

**T.C.**

**BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**



**GLİOBLASTOMA HÜCRESİNDE HİDROJEN PEROKSİT İLE  
OLUŞTURULAN OKSİDATİF STRESTE KAFEİK ASİT  
VE MEMANTİNİN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNDEKİ  
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MOHAMMAD ZAKER YAQUOBİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Akif Hakan KURT**

**BOLU, ARALIK-2023**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Mohammad Zaker YAQUOBİ tarafından hazırlanan “**GLİOBLASTOMA HÜCRESİNDE HİDROJEN PEROKSİT İLE OLUŞTURULAN OKSİDATİF STRESTE KAFEİK ASİT VE MEMANTİNİN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Farmakoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans Tezi olarak oy birliğiyle kabul edilmiştir. 29/12/2023

### Jüri Üyeleri

### İmza

Danışman

Prof. Dr. Akif Hakan KURT

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye

Prof. Dr. İdris TÜREL

.....

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Nuri Cenk COŞKUN

Düzce Üniversitesi

.....

### Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

**Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü**

## ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

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

Aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin 01/12/2023 tarihinde Turnitin adlı intihal tespit programından enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %18 olarak tespit edilmiştir.

.....

MOHAMMAD ZAKER YAQUOBİ

## ÖZET

### GLİOBLASTOMA HÜCRESİNDE HİDROJEN PEROKSİT İLE OLUŞTURULAN OKSİDATİF STRESTE KAFEİK ASİT VE MEMANTİNİN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOHAMMAD ZAKER YAQUOBİ

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. AKİF HAKAN KURT)

BOLU, ARALIK- 2023

XV+109 SAYFA

Alzheimer hastalığı yaklaşık 30 milyon insanı etkileyen ve yaşlılarda en yaygın görülen nörodejeneratif bir hastalıktır. Günümüzde, bu hastalık için kesin bir tedavi yoktur, mevcut ilaçlar sadece Alzheimer hastalığındaki nörodejeneratif süreci yavaşlatmaktadır. Memantin, bir NMDA (N-Metil-D-Aspartat) reseptör antagonisti olarak hareket eden ve glutamaterjik disfonksiyonu hedefleyen bir ilaçtır. Alzheimer hastalığında glutamatın aşırı salınımı ve NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılması gibi patolojik değişiklikler meydana gelir. Memantin NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılmasını engelleyerek sinir hücrelerine zarar veren aşırı kalsiyum akışını kontrol altına alır. Bu sayede hücrelere koruyucu bir etki sağlayarak sinir hücrelerinin ölümünü önleyebilir. Polifenoller, insan diyetinde doğal antioksidan, nöroprotektif, antienflamatuar ve antiproliferatif dahil olmak üzere birçok özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. Kafeik asit hidroksisinamik asitler adı verilen bir grup polifenolün bir üyesidir. Kafeik asit antioksidan ve antiamiloid özelliklere sahip bir bileşiktir. Antioksidan özellikleri, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresin etkilerini azaltarak beyin hücrelerini koruyabilir. Ayrıca, kafeik asidin amiloid plakların oluşumunu engelleyebileceği ve mevcut plakların çözülmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, glioblastoma U-118 MG hücrelerinde  $H_2O_2$  ile oluşturulan oksidatif hasara karşı ile NMDA reseptör antagonisti olan memantin ile kafeik asit kombinasyonunun nöroprotektif etkilerini incelemeyi amaçladık. Öncelikle U-118 MG hücre serisinde memantin ve kafeik asit'in hücre canlılığına etkisine bakıldı. Sonrasında ise U-118 MG hücre serisinde  $H_2O_2$  ile oluşturulan oksidatif hasar oluşumun öncesi ve sonrası memantin ve kafeik asit tek başına veya kombinasyon şeklinde uygulandı ve hücre canlılığı üzerine etkisine bakıldı. U-118 MG hücre serisinde oksidatif hasarı oluşturmak için, 200  $\mu M$   $H_2O_2$ 'nin 20 saat uygulama süresi esas alınarak inkübasyon uygulandı. Hücre canlılık testi için hücre serilerine 2,3-Bis (2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (XTT) yöntemi uygulandı. Bulgularımız sonucunda memantin oksidatif stresin neden olduğu hücre hasarında koruyucu veya tedavi edici etkileri görülmezken kafeik asit ile kombinasyon uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı olmasada oksidatif stresin neden olduğu hücre hasarında koruyucu ve tedavi edici etkileri görülmektedir. Memantin ile kafeik asit kombinasyon uygulamasının alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde deney hayvan çalışmaları sonrasında alternatif bir tedavi olabileceğini düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Kafeik Asit, Memantin, Alzheimer Hastalığı, Oksidatif Stres, U-118 MG Glioblastoma, Polifenol

