik yan etkilerini azaltmak ve uygulanacak dozları azaltmak için umut verici seçeneklerden biridir. Ayrıca, burun yoluyla uygulanan ilaçların biyoyararlanımının genellikle daha yüksek, yan etkileri daha az ve oral yoldan alınan ilaçlara göre benzer dozlarda daha yüksek beyin maruziyetine neden olmalarının yanında invaziv olmama, yüksek kan akışı, ilaç emilimi için büyük bir yüzey alanı, uygulamanın kolaylığı, hızlı etki başlangıcı, gastrointestinal ve hepatik metabolizmanın önlenmesi gibi birçok avantajı bulunmaktadır (Costa ve ark., 2021; Erdő ve ark., 2018). Anti-Alzheimer etkinin incelendiği hayvan çalışmasında ise intraserebroventriküler yolla bilateral $A\beta_{1-42}$ uygulaması yapılarak hastalık modeli oluşturulmuştur. Operasyon kaynaklı sorunların çalışmayı etkilememesi adına 3 günlük adaptasyon süresinin ardından tedaviye başlanmış ve belirlenen sürelerde hayvanlar davranış testlerine tâbi tutulmuştur.

Açık alan testi hayvan gruplarının lokomotor aktivitesi, keşif davranışı ve kaygısını incelemek için yapılmaktadır. Bunun için 5 parametre (hayvan gruplarının merkez bölgeye girdikleri ilk zaman, merkez bölgede geçirdikleri zaman, katedilen toplam çizgi sayısı, şahlanma sayısı ve süslenme sayısı) değerlendirilmiştir. Gruplar arasında anlamlı değişikliklerin olmamasıyla hayvan gruplarının lokomotor aktivitelerinde cerrahi operasyon sırasında veya sonrasında dış kaynaklı herhangi olumsuz bir sonuca yol açmadığını, böylece cerrahi işlemin hastalık modelini ve tedavi gruplarının sonuçlarını etkilemediği anlaşılmıştır.

Yeni obje tanıma testi, sıçanların yeni bir nesneyi keşfetmek için tanıdık bir nesneden daha fazla zaman harcama yönündeki doğal eğilimine dayanmaktadır. Sıçanlara yapılan $A\beta_{1-42}$ uygulamasının hastalığın insanlardaki klinik belirtilerine çok benzeyen öğrenme ve hafıza bozukluğuyla yol açtığı, yeni obje tanıma testinde tedavi gruplarına kıyasla anlamlı derecede azalmayla sonuçlandığı literatürde yapılan çalışmalarla desteklenmektedir (Zamani ve ark., 2019). Yapmış olduğumuz tez çalışmasında da $A\beta$ ve $A\beta$ +Boş NP grupları benzer sonuçlar gösterirken $A\beta$ +DP, $A\beta$ +SGV Eks, $A\beta$ +SLL Eks, $A\beta$ +SGV NP ve $A\beta$ +SLL NP grupları $A\beta$ grubuna kıyasla yeni obje tanıma sürelerinde artış meydana gelmiştir. Grafikler incelendiğinde ekstre yüklü NP formlarının ekstre gruplarına kıyasla yeni nesnelere daha uzun zaman geçirdikleri de anlaşılmıştır. Arsenijevic ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada da çalışmamıza benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür (Arsenijevic ve ark., 2021).

Pasif kaçınma testi, korkutan şartlardan kaçınmayla ilişkili bilişsel hafızayı değerlendirmek için yapılır. Kemirgenler, doğuştan gelen fotofobi nedeniyle karanlık bölmeyi tercih ederler ve bu testte, karanlık bölmede elektrikli ayak şoku almak, bu eğilimle çatışmaya neden olmaktadır. Bu test aracılığı ile hayvan gruplarına karanlık bölmeye geçmemeleri gerektiği öğretilir (Rashno ve ark., 2022). Bu tez çalışmasında A β grubuna kıyasla tedavi gruplarının karanlık bölgeye geçme süresi anlamlı derecede artış göstermiştir. Hiçbir ekstrenin yüklenmediği A β +Boş NP grubu ise hastalık grubuna benzer sonuçlar göstermiştir. Yeni obje tanıma testi gibi bu testte de ekstre yüklü NP formlarının ekstre gruplarına kıyasla karanlık bölgeye geçiş zamanının daha uzun sürdüğü görülmüştür. Benzer şekilde 2021 yılında Mohammadi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ekstre yüklü NP formunun ekstre formundan daha etkili olduğu kanıtlanmıştır (Mohammadi ve ark., 2021).

Morris'in su tankı, yaklaşık 40 yıl önceki geliştirilmesinden bu yana uzaysal öğrenme ve hafızayı değerlendirmek için çok popüler bir araç olarak kullanılmaktadır. Hayvan gruplarının tank içindeki platformun yerini farklı köşelere konulan yönlendiriciler yardımıyla öğrenmesi ve hatırlaması beklenmektedir (Othman ve ark., 2022). Hayvanların hedef kadrana ulaşma süresi, bu kadranda geçirdikleri zaman ve platformun kaldırılarak testin tekrarlandığı prob gün öğrenme belleğin ölçüsü olarak kabul edildiği bu teste tüm hayvan gruplarının eğitim günlerinde hastalık grubuna kıyasla (A β) platformu bulma sürelerinin gün gün kısaldığı ve prob gününde ise hedef kadranda daha fazla vakit geçirdikleri görülmüştür. Ekstre yüklü NP'ler ile ekstre grupları kıyaslandığında bu sonuçlar üretilen NP formunun ekstrelerin etkinliğini artırdığı şeklinde yorumlanabilir. Literatürde *Sideritis* cinsinin Morris'in su tankı testi kullanarak öğrenme ve belleği artırdığını gösteren çalışmalar mevcut iken nanoteknolojik formülasyonları çalışılmamıştır (Hofrichter ve ark., 2016).

AH modelini oluşturmada kullanılan A β ₁₋₄₂ düzeyleri serebral korteks ve hipokampus dokularında incelenmiştir. Hastalığın indüklendiği ve hiçbir tedavinin uygulanmadığı A β grubunda kontrol grubuna kıyasla daha fazla miktarda A β ₁₋₄₂ miktarı saptanmıştır. Tedavi grupları A β grubu ile kıyaslandığında ise, A β +Boş NP grubu hariç tüm tedavi gruplarında A β ₁₋₄₂ miktarları anlamlı düzeyde düşüş gösterdiği belirlenmiştir. Bu verilerden ekstrelerin ve ekstre yüklü NP'lerin A β ₁₋₄₂ seviyelerini düşürmede etkili birer tedavi edici ajan oldukları tespit edilirken, ekstre yüklenmeyen boş NP formlarının tedaviye olumlu sonuç veremeyeceği sonucuna varılabilir. AH üzerindeki etkilerini incelediğimiz ekstrelerin A β ₁₋₄₂ düzeylerine

etkisini gösteren ELISA ya da başka bir tayin yöntemi ile yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Histopatolojik analizler serebral korteks ve hipokampus dokularında yapılmıştır. Hastalık grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, serebral korteks ve hipokampal bölgelerdeki bazı nöronlarda artmış nükleer piknoz ve dejenerasyon, ayrıca yerel eozinofilik plaklar ve hücre içi/perivasküler ödem gözlemlenmiştir. A β +Boş NP grubunun, A β ile karşılaştırıldığında benzer hasar özellikleri sergilemesi herhangi tedavi edici bir ajan içermemesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, A β +SLL ve A β +SGV tedavi gruplarının, incelenen serebral korteks ve hipokampal bölgelerinde yer yer piknotik hücreler ve hücreSEL bozulmaların bulunduğu görülmüş, ancak bu hasarın iyileşme eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, A β +SLL NP ve A β +SGV NP'lerin beyin bölgelerine uygulanmasının, belirli hasar ölçütlerini tersine çevirerek iyileşmeyi artırdığı, dahası A β +DP grubu ile benzer bir morfoloji sergilediği tespit edilmiştir. Sonrasında aynı dokularda bulunan A β ₁₋₄₂ ve fosforile tau immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Hastalık grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, serebral korteks ve hipokampüste CA2 ve CA3 bölgeleri de dahil olmak üzere yoğun amiloid plakları ve tau proteininin artmış ekspresyonu gözlemlenmiştir. A β +Boş NP ile tedavi edilen grupta da aynı şekilde artışlar tespit edilmiştir. Ancak, bu protein ekspresyonları pozitif kontrol ve SLL/SGV tedavisi uygulanan gruplarda, hasar ile karşılaştırıldığında azaldığı görülmüştür. SGV ve SLL ekstre yüklü NP formlarının ise bu protein ekspresyonları üzerinde daha etkili olduğu anlaşılmıştır. KBB'yi geçme potansiyeli olan ekstre yüklü NP formülasyonları rhodamine B floresan boyası ile boyanmış ve sonrasında beyin dokularında konfokal görüntüleme yapılmıştır Herhangi bir boyamanın yapılmadığı kontrol grubu ile kıyaslandığında SGV NP ve SLL NP gruplarının intranasal uygulama sonrasında KBB'yi aşarak beyne ulaştığı ve burada ışımaya verdiği tespit edilmiştir.

Elde ettiğimiz tüm sonuçlar değerlendirildiğinde üretilen NP formülasyonlarının yenilikçi olmasının yanında uygulanmakta olan tedavi rejimlerinden daha etkili ve güvenilir olduğu ve AH tedavisinde potansiyel bir iyileşme sağlayabileceği anlaşılmıştır. Yapılan çalışmalarla ortaya çıkan verilerin değerlendirilmesi sayesinde literatüre yeni bilgiler kazandırılmıştır. Bundan sonraki süreçte etki mekanizmasının aydınlatılması için yeni çalışmalar yapılacak, elde edilen ürünlerin patentleri alınarak dışa bağımlılığın azalması için adımlar atılacaktır.

8. KAYNAKLAR

- Abdel-Aal, R. A., Assi, A.-A. A. ve Kostandy, B. B. (2011). Rivastigmine reverses aluminum-induced behavioral changes in rats, *European Journal of Pharmacology*, 659(2), 169-176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.03.011>
- Agrawal, I. ve Jha, S. (2020). Mitochondrial Dysfunction and Alzheimer's Disease: Role of Microglia, *Front Aging Neurosci*, 12, 252. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00252>
- Agrawal, M., Prathyusha, E., Ahmed, H., Dubey, S. K., Kesharwani, P., Singhvi, G., Naidu, V. G. M. ve Alexander, A. (2021). Biomaterials in treatment of Alzheimer's disease, *Neurochemistry International*, 145, 105008. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105008>
- Albanese, E., Launer, L. J., Egger, M., Prince, M. J., Giannakopoulos, P., Wolters, F. J. ve Egan, K. (2017). Body mass index in midlife and dementia: systematic review and meta-regression analysis of 589,649 men and women followed in longitudinal studies, *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*, 8, 165-178.
- Alonso, J. M., Escobar-Peso, A., Palomino-Antolín, A., Diez-Iriepa, D., Chioua, M., Martínez-Alonso, E., Iriepa, I., Egea, J., Alcázar, A. ve Marco-Contelles, J. (2021). Privileged Quinolylnitrones for the Combined Therapy of Ischemic Stroke and Alzheimer's Disease, *Pharmaceuticals*, 14(9), 861.
- Aneva, I., Zhelev, P., Kozuharova, E., Danova, K., Nabavi, S. F. ve Behzad, S. (2019). Genus *Sideritis*, section *Empedoclia* in southeastern Europe and Turkey – studies in ethnopharmacology and recent progress of biological activities, *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(1), 407-421. <https://doi.org/10.1007/s40199-019-00261-8>
- Anthony, D. P., Hegde, M., Shetty, S. S., Rafic, T., Mutalik, S. ve Rao, B. S. S. (2021). Targeting receptor-ligand chemistry for drug delivery across blood-brain barrier in brain diseases, *Life Sci*, 274, 119326. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119326>
- Arsenijevic, N., Selakovic, D., Katanic Stankovic, J. S., Mihailovic, V., Mitrovic, S., Milenkovic, J., Milanovic, P., Vasovic, M., Markovic, S. D., Zivanovic, M., Grujic, J., Jovicic, N. ve Rosic, G. (2021). The Beneficial Role of *Filipendula ulmaria* Extract in Prevention of Prodepressant Effect and Cognitive Impairment Induced by Nanoparticles of Calcium Phosphates in Rats, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 6670135. <https://doi.org/10.1155/2021/6670135>

- Atas, M., Eruygur, N., Sozmen, F., Ergul, M., Ergul, M., Akpulat, H. A. ve Ucar, E. (2019). Evaluation of Various Biological Activities of Endemic *Sideritis libanotica* Extracts, *Notulae Scientia Biologicae*, 11(2), 210-217.
- Aykac, A., Ozbeyli, D., Uncu, M., Ertas, B., Kılinc, O., Şen, A., Orun, O. ve Sener, G. (2019). Evaluation of the protective effect of *Myrtus communis* in scopolamine-induced Alzheimer model through cholinergic receptors, *Gene*, 689, 194-201. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.12.007>
- Ball, J. ve Darby, I. (2022). Mental health and periodontal and peri-implant diseases, *Periodontol 2000*, 90(1), 106-124. <https://doi.org/10.1111/prd.12452>
- Barage, S. H. ve Sonawane, K. D. (2015). Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease, *Neuropeptides*, 52, 1-18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.06.008>
- Baser, K. H. C. (2002). Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey, *Pure and Applied Chemistry*, 74(4), 527-545.
- Bateman, R. J., Barthélemy, N. R. ve Horie, K. (2020). Another step forward in blood-based diagnostics for Alzheimer's disease, *Nat Med*, 26(3), 314-316. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0797-4>
- Becker, H. (1990). *Natural Agents and Extracts*. In *Pharmacology of Antihypertensive Therapeutics* (pp. 709-739). Springer.
- Bekris, L. M., Yu, C. E., Bird, T. D. ve Tsuang, D. W. (2010). Genetics of Alzheimer disease, *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 23(4), 213-227. <https://doi.org/10.1177/0891988710383571>
- Bliss, T., Collingridge, G. ve Morris, R. 2014. "Synaptic plasticity in health and disease: introduction and overview". In (Vol. 369, pp. 20130129): The Royal Society.
- Bolós, M., Perea, J. R. ve Avila, J. (2017). Alzheimer's disease as an inflammatory disease, *Biomolecular concepts*, 8(1), 37-43.
- Bondi, M. W., Edmonds, E. C. ve Salmon, D. P. (2017). Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future, *J Int Neuropsychol Soc*, 23(9-10), 818-831. <https://doi.org/10.1017/s135561771700100x>