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF THE EFFECT OF CO-ADMINISTRATION OF CAFFEIC ACID AND MEMANTINE ON CELL VIABILITY IN OXIDATIVE STRESS INDUCED BY HYDROGEN PEROXIDE IN GLIOBLASTOMA CELLS**

#### **MASTER'S THESIS**

**MOHAMMAD ZAKER YAQUOBI**

**BOLU ABANT IZZET BAYSAL UNIVERSITY**

**GRADUATE SCHOOL OF SCIENCES**

**DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY**

**(THESIS ADVISOR: PROF. DR. AKIF HAKAN KURT)**

**BOLU, DECEMBER- 2023**

**XV + 109 PAGE**

Alzheimer's disease is a neurodegenerative condition affecting approximately 30 million people and is the most common among the elderly. Currently, there is no definitive cure for this disease, as the existing medications only slow down the neurodegenerative process in Alzheimer's. The molecular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease have not been fully elucidated yet. Polyphenols are known to have various pharmaceutical properties, including being natural antioxidants in the human diet, neuroprotective, anti-inflammatory, anti-proliferative, and possessing free radical scavenging activities, as well as cardioprotective properties. These antioxidant compounds have the ability to eliminate free radicals produced within cells, which provides protective effects against neurodegenerative diseases. The widely used Alzheimer's treatment, memantine, has different pharmacological properties, including antioxidant features. When applied in conjunction with caffeic acid, it can contribute to improving overall daily functions and preventing disease progression. Recently, combination therapies involving NMDA receptor antagonists and neuroprotective agents have been shown to be an effective approach in preventing Alzheimer's disease. Therefore, in our study, we aimed to investigate the neuroprotective effects of a combination of the organic compound caffeic acid, a significant representative of hydroxycinnamic acids, and memantine, an NMDA receptor antagonist, against oxidative damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in glioblastoma U-118 MG cells. U-118 MG cells were exposed to oxidative stress by treating them with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after pretreatment with memantine and caffeic acid. Oxidative stress damage was induced by adding 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to the U-118 MG cell line, and the cells were incubated at 37°C for 24 hours. To investigate the protective effect of memantine and caffeic acid against oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, four different study groups were established. Firstly, the effect of memantine and caffeic acid on cell viability was examined in the U-118 MG cell series. Then, the effective concentration of memantine and caffeic acid before and after application was determined in the formation of oxidative damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the U-118 cell line. Finally, the effect of memantine and caffeic acid combination application on cell viability was investigated. The XTT method was applied to cell series for cell viability testing. As a result of our findings, it was observed that memantine does not have protective or therapeutic effects on cell damage induced by oxidative stress, while caffeic acid and combination applications showed protective or therapeutic effects at all doses in cell damage induced by oxidative stress. The neuroprotective and therapeutic effect of caffeic acid and combination applications may provide a new approach to drug development for the clinical treatment of neurodegenerative diseases.