- Bowen, D. M., Smith, C. B., White, P. ve Davison, A. N. (1976). Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies, *Brain*, 99(3), 459-496. <https://doi.org/10.1093/brain/99.3.459>
- Brambilla, D., Le Droumaguet, B., Nicolas, J., Hashemi, S. H., Wu, L.-P., Moghimi, S. M., Couvreur, P. ve Andrieux, K. (2011). Nanotechnologies for Alzheimer's disease: diagnosis, therapy, and safety issues, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(5), 521-540. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.03.008>
- Calero, M., Gómez-Ramos, A., Calero, O., Soriano, E., Avila, J. ve Medina, M. (2015). Additional mechanisms conferring genetic susceptibility to Alzheimer's disease, *Front Cell Neurosci*, 9, 138. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00138>
- Cam, M. E., Ertas, B., Alenezi, H., Hazar-Yavuz, A. N., Cesur, S., Ozcan, G. S., Ekentok, C., Guler, E., Katsakouli, C., Demirbas, Z., Akakin, D., Eroglu, M. S., Kabasakal, L., Gunduz, O. ve Edirisinghe, M. (2021). Accelerated diabetic wound healing by topical application of combination oral antidiabetic agents-loaded nanofibrous scaffolds: An in vitro and in vivo evaluation study, *Materials Science and Engineering: C*, 119, 111586. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111586>
- Carroll, J. C., Iba, M., Bangasser, D. A., Valentino, R. J., James, M. J., Brunden, K. R., Lee, V. M. ve Trojanowski, J. Q. (2011). Chronic stress exacerbates tau pathology, neurodegeneration, and cognitive performance through a corticotropin-releasing factor receptor-dependent mechanism in a transgenic mouse model of tauopathy, *J Neurosci*, 31(40), 14436-14449. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3836-11.2011>
- Caruso, A., Nicoletti, F., Gaetano, A. ve Scaccianoce, S. (2019). Risk Factors for Alzheimer's Disease: Focus on Stress, *Front Pharmacol*, 10, 976. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00976>
- Castillo, W. O., Palomino, N. V., Takahashi, C. S. ve Giuliatti, S. (2020). Genistein and Galantamine Combinations Decrease β -Amyloid Peptide (1–42)–Induced Genotoxicity and Cell Death in SH-SY5Y Cell Line: an In Vitro and In Silico Approach for Mimic of Alzheimer's Disease, *Neurotoxicity Research*, 38(3), 691-706. <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00243-8>

- Cenini, G. ve Voos, W. (2019). Mitochondria as Potential Targets in Alzheimer Disease Therapy: An Update, *Front Pharmacol*, 10, 902. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00902>
- Ceylan, R., Zengin, G. ve Aktümsek, A. (2019). GC-MS Analysis and Antioxidant Potential of Essential Oil from Endemic *Sideritis rubriflora* Hub.-Mor, *Proceedings*, 40(1), 24.
- Chakraborty, A., de Wit, N. M., van der Flier, W. M. ve de Vries, H. E. (2017). The blood brain barrier in Alzheimer's disease, *Vascul Pharmacol*, 89, 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2016.11.008>
- Chatterjee, S. ve Mudher, A. (2018). Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes: A Critical Assessment of the Shared Pathological Traits, *Front Neurosci*, 12, 383. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00383>
- Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C. ve Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease, *Redox Biol*, 14, 450-464. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>
- Chen, J., Sun, Z., Jin, M., Tu, Y., Wang, S., Yang, X., Chen, Q., Zhang, X., Han, Y. ve Pi, R. (2017). Inhibition of AGEs/RAGE/Rho/ROCK pathway suppresses non-specific neuroinflammation by regulating BV2 microglial M1/M2 polarization through the NF- κ B pathway, *Journal of neuroimmunology*, 305, 108-114.
- Chen, Y.-C., Hsieh, W.-Y., Lee, W.-F. ve Zeng, D.-T. (2011). Effects of surface modification of PLGA-PEG-PLGA nanoparticles on loperamide delivery efficiency across the blood-brain barrier, *Journal of Biomaterials Applications*, 27(7), 909-922. <https://doi.org/10.1177/0885328211429495>
- Chou, T.-C. (2018). The combination index (CI < 1) as the definition of synergism and of synergy claims, *Synergy*, 7, 49-50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.synres.2018.04.001>
- Chou, T. ve Martin, N. (2005). CompuSyn for drug combinations: PC software and user's guide: a computer program for quantitation of synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC50 and ED50 and LD50 values, *ComboSyn, Paramus, NJ*.

- Chuang, Y.-F., An, Y., Bilgel, M., Wong, D. F., Troncoso, J. C., O'Brien, R. J., Breitner, J., Ferruci, L., Resnick, S. M. ve Thambisetty, M. (2016). Midlife adiposity predicts earlier onset of Alzheimer's dementia, neuropathology and presymptomatic cerebral amyloid accumulation, *Molecular psychiatry*, 21(7), 910-915.
- Citak, S., Sagir, Z. O., Carikci, S., Kilic, T. ve Azizoglu, A. (2014). Experimental and theoretical study on linearol isolated from *Sideritis* species, *Rev. Roum. Chim*, 59(3-4), 227-234.
- Colonna, M. ve Wang, Y. (2016). TREM2 variants: new keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis, *Nature Reviews Neuroscience*, 17(4), 201-207.
- Costa, C. P., Moreira, J. N., Sousa Lobo, J. M. ve Silva, A. C. (2021). Intranasal delivery of nanostructured lipid carriers, solid lipid nanoparticles and nanoemulsions: A current overview of in vivo studies, *Acta Pharm Sin B*, 11(4), 925-940. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.02.012>
- Coulson, E. J., Paliga, K., Beyreuther, K. ve Masters, C. L. (2000). What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function, *Neurochemistry International*, 36(3), 175-184. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(99\)00125-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0197-0186(99)00125-4)
- Cummings, J., Ritter, A. ve Zhong, K. (2018). Clinical Trials for Disease-Modifying Therapies in Alzheimer's Disease: A Primer, Lessons Learned, and a Blueprint for the Future, *J Alzheimers Dis*, 64(s1), S3-s22. <https://doi.org/10.3233/jad-179901>
- Cummings, J. L., Tong, G. ve Ballard, C. (2019). Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options, *J Alzheimers Dis*, 67(3), 779-794. <https://doi.org/10.3233/jad-180766>
- Dafsari, F. S. ve Jessen, F. (2020). Depression—an underrecognized target for prevention of dementia in Alzheimer's disease, *Translational Psychiatry*, 10(1), 160. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0839-1>
- Davies, P. ve Maloney, A. J. F. (1976). Selective Loss of Central Cholinergic Neurons in Alzheimer's Disease, *The Lancet*, 308(8000), 1403. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(76\)91936-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(76)91936-X)
- Davis, P. (2019). *Flora of Turkey, Volume 8*. Edinburgh University Press.

- de Nazareth, A. M. (2017). Type 2 diabetes mellitus in the pathophysiology of Alzheimer's disease, *Dement Neuropsychol*, 11(2), 105-113. <https://doi.org/10.1590/1980-57642016dn11-020002>
- Demirtas, I., Ayhan, B., Sahin, A., Aksit, H., Elmastas, M. ve Telci, I. (2011). Antioxidant activity and chemical composition of *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis* (Bentham) Borm.(Lamiaceae), *Natural product research*, 25(16), 1512-1523.
- Deveci, E., Tel-Çayan, G., Duru, M. E. ve Öztürk, M. (2019). Phytochemical contents, antioxidant effects, and inhibitory activities of key enzymes associated with Alzheimer's disease, ulcer, and skin disorders of *Sideritis albiflora* and *Sideritis leptoclada*, *Journal of Food Biochemistry*, 43(12), e13078. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfbc.13078>
- Dourado, N. S., Souza, C. d. S., De Almeida, M. M. A., Bispo da Silva, A., Dos Santos, B. L., Silva, V. D. A., De Assis, A. M., da Silva, J. S., Souza, D. O. ve Costa, M. d. F. D. (2020). Neuroimmunomodulatory and neuroprotective effects of the flavonoid apigenin in in vitro models of neuroinflammation associated with Alzheimer's disease, *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12, 119.
- Dubois, B., Villain, N., Frisoni, G. B., Rabinovici, G. D., Sabbagh, M., Cappa, S., Bejanin, A., Bombois, S., Epelbaum, S. ve Teichmann, M. (2021). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: recommendations of the International Working Group, *The Lancet Neurology*, 20(6), 484-496.
- Durazzo, T. C., Mattsson, N. ve Weiner, M. W. (2014). Smoking and increased Alzheimer's disease risk: a review of potential mechanisms, *Alzheimers Dement*, 10(3 Suppl), S122-145. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.04.009>
- Dziurka, M., Kubica, P., Kwiecień, I., Biesaga-Kościelniak, J., Ekiert, H., Abdelmohsen, S. A. M., Al-Harbi, F. F., El-Ansary, D. O., Elansary, H. O. ve Szopa, A. (2021). In Vitro Cultures of Some Medicinal Plant Species (*Cistus × incanus*, *Verbena officinalis*, *Scutellaria lateriflora*, and *Scutellaria baicalensis*) as a Rich Potential Source of Antioxidants—Evaluation by CUPRAC and QUENCHER-CUPRAC Assays, *Plants*, 10(3), 454.

- E. Hirbec, H., Noristani, H. N. ve Perrin, F. E. (2017). Microglia responses in acute and chronic neurological diseases: what microglia-specific transcriptomic studies taught (and did not teach) us, *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 227.
- El-Sewify, I. M., Radwan, A., Elghazawy, N. H., Fritzsche, W. ve Azzazy, H. M. E. (2022). Optical chemosensors for environmental monitoring of toxic metals related to Alzheimer's disease, *RSC Adv*, 12(50), 32744-32755. <https://doi.org/10.1039/d2ra05384e>
- Elahi, F. M., Casaletto, K. B., La Joie, R., Walters, S. M., Harvey, D., Wolf, A., Edwards, L., Rivera-Contreras, W., Karydas, A., Cobigo, Y., Rosen, H. J., DeCarli, C., Miller, B. L., Rabinovici, G. D. ve Kramer, J. H. (2020). Plasma biomarkers of astrocytic and neuronal dysfunction in early- and late-onset Alzheimer's disease, *Alzheimers Dement*, 16(4), 681-695. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.09.004>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr. ve Feather-Stone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem Pharmacol*, 7, 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Erdő, F., Bors, L. A., Farkas, D., Bajza, Á. ve Gizurarson, S. (2018). Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting, *Brain Research Bulletin*, 143, 155-170. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.10.009>
- Everest, A. ve Ozturk, E. (2005). Focusing on the ethnobotanical uses of plants in Mersin and Adana provinces (Turkey), *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 1(1), 1-6.
- Fachriyah, E. (2017). Cinnamomum casia extract encapsulated Nanochitosan as Antihypercholesterol. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering,
- Falsetti, L., Viticchi, G., Zaccone, V., Guerrieri, E., Moroncini, G., Luzzi, S. ve Silvestrini, M. (2022). Shared molecular mechanisms among Alzheimer's disease, neurovascular unit dysfunction and vascular risk factors: a narrative review, *Biomedicines*, 10(2), 439.
- Feistel, B., Wegener, T., Rzymiski, P. ve Pischel, I. (2018). Assessment of the acute and subchronic toxicity and mutagenicity of *Sideritis scardica* Griseb. extracts, *Toxins*, 10(7), 258.
- Ferrer, I. (2017). Diversity of astroglial responses across human neurodegenerative disorders and brain aging, *Brain Pathol*, 27(5), 645-674. <https://doi.org/10.1111/bpa.12538>

- Fish, P. V., Steadman, D., Bayle, E. D. ve Whiting, P. (2019). New approaches for the treatment of Alzheimer's disease, *Bioorg Med Chem Lett*, 29(2), 125-133. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.11.034>
- Fu, W., Chen, J., Cai, Y., Lei, Y., Chen, L., Pei, L., Zhou, D., Liang, X. ve Ruan, J. (2010). Antioxidant, free radical scavenging, anti-inflammatory and hepatoprotective potential of the extract from *Parathelypteris nipponica* (Franch. et Sav.) Ching, *Journal of Ethnopharmacology*, 130(3), 521-528. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.039>
- Fu, X., Kong, W., Zhang, Y., Jiang, L., Wang, J. ve Lei, J. (2015). Novel solid–solid phase change materials with biodegradable trihydroxy surfactants for thermal energy storage, *RSC Advances*, 5(84), 68881-68889.
- Gao, C., Xiao, G. ve Hu, J. (2014). Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by posttranslational modifications, *Cell & bioscience*, 4(1), 1-20.
- Giri, M., Zhang, M. ve Lü, Y. (2016). Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status, *Clin Interv Aging*, 11, 665-681. <https://doi.org/10.2147/cia.S105769>
- Gocmez, S. S., Şahin, T. D., Yazir, Y., Duruksu, G., Eraldemir, F. C., Polat, S. ve Utkan, T. (2019). Resveratrol prevents cognitive deficits by attenuating oxidative damage and inflammation in rat model of streptozotocin diabetes induced vascular dementia, *Physiol Behav*, 201, 198-207. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.12.012>
- Golde, T. E., Dickson, D. ve Hutton, M. (2006). Filling the gaps in the abeta cascade hypothesis of Alzheimer's disease, *Curr Alzheimer Res*, 3(5), 421-430. <https://doi.org/10.2174/156720506779025189>
- Gregory, J., Vengalasetti, Y. V., Bredesen, D. E. ve Rao, R. V. (2021). Neuroprotective Herbs for the Management of Alzheimer's Disease, *Biomolecules*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/biom11040543>
- Gülcan, Z., Saltan, N., İşcan, G., Kürkçüoğlu, M. ve Köse, Y. B. (2022). Antimicrobial and antioxidant activities of *Sideritis lanata* L. extracts, *European Journal of Life Sciences*, 1(2), 63-79.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. ve Baser, K. 2000. "Flora of Turkey and the East Aegean Islands (supplement), Edinburgh". In: Edinburgh Univ. Press.

- Güvenç, A., Houghton, P. J., Duman, H., Coşkun, M. ve Şahin, P. (2005). Antioxidant Activity Studies on Selected Sideritis. Species Native to Turkey, *Pharmaceutical Biology*, 43(2), 173-177. <https://doi.org/10.1080/13880200590919528>
- Hampel, H., Mesulam, M.-M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Cavedo, E., Snyder, P. J. ve Khachaturian, Z. S. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease, *Brain*, 141(7), 1917-1933. <https://doi.org/10.1093/brain/awy132>
- Hanafi-Bojd, M. Y., Jaafari, M. R., Ramezani, N., Xue, M., Amin, M., Shahtahmassebi, N. ve Malaek-Nikouei, B. (2015). Surface functionalized mesoporous silica nanoparticles as an effective carrier for epirubicin delivery to cancer cells, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 89, 248-258.
- Hase, T., Shishido, S., Yamamoto, S., Yamashita, R., Nukima, H., Taira, S., Toyoda, T., Abe, K., Hamaguchi, T. ve Ono, K. (2019). Rosmarinic acid suppresses Alzheimer's disease development by reducing amyloid β aggregation by increasing monoamine secretion, *Scientific Reports*, 9(1), 8711.
- Hodson, R. (2018). Alzheimer's disease, *Nature*, 559(7715), S1. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-05717-6>
- Hofrichter, J., Krohn, M., Schumacher, T., Lange, C., Feistel, B., Walbroel, B. ve Pahnke, J. (2016). Sideritis spp. Extracts Enhance Memory and Learning in Alzheimer's β -Amyloidosis Mouse Models and Aged C57Bl/6 Mice, *J Alzheimers Dis*, 53(3), 967-980. <https://doi.org/10.3233/jad-160301>
- Hong, S., Dissing-Olesen, L. ve Stevens, B. (2016). New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease, *Current opinion in neurobiology*, 36, 128-134.
- Huang, H. C., Zheng, B. W., Guo, Y., Zhao, J., Zhao, J. Y., Ma, X. W. ve Jiang, Z. F. (2016). Antioxidative and Neuroprotective Effects of Curcumin in an Alzheimer's Disease Rat Model Co-Treated with Intracerebroventricular Streptozotocin and Subcutaneous D-Galactose, *J Alzheimers Dis*, 52(3), 899-911. <https://doi.org/10.3233/jad-150872>
- Huang, N., Lu, S., Liu, X.-G., Zhu, J., Wang, Y.-J. ve Liu, R.-T. (2017). PLGA nanoparticles modified with a BBB-penetrating peptide co-delivering A β generation inhibitor and curcumin attenuate memory deficits and neuropathology in Alzheimer's disease mice, *Oncotarget*, 8(46), 81001-81013. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20944>