**Key Words:** Caffeic acid, Memantine, Alzheimer's disease, Oxidative stress, U-118 MG glioblastoma, Polyphenol

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| KABUL VE ONAY SAYFASI .....                                     | iii  |
| ETİK BEYAN.....                                                 | iv   |
| ÖZET .....                                                      | v    |
| ABSTRACT.....                                                   | vi   |
| İÇİNDEKİLER.....                                                | vii  |
| ŞEKİL LİSTESİ.....                                              | xi   |
| TABLO LİSTESİ .....                                             | xii  |
| FOTOĞRAF LİSTESİ .....                                          | xiii |
| KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ.....                              | xiv  |
| TEŞEKKÜR .....                                                  | xv   |
| 1. GİRİŞ .....                                                  | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                          | 7    |
| 2.1. Alzheimer Hastalığı.....                                   | 7    |
| 2.1.1 Alzheimer Hastalığı Tanı Kriterleri .....                 | 10   |
| 2.1.2 Alzheimer Hastalığı'nın Nöropatolojisi.....               | 12   |
| 2.1.3 Senil Plaklar (SP) .....                                  | 13   |
| 2.1.4 Nörofibril Demetleri (NFT'ler).....                       | 13   |
| 2.1.5 Sinaptik Kayıp .....                                      | 14   |
| 2.1.6 Alzheimer Hastalığının Evreleri.....                      | 14   |
| 2.1.7 Alzheimer Hastalığının Tarihçesi .....                    | 17   |
| 2.1.8 Alzheimer Hastalığının Nedenleri ve Risk Faktörleri ..... | 19   |
| 2.2 Alzheimer Hastalığının Hipotezi.....                        | 20   |
| 2.2.1 Kolinerjik Hipotezi.....                                  | 20   |
| 2.2.2 Amiloid Hipotezi .....                                    | 22   |
| 2.3. Alzheimer Hastalığının Risk Faktörleri.....                | 23   |
| 2.3.1 Yaşlanma .....                                            | 23   |
| 2.3.2 Genetik .....                                             | 23   |
| 2.3.3 Amiloid Prekürsör Protein (APP).....                      | 23   |
| 2.3.4 Presenilin-1 (PSEN-1) ve Presenilin-2 (PSEN-2).....       | 24   |
| 2.3.5 Apolipoprotein E (ApoE) .....                             | 25   |
| 2.3.6 ATP Bağlayıcı Kaset Taşıyıcı A1 (ABCA1).....              | 25   |

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.7 Küme Geni (CLU) ve Köprü Entegratörü 1 (BIN1) .....                | 25 |
| 2.3.8 Toll Yolunda'ki Evrimsel Olarak Korunmuş Sinyal Aracı (ECSIT)..... | 26 |
| 2.3.9 Östrojen Reseptörü Geni (ESR) .....                                | 26 |
| 2.3.10 Çevresel Faktörler .....                                          | 27 |
| 2.3.11 Metaller .....                                                    | 27 |
| 2.3.12 Enfeksiyonlar .....                                               | 28 |
| 2.3.13 Tıbbi Faktörler.....                                              | 28 |
| 2.3.14 Kardiyovasküler Hastalıklar (KVH) .....                           | 29 |
| 2.3.15 Obezite ve Diyabet.....                                           | 29 |
| 2.4 Tedaviler.....                                                       | 30 |
| 2.4.1 AH'nın Semptomatik Tedavisi.....                                   | 31 |
| 3.4.2 Kolinesteraz İnhibitörleri .....                                   | 31 |
| 2.4.3 Donepezil .....                                                    | 33 |
| 2.4.4 Rivastigmin .....                                                  | 33 |
| 2.4.5 Galantamin (GAL) .....                                             | 34 |
| 2.5. N-metil-D-aspartat (NMDA) Antagonistleri.....                       | 35 |
| 2.5.1 Memantin (1-amino-3,5-dimetil amantadin hidroklorid).....          | 35 |
| 2.6 Umut Veren Gelecek Tedaviler.....                                    | 40 |
| 2.6.1 Hastalığı Modifiye Edici Terapötikler (DMT) .....                  | 40 |
| 2.6.2 Şaperonlar.....                                                    | 45 |
| 2.6.3 Isı Şoku Proteinleri (Hsp'ler).....                                | 46 |
| 2.6.4 Hsp60 .....                                                        | 46 |
| 2.6.5 Hsp70 .....                                                        | 47 |
| 2.6.6 Hsp90 .....                                                        | 48 |
| 2.6.7 Vaküolar sınıflandırma proteini 35 (VPS35).....                    | 49 |
| 2.6.8 OT1001.....                                                        | 49 |
| 2.6.9 Doğal Özütler .....                                                | 50 |
| 2.7 Oksidatif Stres.....                                                 | 52 |
| 2.7.1 Reaktif Oksijen Türleri (ROS) .....                                | 52 |
| Oksijen (O <sub>2</sub> ),.....                                          | 52 |
| Süperoksit radikali: .....                                               | 52 |
| Hidroksil Radikali: .....                                                | 52 |
| Hidrojen Peroksit: .....                                                 | 53 |
| 2.7.2 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve Nörodejenerasyon.....             | 53 |
| 2.7.3 Alzheimer Hastalığındaki Oksidatif Stresin Rolu.....               | 54 |
| 2.7.3.1 Amyloidler ve Oksidatif Stres .....                              | 54 |

|                                                                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.7.3.2 Metabolizma, Reaktif Bileşenlerin Kaynağı .....                                                                    | 54        |
| 2.7.4 Oksidatif Stres Modelleri.....                                                                                       | 56        |
| 2.7.5 Antioksidanlar.....                                                                                                  | 57        |
| 2.8 Polifenoller.....                                                                                                      | 58        |
| 2.8.1 Polifenollerin Biyoaktivlikleri .....                                                                                | 59        |
| 2.8.2 Polifenollerin Oksidatif Stres Üzerindeki Etkileri.....                                                              | 62        |
| 2.8.3 Polifenollerin Antioksidan Özellikleri .....                                                                         | 62        |
| 2.8.4 Serbest Radikallerin Polifenollerle Etkileşimi .....                                                                 | 62        |
| 2.8.5 Oksidasyona Dahil Olan Enzimlerin İnhibisyonu.....                                                                   | 63        |
| 2.9 Kafeik asit (3,4-dihidroksi-sinnamik asit).....                                                                        | 64        |
| 2.9.1 Gıdalarda kafeik asit varlığı .....                                                                                  | 65        |
| 2.9.2 Kafeik asidin metabolizması .....                                                                                    | 67        |
| 2.9.3 Kafeik asidin biyoaktivitesi.....                                                                                    | 68        |
| <b>3. MATERYAL VE METOT .....</b>                                                                                          | <b>72</b> |
| 3.1 Materyal.....                                                                                                          | 72        |
| 3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler .....                                                                                   | 72        |
| 3.1.2 Hücre Kültürü Uygulamaları.....                                                                                      | 73        |
| 3.2 Metot.....                                                                                                             | 73        |
| 3.2.1 Glioblastoma hücre serisi .....                                                                                      | 73        |
| 3.2.2 Hücrelerin Pasajlanması.....                                                                                         | 74        |
| 3.2.3 Hücrelerin Toplanması ve Dondurulması.....                                                                           | 74        |
| 3.2.4 Hücrelerin Çözülmesi.....                                                                                            | 75        |
| 3.2.5 Hücrelerin Sayılması .....                                                                                           | 75        |
| 3.2.6 Hücre hatlarında H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ile oksidatif stres oluşturulması.....                                | 77        |
| 3.2.7 Memantin ve kafeik asit stok çözeltilerinin hazırlanması .....                                                       | 77        |
| 3.2.8 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ile memantin ve kafeik asit stok çözeltilerinin hazırlanması .....                     | 78        |
| 3.2.9 U-118 MG hücrelerinde memantin ve kafeik asidinin etkilerinin ayrı ayrı değerlendirilmesi.....                       | 78        |
| 3.2.10 U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi Memantin ve Kafeik asit etkisinin değerlendirilmesi.....        | 78        |
| 3.2.11 U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu sonrası memantin ve kafeik asidinin etkisinin değerlendirilmesi ..... | 79        |
| 3.2.12 Hücre Proliferasyon Canlılık Testi II (XTT) .....                                                                   | 79        |
| 3.2.13 İstatistiksel analiz .....                                                                                          | 80        |
| <b>4. BULGULAR.....</b>                                                                                                    | <b>81</b> |
| 4.1 Hücre Kültürü Uygulamaları.....                                                                                        | 81        |
| 4.1.1. Hücre hatlarında H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ile oksidatif stres oluşturulması.....                               | 81        |

|                                                                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1.2. U-118 MG Hücrelerinde kafeik asidin etkisinin değerlendirilmesi .....                                                                          | 82        |
| 4.1.3. U-118 MG hücrelerinde Memantin uygulamasının değerlendirilmesi ..                                                                              | 83        |
| 4.1.4. U- 118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi memantin ile kafeik asidin birlikte uygulamasının koruyucu etkisinin değerlendirilmesi .. | 84        |
| 4.1.5. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum sonrası memantin ile kafeik asidin birlikte tedavi edici etkisinin değerlendirilmesi .....        | 86        |
| <b>5. TARTIŞMA .....</b>                                                                                                                              | <b>88</b> |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>                                                                                                                      | <b>91</b> |
| <b>7. KAYNAKLAR.....</b>                                                                                                                              | <b>92</b> |