- Huang, X. (2020). *Alzheimer's Disease: Drug Discovery*. In X. Huang (Ed.), *Alzheimer's Disease: Drug Discovery*. Exon Publications Copyright©. Exon Publications. <https://doi.org/10.36255/exonpublications.alzheimersdisease.2020>
- Inaishi, J. ve Saisho, Y. (2020). Beta-Cell Mass in Obesity and Type 2 Diabetes, and Its Relation to Pancreas Fat: A Mini-Review, *Nutrients*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/nu12123846>
- Inestrosa, N. C. ve Toledo, E. M. (2008). The role of Wnt signaling in neuronal dysfunction in Alzheimer's Disease, *Molecular neurodegeneration*, 3(1), 1-13.
- Ionescu-Tucker, A. ve Cotman, C. W. (2021). Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease, *Neurobiology of Aging*, 107, 86-95. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.07.014>
- Jayaramudu, T., Raghavendra, G. M., Varaprasad, K., Reddy, G. V. S., Reddy, A. B., Sudhakar, K. ve Sadiku, E. R. (2016). Preparation and characterization of poly (ethylene glycol) stabilized nano silver particles by a mechanochemical assisted ball mill process, *Journal of Applied Polymer Science*, 133(7).
- Jia, L., Piña-Crespo, J. ve Li, Y. (2019). Restoring Wnt/ β -catenin signaling is a promising therapeutic strategy for Alzheimer's disease, *Molecular brain*, 12(1), 1-11.
- Johri, A. (2021). Disentangling Mitochondria in Alzheimer's Disease, *Int J Mol Sci*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/ijms222111520>
- Jose, S., Sowmya, S., Cinu, T. A., Aleykutty, N. A., Thomas, S. ve Souto, E. B. (2014). Surface modified PLGA nanoparticles for brain targeting of Bacoside-A, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63, 29-35. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.06.024>
- Joseph, A., Simo, G. M., Gao, T., Alhindi, N., Xu, N., Graham, D. J., Gamble, L. J. ve Nance, E. (2021). Surfactants influence polymer nanoparticle fate within the brain, *Biomaterials*, 277, 121086. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121086>
- Joy, T., Rao, M. S. ve Madhyastha, S. (2018). N-Acetyl Cysteine Supplement Minimize Tau Expression and Neuronal Loss in Animal Model of Alzheimer's Disease, *Brain Sciences*, 8(10), 185.

- Khan, N. H., Mir, M., Ngowi, E. E., Zafar, U., Khakwani, M. M. A. K., Khattak, S., Zhai, Y.-K., Jiang, E.-S., Zheng, M., Duan, S.-F., Wei, J.-S., Wu, D.-D. ve Ji, X.-Y. (2021). Nanomedicine: A Promising Way to Manage Alzheimer's Disease, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 630055-630055. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.630055>
- Kitagishi, Y., Nakanishi, A., Ogura, Y. ve Matsuda, S. (2014). Dietary regulation of PI3K/AKT/GSK-3 β pathway in Alzheimer's disease, *Alzheimer's Research & Therapy*, 6(3), 35. <https://doi.org/10.1186/alzrt265>
- Koepsell, T. D. ve Monsell, S. E. (2012). Reversion from mild cognitive impairment to normal or near-normal cognition: risk factors and prognosis, *Neurology*, 79(15), 1591-1598. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31826e26b7>
- Koromili, M., Kapourani, A., Koletti, A., Papandreou, G., Assimopoulou, A. N., Lazari, D. ve Barmpalexis, P. (2022). Preparation and Evaluation of Siderol Amorphous Solid Dispersions: Selection of Suitable Matrix/Carrier, *AAPS PharmSciTech*, 23(6), 214.
- Kulkarni, S. A. ve Feng, S.-S. (2013). Effects of Particle Size and Surface Modification on Cellular Uptake and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery, *Pharmaceutical Research*, 30(10), 2512-2522. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0958-3>
- Kumar, A., Singh, A. ve Ekavali. (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update, *Pharmacological Reports*, 67(2), 195-203. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.09.004>
- Kumara, R., Sahoo, G. C., Pandeya, K., Dasa, V., Yousuf, M., Ansaria, S. R. ve Dasa, P. (2014). PLGA-PEG Encapsulated sitamaquine nanoparticles drug delivery system against *Leishmania donovani*, *J. Sci. Innov. Res*, 3, 85-90.
- Kwon, Y. (2017). Luteolin as a potential preventive and therapeutic candidate for Alzheimer's disease, *Experimental Gerontology*, 95, 39-43.
- Landeiro, F., Mughal, S., Walsh, K., Nye, E., Morton, J., Williams, H., Ghinai, I., Castro, Y., Leal, J., Roberts, N., Wace, H., Handels, R., Lecomte, P., Gustavsson, A., Roncancio-Diaz, E., Belger, M., Jhuti, G. S., Bouvy, J. C., Potashman, M. H., Tockhorn-Heidenreich, A. ve Gray, A. M. (2020). Health-related quality of life in people with predementia Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or dementia measured

- with preference-based instruments: a systematic literature review, *Alzheimers Res Ther*, 12(1), 154. <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00723-1>
- León, A., Reuquen, P., Garín, C., Segura, R., Vargas, P., Zapata, P. ve Orihuela, P. A. (2017). FTIR and Raman Characterization of TiO₂ Nanoparticles Coated with Polyethylene Glycol as Carrier for 2-Methoxyestradiol, *Applied Sciences*, 7(1), 49.
- Liguori, C., Maestri, M., Spanetta, M., Placidi, F., Bonanni, E., Mercuri, N. B. ve Guarnieri, B. (2021). Sleep-disordered breathing and the risk of Alzheimer's disease, *Sleep Medicine Reviews*, 55, 101375. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.smr.2020.101375>
- Liu, P. P., Xie, Y., Meng, X. Y. ve Kang, J. S. (2019). History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease, *Signal Transduct Target Ther*, 4, 29. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0063-8>
- Liu, S., Gao, J., Zhu, M., Liu, K. ve Zhang, H. L. (2020). Gut Microbiota and Dysbiosis in Alzheimer's Disease: Implications for Pathogenesis and Treatment, *Mol Neurobiol*, 57(12), 5026-5043. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02073-3>
- Lombardo, S. M., Schneider, M., Türeli, A. E. ve Günday Türeli, N. (2020). Key for crossing the BBB with nanoparticles: the rational design, *Beilstein J Nanotechnol*, 11, 866-883. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.72>
- Long, J. M. ve Holtzman, D. M. (2019). Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies, *Cell*, 179(2), 312-339. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.001>
- Lopez, O. L. ve Kuller, L. H. (2019). Chapter 9 - Epidemiology of aging and associated cognitive disorders: Prevalence and incidence of Alzheimer's disease and other dementias. In S. T. Dekosky & S. Asthana (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 167, pp. 139-148). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804766-8.00009-1>
- Lucey, B. P. ve Bateman, R. J. (2014). Amyloid- β diurnal pattern: possible role of sleep in Alzheimer's disease pathogenesis, *Neurobiol Aging*, 35 Suppl 2, S29-34. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.035>
- Manek, E., Darvas, F. ve Petroianu, G. A. (2020). Use of Biodegradable, Chitosan-Based Nanoparticles in the Treatment of Alzheimer's Disease, *Molecules*, 25(20), 4866.