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 2.1</b> Beyin ve sinir hücrelerinin fizyolojik yapısı. Sağlıklı beyin ve Alzheimer hastalığı (AD) beyin.....                                                                                                                                                                                                                                                      | 8  |
| <b>Şekil 2.2</b> Alzheimer hastalığının beyin bölgelerinde yayılımı .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 12 |
| <b>Şekil 2.3</b> Alzheimer hastalığının farklı nörofibriler sarmal evrelerini gösteren çizimler .....                                                                                                                                                                                                                                                                      | 18 |
| <b>Şekil 2.4</b> Alzheimer hastalığı için risk faktörleri .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 21 |
| <b>Şekil 2.5</b> Presinaptik ve postsinaptik sinir uçları arasında asetilkolinin sentez ve taşıma yolları .....                                                                                                                                                                                                                                                            | 22 |
| <b>Şekil 2.6</b> ACh'nin AChE tarafından hidrolizi .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 31 |
| <b>Şekil 2.7</b> ACh'nin AChE tarafından hidroliz mekanizması .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 32 |
| <b>Şekil 2.8</b> AChE inhibitörlerinin fonksiyonları .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 32 |
| <b>Şekil 2.9</b> AD'nin semptomatik tedavisinde onaylanmış ilaçların (takrin donepezil rivastigmin galantamin ve memantin ve klinik denemelere giren hastalığı modifiye eden bileşiklerin (semagasestat, avagasestat, tarenflurbil, lanabecestat, verubecestat, atabecestat, umibecestat, metilen mavi, tideglusib ve saracatinib) kimyasal yapılarını göstermektedir..... | 34 |
| <b>Şekil 2.10</b> Memantin yapısı ve şekli .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 36 |
| <b>Şekil 2.11</b> Farklı şaperon moleküllerinin kimyasal yapıları: Mizoribin, EC3016, Avrainvillamid, Epolaktan, MKT-077, YM-01, JG-98, Radikol, Geldanamisin, 17-AAG, Pochoxime C (OS47720), R55 ve OT1001 .....                                                                                                                                                          | 47 |
| <b>Şekil 2.12</b> Polifenol kimyasal yapısı .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 59 |
| <b>Şekil 2.13</b> Polifenol metabolizması .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 61 |
| <b>Şekil 2.14</b> İnflamatuar hastalıklara yol açan araşidonik asit metabolizmasında yer alan metabolik yollar .....                                                                                                                                                                                                                                                       | 63 |
| <b>Şekil 2.15</b> Kafeik asidin kimyasal yapısı .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 65 |
| <b>Şekil 2.16</b> Fenolik bileşiklerin emiliminin ve metabolizasyonunun varsayılan mekanizması .....                                                                                                                                                                                                                                                                       | 68 |
| <b>Şekil 3.1</b> XTT 'in formazan kristaline dönüşüm reaksiyonu .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 80 |
| <b>Şekil 4.1</b> U-118 MG hücrelerinde hidrojen peroksitin hücre canlılığı üzerine etkisi.....                                                                                                                                                                                                                                                                             | 82 |
| <b>Şekil 4.2</b> U-118 MG hücrelerinde kafeik asidin hücre canlılığına etkisi .....                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 83 |
| <b>Şekil 4.3</b> U-118 MG hücrelerinde memantin hücre canlılığına etkisi .....                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 84 |
| <b>Şekil 4.4.</b> U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi memantin ile kafeik asidin birlikte uygulamasının hücre canlılığına koruyucu etkisi.....                                                                                                                                                                                                             | 85 |
| <b>Şekil 4.5.</b> U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum sonrası memantin ile kafeik asidin birlikte uygulamasının hücre canlılığına tedavi edici etkisi .....                                                                                                                                                                                                       | 87 |

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

|                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 2.1</b> Yıllara ve yaş gruplarına göre nüfus, Türkiye İstatistik Kurumu .....                                                                                 | 9  |
| <b>Tablo 2.2</b> Demansta üç temel ve üç ikincil alanın sorgulanması .....                                                                                             | 15 |
| <b>Tablo 2.3</b> Başlıca Alzheimer için risk faktörleri .....                                                                                                          | 20 |
| <b>Tablo 2.4</b> Memantin farmakokinetik özellikleri .....                                                                                                             | 38 |
| <b>Tablo 2.5</b> Klinik denemelerde Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan hastalık değiştirici ajanlar. ....                                                   | 41 |
| <b>Tablo 2.6</b> Halk tıbbında kullanılan doğal bileşikler ve etki mekanizmaları .....                                                                                 | 50 |
| <b>Tablo 2.7</b> Kafeik asit içeren bazı yiyeceklerin örnekleri.....                                                                                                   | 66 |
| <b>Tablo 3.1</b> Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları .....                                                                                                        | 72 |
| <b>Tablo 3.2</b> Kullanılan sarf malzeme ve kullanım amaçları .....                                                                                                    | 73 |
| <b>Tablo 4.1.</b> U-118 MG $H_2O_2$ ile oluşturulan hasar modelinde istatistiksel sonuçlar.....                                                                        | 81 |
| <b>Tablo 4.2.</b> U-118 MG Hücre hattına kafeik asidin yalnız uygulaması.....                                                                                          | 82 |
| <b>Tablo 4.3.</b> U-118 MG üzerine memantin uygulamasının istatistiksel sonuçları...                                                                                   | 83 |
| <b>Tablo 4.4.</b> Oksidatif hasar oluşum öncesi memantin ile kafeik asidin birlikte uygulaması hücre canlılığına koruyucu etkisinin istatistiksel değeri .....         | 85 |
| <b>Tablo 4.5.</b> Oksidatif hasar oluşum sonrası memantin ile kafeik asidin birlikte uygulamasının hücre canlılığına tedavi edici etkisinin istatistiksel değeri ..... | 86 |

## FOTOĞRAF LİSTESİ

### Sayfa

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Fotoğraf 2.1</b> Alois Alzheimer ve Auguste Deter .....                                     | 17 |
| <b>Fotoğraf 3.1</b> Glioblastoma (U-118 MG) Hücre hattı invert mikroskop görüntüsü.....        | 77 |
| <b>Fotoğraf 3.2</b> EVE otomatik hücre sayacı ile hücre sayımı .....                           | 76 |
| <b>Fotoğraf 3.3</b> U-118 MG hücre hattı üzerinde H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uygulama ..... | 77 |



## KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

|                               |                                                                                          |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Al (OH) <sub>3</sub>          | : Alüminyum Hidroksit                                                                    |
| NMDA                          | : N-methyl-D-aspartate                                                                   |
| AH                            | : Alzheimer Hastalığı                                                                    |
| Ca <sup>2+</sup>              | : Kalsiyum                                                                               |
| DMSO                          | : Dimetil Sülfoksit                                                                      |
| A $\beta$                     | : Amiloid Beta                                                                           |
| COX- 2                        | : Siklo Oksijenaz- 2                                                                     |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Hidrojen Peroksit                                                                        |
| HH                            | Huntington Hastalığı                                                                     |
| NF-K $\beta$                  | Nükleer Faktörü Kappa B                                                                  |
| Nrf2                          | Nükleer Faktör Eritroid Türevi 2                                                         |
| O <sub>2</sub>                | Singlet Oksijen                                                                          |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup>   | Süperoksit Radikali                                                                      |
| OH                            | Hidroksil                                                                                |
| PH                            | Parkinson Hastalığı                                                                      |
| ROS                           | Reaktif Oksijen Türü                                                                     |
| TNFR1                         | Tümör Nekroz Faktör Reseptörü-1                                                          |
| FDA                           | : Food and Drug Administration, Türkçe: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi |
| PTZ                           | : Pentilentetrazol                                                                       |
| SSS                           | : Santral sinir sistemi                                                                  |
| $\mu$ l                       | : mikrolitre                                                                             |

## TEŞEKKÜR

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesindeki bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yanımda olan, ekibinde çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum, yüksek lisans eğitimim boyunca ve tezimin tüm aşamalarında her türlü bilgi, destek ve tecrübelerini hoşgörü ve sabırla paylaşan tez danışmanım değerli hocam, Prof. Dr Akif Hakan KURT'a;