- Martens, Y. A., Zhao, N., Liu, C. C., Kanekiyo, T., Yang, A. J., Goate, A. M., Holtzman, D. M. ve Bu, G. (2022). ApoE Cascade Hypothesis in the pathogenesis of Alzheimer's disease and related dementias, *Neuron*, 110(8), 1304-1317. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.03.004>
- Martins, C., Sousa, F., Araujo, F. ve Sarmiento, B. (2018). Functionalizing PLGA and PLGA derivatives for drug delivery and tissue regeneration applications, *Advanced healthcare materials*, 7(1), 1701035.
- Matilla-Mora, R., Martínez-Piédrola, R. M. ve Fernández Huete, J. (2016). [Effectiveness of occupational therapy and other non-pharmacological therapies in cognitive impairment and Alzheimer's disease], *Rev Esp Geriatr Gerontol*, 51(6), 349-356. <https://doi.org/10.1016/j.regg.2015.10.006> (Eficacia de la terapia ocupacional y otras terapias no farmacológicas en el deterioro cognitivo y la enfermedad de Alzheimer.)
- Menting, K. W. ve Claassen, J. A. H. R. (2014). β -secretase inhibitor; a promising novel therapeutic drug in Alzheimer's disease, *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00165>
- Mishra, C. B., Manral, A., Kumari, S., Saini, V. ve Tiwari, M. (2016). Design, synthesis and evaluation of novel indandione derivatives as multifunctional agents with cholinesterase inhibition, anti- β -amyloid aggregation, antioxidant and neuroprotection properties against Alzheimer's disease, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(16), 3829-3841. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.06.027>
- Mohammadi, R., Ebrahimi-Hosseinzadeh, B., Khodagholi, F., Hatamian-Zarmi, A. ve Malekpour-Galogahi, F. (2021). Preparation, characterization, and in vivo evaluation of Rose damascene extract loaded solid lipid nanoparticles for targeted brain delivery, *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 19(2), 1373-1382. <https://doi.org/10.1007/s40201-021-00693-y>
- Mollaeva, M. R., Yabbarov, N., Sokol, M., Chirkina, M., Mollaev, M. D., Zabolotskii, A., Seregina, I., Bolshov, M., Kaplun, A. ve Nikolskaya, E. (2021). Optimization, characterization and pharmacokinetic study of meso-tetraphenylporphyrin metal complex-loaded PLGA nanoparticles, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12261.

- Moulton, P. V. ve Yang, W. (2012). Air pollution, oxidative stress, and Alzheimer's disease, *J Environ Public Health*, 2012, 472751. <https://doi.org/10.1155/2012/472751>
- Olsson, B., Lautner, R., Andreasson, U., Öhrfelt, A., Portelius, E., Bjerke, M., Hölttä, M., Rosén, C., Olsson, C., Strobel, G., Wu, E., Dakin, K., Petzold, M., Blennow, K. ve Zetterberg, H. (2016). CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Neurol*, 15(7), 673-684. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(16\)00070-3](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(16)00070-3)
- Othman, M. Z., Hassan, Z. ve Che Has, A. T. (2022). Morris water maze: a versatile and pertinent tool for assessing spatial learning and memory, *Exp Anim*, 71(3), 264-280. <https://doi.org/10.1538/expanim.21-0120>
- Paxinos, G. ve Watson, C. (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. Elsevier.
- Peng, B., Yang, Q., R, B. J., Liu, Y., Akbar, M., Song, B. J., Zhou, S. ve Wang, X. (2020). Role of Alcohol Drinking in Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis, *Int J Mol Sci*, 21(7). <https://doi.org/10.3390/ijms21072316>
- Pereira, E. D., Cerruti, R., Fernandes, E., Peña, L., Saez, V., Pinto, J. C., Ramón, J. A., Oliveira, G. E. ve Souza Júnior, F. G. d. (2016). Influence of PLGA and PLGA-PEG on the dissolution profile of oxaliplatin, *Polímeros*, 26, 137-143.
- Perl, D. P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease, *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*, 77(1), 32-42.
- Pillot, T., Drouet, B., Queillé, S., Labeur, C., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M., Pinçon-Raymond, M. ve Chambaz, J. (1999). The Nonfibrillar Amyloid β -Peptide Induces Apoptotic Neuronal Cell Death, *Journal of Neurochemistry*, 73(4), 1626-1634. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0731626.x>
- Pinheiro, L. ve Faustino, C. (2019). Therapeutic Strategies Targeting Amyloid- β in Alzheimer's Disease, *Curr Alzheimer Res*, 16(5), 418-452. <https://doi.org/10.2174/1567205016666190321163438>

- Porsteinsson, A. P., Isaacson, R. S., Knox, S., Sabbagh, M. N. ve Rubino, I. (2021). Diagnosis of Early Alzheimer's Disease: Clinical Practice in 2021, *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 8(3), 371-386. <https://doi.org/10.14283/jpad.2021.23>
- Prakash, A., Medhi, B. ve Chopra, K. (2013). Granulocyte colony stimulating factor (GCSF) improves memory and neurobehavior in an amyloid- β induced experimental model of Alzheimer's disease, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 110, 46-57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.05.015>
- Prasanna, P. ve Upadhyay, A. (2021). Flavonoid-Based Nanomedicines in Alzheimer's Disease Therapeutics: Promises Made, a Long Way To Go, *ACS Pharmacol Transl Sci*, 4(1), 74-95. <https://doi.org/10.1021/acspsci.0c00224>
- Qiu, C., Kivipelto, M. ve von Strauss, E. (2009). Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention, *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 11(2), 111-128. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2009.11.2/cqiu>
- Radojević, I. D., Stanković, M. S., Stefanović, O. D., Topuzović, M. D. ve Čomić, L. R. (2012). Antioxidative and antimicrobial properties of different extracts from *Sideritis montana* L, *Romanian biotechnological letters*, 17(2), 7015.
- Rashno, M., Gholipour, P., Salehi, I., Komaki, A., Rashidi, K., Esmail Khoshnam, S. ve Ghaderi, S. (2022). p-Coumaric acid mitigates passive avoidance memory and hippocampal synaptic plasticity impairments in aluminum chloride-induced Alzheimer's disease rat model, *Journal of Functional Foods*, 94, 105117. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105117>
- Rasmussen Eid, H., Rosness, T. A., Bosnes, O., Salvesen, Ø., Knutli, M. ve Stordal, E. (2019). Smoking and Obesity as Risk Factors in Frontotemporal Dementia and Alzheimer's Disease: The HUNT Study, *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*, 9(1), 1-10. <https://doi.org/10.1159/000495607>
- Reddy, S., Tatiparti, K., Sau, S. ve Iyer, A. K. (2021). Recent advances in nano delivery systems for blood-brain barrier (BBB) penetration and targeting of brain tumors, *Drug Discovery Today*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.04.008>
- Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Schmitt, F., Ferris, S. ve Möbius, H. J. (2003). Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease, *N Engl J Med*, 348(14), 1333-1341. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa013128>