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, akademik süreçte kendimi geliştirmeme imkân sağlayan, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İdris TÜREL ve Doç. Dr. Oruç YUNUSOĞLU değerli hocalarım'a

Deneylerim esnasında ve tezimin tüm aşamalarında her türlü bilgi, destek ve tecrübelerini hoşgörü ve sabırla paylaşan ve bana büyük yardımları dokunan Ar. Gör. Dr. CANSU KARA ÖZTABAĞ hocam'a

Tezimin istatistiksel analiz sürecinde hoşgörü ve sabırla destek olan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Ali SUNGUR'a

Mutlu bir hayat sürmemde büyük payı olan birbirinden kıymetli aileme ve arkadaşlarım'a

Sonsuz teşekkürlerimle...

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin teminini sağlayan Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje numarası: 2023-TYL-6.12.56-0006)'ne teşekkür ederim.

## 1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH), bilişsel fonksiyonlarda ilerleyici bir bozulma ile karakterize edilen ve en sık görülen demans türüdür. Bu nörodejeneratif bozukluk, sosyal ve mesleki işlevleri belirgin bir şekilde etkileyebilir ve bilişsel ile davranışsal bozulmalara yol açar. AH genellikle 65 yaşından sonra daha sık görülür ve yaş arttıkça prevalansında bir artış gözlenir. Özellikle 85 yaş ve üstü bireylerde, hastalığın tahmini prevalansı yaklaşık %50'ye kadar yükselebilir (1,2). Yaşlı nüfusun artmasıyla birlikte Alzheimer hastalığına yakalanan kişilerin oranının önemli ölçüde artması beklenmektedir. AH, sadece hastalar için büyük bir yük oluşturmakla kalmayıp aynı zamanda hastayı ailesine veya topluma daha fazla bağımlı hale getirir.

Bu hastalık lokal nörolojik semptomlar, halüsinasyonlar, sanrılar ve psikososyal yetersizlikler gibi belirtilerle kendini göstermektedir. Dünya genelinde 2018 verilerine göre yaklaşık 50 milyon insan Alzheimer hastalığından etkilenmiş ve bu sayının 2050 yılında 153 milyon kişiye çıkması beklenmektedir. Alzheimer hastalığı genellikle 65 yaş üstü popülasyonda görülür ve en belirgin belirtisi unutkanlıktır. Bilişsel bozuklukların yanı sıra davranış bozukluğu belirtileriyle de kendini gösteren Alzheimer hastalığı, Alman nörolog Alois Alzheimer tarafından ilk kez 1907 yılında tanımlanmıştır. Türkiye Alzheimer Derneği'nin 2015 yılı verilerine göre ülkemizde 400 binin üzerinde Alzheimer hastalığına yakalanan birey olduğu tahmin edilirken dünya geneline bakıldığında bu sayının 46,8 milyon civarında olduğu bildirilmiştir (3,4). Zaman içinde zihinsel yeteneklerin kötüleşmesi ve kişilik değişiklikleri Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif bozukluklarda sıkça görülen bir durumdur. En yaygın kişilik değişiklikleri arasında inisiyatif azalması, ilgi kaybı, hobilerden vazgeçme ve kişilikte rijidite artışı bulunmaktadır. Daha nadir görülen değişiklikler arasında ise duygusal kontrol kaybı, aşırı neşe durumunda uygun olmayan davranışlar ve cinsel sapkınlıklar yer alabilir. Davranışsal değişiklikler ise geniş bir yelpazeyi kapsar ve bunlar arasında talepkarlık, aşırı eleştirel davranışlar, şüphecilik, şiddet, halüsinasyonlar, sanrılar, depresyon, aşırı neşe, kişilikte rijidite, iş birliğinden kaçınma, düzensizlik, huzursuzluk, psikomotor ajitasyon, kararsızlık, geri çekilme, hipokondriyazis, ilgisizlik ve paranoya gibi semptomlar bulunabilir.