- Sadeghi-Avalshahr, A., Nokhasteh, S., Molavi, A. M., Khorsand-Ghayeni, M. ve Mahdavi-Shahri, M. (2017). Synthesis and characterization of collagen/PLGA biodegradable skin scaffold fibers, *Regen Biomater*, 4(5), 309-314. <https://doi.org/10.1093/rb/rbx026>
- Santonocito, D., Raciti, G., Campisi, A., Sposito, G., Panico, A., Siciliano, E. A., Sarpietro, M. G., Damiani, E. ve Puglia, C. (2021). Astaxanthin-loaded stealth lipid nanoparticles (AST-SSLN) as potential carriers for the treatment of alzheimer's disease: Formulation development and optimization, *Nanomaterials*, 11(2), 391.
- Saraiva, C., Praça, C., Ferreira, R., Santos, T., Ferreira, L. ve Bernardino, L. (2016). Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases, *Journal of Controlled Release*, 235, 34-47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.044>
- Se Thoe, E., Fauzi, A., Tang, Y. Q., Chamyuang, S. ve Chia, A. Y. Y. (2021). A review on advances of treatment modalities for Alzheimer's disease, *Life Sciences*, 276, 119129. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119129>
- Séguy, L., Groo, A.-C. ve Malzert-Fréon, A. (2022). How nano-engineered delivery systems can help marketed and repurposed drugs in Alzheimer's disease treatment?, *Drug Discovery Today*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.02.022>
- Sehar, U., Rawat, P., Reddy, A. P., Kopel, J. ve Reddy, P. H. (2022). Amyloid Beta in Aging and Alzheimer's Disease, *Int J Mol Sci*, 23(21). <https://doi.org/10.3390/ijms232112924>
- Seju, U., Kumar, A. ve Sawant, K. K. (2011). Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: In vitro and in vivo studies, *Acta Biomaterialia*, 7(12), 4169-4176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.07.025>
- Selkoe, D. J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease, *Neuron*, 6(4), 487-498. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90052-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90052-2)
- Serrano-Pozo, A. ve Growdon, J. H. (2019). Is Alzheimer's disease risk modifiable?, *Journal of alzheimer's disease*, 67(3), 795-819.
- Shi, L., Chen, S. J., Ma, M. Y., Bao, Y. P., Han, Y., Wang, Y. M., Shi, J., Vitiello, M. V. ve Lu, L. (2018). Sleep disturbances increase the risk of dementia: A systematic review and meta-analysis, *Sleep Med Rev*, 40, 4-16. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2017.06.010>

- Shokri-Kojori, E., Wang, G. J., Wiers, C. E., Demiral, S. B., Guo, M., Kim, S. W., Lindgren, E., Ramirez, V., Zehra, A., Freeman, C., Miller, G., Manza, P., Srivastava, T., De Santi, S., Tomasi, D., Benveniste, H. ve Volkow, N. D. (2018). β -Amyloid accumulation in the human brain after one night of sleep deprivation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(17), 4483-4488. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721694115>
- Silva, M. V. F., Loures, C. M. G., Alves, L. C. V., de Souza, L. C., Borges, K. B. G. ve Carvalho, M. D. G. (2019). Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures, *J Biomed Sci*, 26(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0524-y>
- Soria Lopez, J. A., González, H. M. ve Léger, G. C. (2019). *Chapter 13 - Alzheimer's disease*. In S. T. Dekosky & S. Asthana (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 167, pp. 231-255). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3>
- Stakos, D. A., Stamatelopoulos, K., Bampatsias, D., Sachse, M., Zormpas, E., Vlachogiannis, N. I., Tual-Chalot, S. ve Stellos, K. (2020). The Alzheimer's Disease Amyloid-Beta Hypothesis in Cardiovascular Aging and Disease: JACC Focus Seminar, *J Am Coll Cardiol*, 75(8), 952-967. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.12.033>
- Sucu, B. O., Ipek, O. S., Kurtulus, S. O., Yazici, B. E., Karakas, N. ve Guzel, M. (2019). Synthesis of novel methyl jasmonate derivatives and evaluation of their biological activity in various cancer cell lines, *Bioorganic Chemistry*, 91, 103146. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103146>
- Sun, S.-B., Liu, P., Shao, F.-M. ve Miao, Q.-L. (2015). Formulation and evaluation of PLGA nanoparticles loaded capecitabine for prostate cancer, *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(10), 19670-19681.
- Swerdlow, R. H., Burns, J. M. ve Khan, S. M. (2010). The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis, *J Alzheimers Dis*, 20 Suppl 2(Suppl 2), S265-279. <https://doi.org/10.3233/jad-2010-100339>
- Şimşek Sezer, E. N. ve Uysal, T. (2021). Phytochemical Analysis, Antioxidant and Anticancer Potential of *Sideritis niveotomentosa*: Endemic Wild Species of Turkey, *Molecules*, 26(9), 2420.
- Taliyan, R., Kakoty, V., Sarathlal, K. C., Kharavtekar, S. S., Karennanavar, C. R., Choudhary, Y. K., Singhvi, G., Riadi, Y., Dubey, S. K. ve Kesharwani, P. (2022). Nanocarrier

- mediated drug delivery as an impeccable therapeutic approach against Alzheimer's disease, *Journal of Controlled Release*, 343, 528-550. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.01.044>
- Tang, H., Zhang, Y., Li, D., Fu, S., Tang, M., Wan, L., Chen, K., Liu, Z., Xue, L. ve Peng, A. (2018). Discovery and synthesis of novel magnolol derivatives with potent anticancer activity in non-small cell lung cancer, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 156, 190-205.
- Taşkın, D., Yılmaz, B. N., Taşkın, T. ve Omurtag, G. Z. (2021). The influence of different extraction methods/solvents on composition, biological activities and ADMET predictions of phenolics in tribulus terrestris, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 64.
- Teunissen, C. E., Verberk, I. M. W., Thijssen, E. H., Vermunt, L., Hansson, O., Zetterberg, H., van der Flier, W. M., Mielke, M. M. ve Del Campo, M. (2022). Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease: towards clinical implementation, *Lancet Neurol*, 21(1), 66-77. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(21\)00361-6](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(21)00361-6)
- Tian, J., Shi, J., Zhang, X. ve Wang, Y. (2010). Herbal therapy: a new pathway for the treatment of Alzheimer's disease, *Alzheimer's Research & Therapy*, 2(5), 30. <https://doi.org/10.1186/alzrt54>
- Tiwari, V., Mishra, A., Singh, S. ve Shukla, S. (2023). Caffeine improves memory and cognition via modulating neural progenitor cell survival and decreasing oxidative stress in Alzheimer's rat model, *Current Alzheimer Research*.
- Topal, F., Ertas, B., Guler, E., Gurbuz, F., Ozcan, G. S., Aydemir, O., Bocekci, V. G., Duruksu, G., Sahin Cam, C., Yazir, Y., Gunduz, O. ve Cam, M. E. (2022). A novel multi-target strategy for Alzheimer's disease treatment via sublingual route: Donepezil/memantine/curcumin-loaded nanofibers, *Biomaterials Advances*, 138, 212870. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.212870>
- Turkmenoglu, F. P., Baysal, İ., Ciftci-Yabanoglu, S., Yelekci, K., Temel, H., Paşa, S., Ezer, N., Çalış, İ. ve Ucar, G. (2015). Flavonoids from Sideritis species: human monoamine oxidase (hMAO) inhibitory activities, molecular docking studies and crystal structure of xanthomicrol, *Molecules*, 20(5), 7454-7473.

- Tyagi, P. ve Subramony, J. A. (2018). Nanotherapeutics in oral and parenteral drug delivery: Key learnings and future outlooks as we think small, *Journal of Controlled Release*, 272, 159-168. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.01.009>
- Tzioras, M., McGeachan, R. I., Durrant, C. S. ve Spires-Jones, T. L. (2023). Synaptic degeneration in Alzheimer disease, *Nat Rev Neurol*, 19(1), 19-38. <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00749-z>
- Verdile, G., Fuller, S. J. ve Martins, R. N. (2015). The role of type 2 diabetes in neurodegeneration, *Neurobiol Dis*, 84, 22-38. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.04.008>
- Ververis, A., Ioannou, K., Kyriakou, S., Violaki, N., Panayiotidis, M. I., Plioukas, M. ve Christodoulou, K. (2023). Sideritis scardica Extracts Demonstrate Neuroprotective Activity against A β (25-35) Toxicity, *Plants (Basel)*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/plants12081716>
- Vetrivel, K. S. ve Thinakaran, G. (2010). Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production, *Biochim Biophys Acta*, 1801(8), 860-867. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2010.03.007>
- Voulgaropoulou, S., van Amelsvoort, T., Prickaerts, J. ve Vingerhoets, C. (2019). The effect of curcumin on cognition in Alzheimer's disease and healthy aging: A systematic review of pre-clinical and clinical studies, *Brain research*, 1725, 146476.
- Wang, L. Y., Pei, J., Zhan, Y. J. ve Cai, Y. W. (2020). Overview of Meta-Analyses of Five Non-pharmacological Interventions for Alzheimer's Disease, *Front Aging Neurosci*, 12, 594432. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.594432>
- Wang, X., Huang, W., Su, L., Xing, Y., Jessen, F., Sun, Y., Shu, N. ve Han, Y. (2020). Neuroimaging advances regarding subjective cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease, *Mol Neurodegener*, 15(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00395-3>
- Weller, J. ve Budson, A. (2018). Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment, *F1000Research*, 7, F1000 Faculty Rev-1161. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14506.1>

- Weller, J. ve Budson, A. (2018). Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment, *F1000Research*, 7. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14506.1>
- Xiao, X., Liu, H., Liu, X., Zhang, W., Zhang, S. ve Jiao, B. (2021). APP, PSEN1, and PSEN2 Variants in Alzheimer's Disease: Systematic Re-evaluation According to ACMG Guidelines, *Front Aging Neurosci*, 13, 695808. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.695808>
- Xiong, W.-P., Yao, W.-Q., Wang, B. ve Liu, K. (2021). BMSCs-exosomes containing GDF-15 alleviated SH-SY5Y cell injury model of Alzheimer's disease via AKT/GSK-3 β / β -catenin, *Brain Research Bulletin*, 177, 92-102.
- Yu, T. W., Lane, H. Y. ve Lin, C. H. (2021). Novel Therapeutic Approaches for Alzheimer's Disease: An Updated Review, *Int J Mol Sci*, 22(15). <https://doi.org/10.3390/ijms22158208>
- Zamani, E., Parviz, M., Roghani, M. ve Mohseni-moghaddam, P. (2019). Key mechanisms underlying netrin-1 prevention of impaired spatial and object memory in A β 1-42 CA1-injected rats, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 46(1), 86-93. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1440-1681.13020>
- Zengin, G., Sarikürkçü, C., Aktümsek, A. ve Ceylan, R. (2016). Antioxidant potential and inhibition of key enzymes linked to Alzheimer's diseases and diabetes mellitus by monoterpene-rich essential oil from *Sideritis galatica* Bornm. Endemic to Turkey, *Records of Natural Products*, 10(2), 195.
- Zentner, G. M., Rathi, R., Shih, C., McRea, J. C., Seo, M.-H., Oh, H., Rhee, B. G., Mestecky, J., Moldoveanu, Z., Morgan, M. ve Weitman, S. (2001). Biodegradable block copolymers for delivery of proteins and water-insoluble drugs, *Journal of Controlled Release*, 72(1), 203-215. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00276-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00276-0)
- Zheng, L., Wang, Y.-Z., Yang, K.-K., Wang, X.-L., Chen, S.-C. ve Li, J. (2005). Effect of PEG on the crystallization of PPDO/PEG blends, *European Polymer Journal*, 41(6), 1243-1250.
- Zucchella, C., Sinforiani, E., Tamburin, S., Federico, A., Mantovani, E., Bernini, S., Casale, R. ve Bartolo, M. (2018). The Multidisciplinary Approach to Alzheimer's Disease and

Dementia. A Narrative Review of Non-Pharmacological Treatment, *Front Neurol*, 9, 1058. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.01058>

Żyżelewicz, D., Kulbat-Warycha, K., Oracz, J. ve Żyżelewicz, K. (2020). Polyphenols and Other Bioactive Compounds of Sideritis Plants and Their Potential Biological Activity, *Molecules*, 25(16), 3763.

10. BİLİMSEL FAALİYETLER

Makale

Aydin, S., Kabaoglu, I., Guler, E., Topal, F., Hazar-Yavuz, A.N., Ekentok, C., Tatar, E., Gurbuz, F., Gunduz, O. & Cam, M.E. (2022). A comparison study of fiber diameter effect on characteristic features of donepezil/curcumin-loaded polycaprolactone/polylactic acid nanofibers. *Macromolecular Materials and Engineering*.<https://doi.org/10.1002/mame.202100855>

Bildiri (Sözlü sunum ve Poster)

Aydin, S., Kabaoglu, I., Güler, E., Topal, F. F., Yavuz, A. N., & Çam, M. E. (2021, 25 Temmuz). Donepezil/Curcumin-Loaded Polycaprolactone/Polylactic Acid Nanofibers: A Novel Drug Delivery System for the Treatment of Alzheimer's Disease. [Sözlü sunum]. Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering, Romanya.

Aydin, S., & Cam, M. E. (2022, 17-18 Kasım). The Importance of Magnesium for Nutrition and Health. [Sözlü sunum]. II. Uluslararası Maden Suyu Kongresi, Türkiye.

Aydin, S., Doğan, M., Taşkın, T. & Cam, M. E. (2022, 25-27 Kasım). *In Vitro* Evaluation of Endemic Plants-Loaded Polysorbate 80-Coated PLGA/PEG Nanoparticles for the Treatment of Alzheimer's Disease. [Sözlü sunum]. 26. Uluslararası Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu (BIOMED 2022), Türkiye.

Aydin, S., & Cam, M. E. (2023, 7-10 Kasım). *Sideritis* species-loaded poly(lactic acid-co-glycolic acid) nanoparticles improved memory and learning in an Intracerebroventricular amyloid- β_{1-42} rat model of Alzheimer's disease. [Poster]. 36. European College of Neuropsychopharmacology (ECNP) Congress, İspanya.

Proje

Aydin, S., Öztatlı Kurtuluş, Ş., Doğan, M., Taşkın, T., & Çam, M. E. *Sideritis* Türü Bitki Ekstreleri Yüklü Nanopartiküllerin Üretimi, Karakterizasyonu ve Anti-Alzheimer Etkilerinin *İn Vitro* ve *İn Vivo* Olarak Belirlenmesi. TÜSEB A Grubu Acil AR-GE (22508), 2022-2023. [Yürüyücü].

Aydin, S., & Çam, M. E. *Sideritis* Türü Bitki Ekstreleri Yüklü Nanopartiküllerin Üretimi, Karakterizasyonu ve Anti-Alzheimer Etkilerinin *İn Vitro* ve *İn Vivo* Olarak

Belirlenmesi. Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAPKO) (TDK-2022-10515), 2022-2023. [Yürüyücü].

Aydın, S., & Çam, M. E. *Sideritis* Türü Bitki Ekstreleri Yüklü Nanopartiküllerin Üretimi, Karakterizasyonu ve Anti-Alzheimer Etkilerinin *İn Vitro* ve *İn Vivo* Olarak Belirlenmesi. TÜBİTAK 1002B (123S845), 2023. [Yürüyücü].

Çam, M. E. Morris Su Tankı Isıtma Sisteminin Kurulumu, Yazılım Analiz Programı ve Yazılım Analiz Sistemi Geliştirme. TÜBİTAK 1002B (123S053), 2023. [Bursiyer].