Alzheimer hastalığı, nörodejeneratif bir hastalık olup ve beyindeki sinir hücrelerinin zamanla hasar görmesi ve kaybolması ile karakterizedir. Bu hastalık hafıza kaybı, bilişsel bozulma, davranışsal değişiklikler ve işlevsellik kaybı gibi belirtilerle ortaya çıkar. Alzheimer hastalığının patogenezi temel olarak ekstraselüler matrikste biriken amiloid beta (A $\beta$ ) plakları

ve nörofibriler yumaklar (NFY) ile ilişkilidir. A $\beta$  peptitlerinin Alzheimer hastalığındaki nörodejenerasyonun temel nedenlerinden biri olduğuna inanılmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalar ve bilimsel veriler A $\beta$ 'nın hücre membranının yapısını bozduğunu ve membran üzerinde yerleşik iyon kanallarının düzenli çalışmalarını etkilediğini göstermektedir (5).

Alzheimer hastalığında ekstrasellüler aralıkta biriken A $\beta$  plakların öncelikle hücre zarında yapısal hasar oluşturarak hücre membranı permeabilitesinin bozulmasına sebep olduğu ileri sürülmektedir. Permeabilitenin bozulması ekstrasellüler aralıktan hücre içine yüksek miktarda kalsiyum iyonu (Ca<sup>+2</sup>) girişine ve dolayısıyla hücre içindeki oksidatif stres ürünlerinin artmasına öncülük eder (6).

1970'lerden bu yana antikolinerjik ilaçların (skopolamin) bilişsel işlevler üzerinde olumsuz etkileri gözlemlenerek kolinerjik sistemin bilişsel süreçlerde önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar antikolinerjik ilaçlara yüksek düzeyde maruz kalmanın demans riskini artırdığını göstermiştir. Bu nedenle, AH için mevcut ana tedavi stratejisi asetilkolin seviyelerini artırmak amacıyla asetilkolinesteraz adı verilen enzimi inhibe eden bileşiklerle uygulanır. Bu şekilde asetilkolin düzeylerinin artması hedeflenir ve şu anda FDA tarafından onaylanmış üç kolinesteraz inhibitörü (rivastigmin, donepezil, galantamin) mevcuttur. Bu ilaçlar hafiften orta dereceye kadar olan Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır.

Mevcut farmakoterapi Alzheimer hastalığının semptomatik ilerlemesini geciktirmeyi amaçlamaktadır. Hastalığın nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte beyindeki nörotransmitter değişikliklerinin karmaşık bir ortamında asetilkolin eksikliğinin Alzheimer hastalığında rol oynadığı gösterilmiştir (7,8). Asetilkolin eksikliğini tedavi etmek amacıyla kolinesteraz inhibitörleri kullanılmaktadır. Kolinesteraz inhibitörleri presinaptik kolinerjik nöronlar tarafından salınan asetilkolinin bozulmasını inhibe ederek sinaptik düzeyde asetilkolin miktarını arttırmaları. Bu nedenle hafif ila orta şiddette Alzheimer hastalığı için tercih edilen tedavi yöntemleri kolinesteraz inhibitörleri olarak ortaya çıkmıştır.

Donepezil, rivastigmin ve galantamin, etkili oldukları ve tolere edilebilirlik profiline sahip oldukları gösterilen ana kolinesteraz inhibitörleri (CHEI) kategorisini temsil ederler. Bu ilaçlar, bilişsel işlevlerin, günlük yaşam aktivitelerinin (ADL) ve davranışsal semptomların iyileştirilmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (9). CHEI'ler kolinerjik aracılı yan etkileri paylaşırlar ve en sık görülen kolinerjik yan etkileri arasında mide bulantısı, kusma ve ishal

bulunur. Bu yan etkiler başlangıçta ve doz titrasyonu sırasında daha yaygındır ve bazı durumlarda ilacın kesilmesine neden olabilir.

Ancak, CHEI'lerin terapötik dozlara yavaş titrasyonu hastaların gastrointestinal semptomlara tolerans geliştirmeleri nedeniyle semptomların çoğunu hafifletebilir (10). Şu anda bir CHEI'nin diğerine tercih edilmesi için çok az kanıt bulunmaktadır. Hafif ila orta şiddette Alzheimer hastalığına sahip popülasyonda CHEI tedavisine erken başlanması önerilir ve etkinliğin hastalığın ileri evrelerine kadar devam ettiğini gösteren kanıtlar bulunmaktadır. Ancak orta ila şiddetli Alzheimer hastalığına sahip hastalar için FDA tarafından 2003 yılına kadar onaylanan bir tedavi mevcut değildi. Fakat bu durum 2003 yılında memantin adlı ilacın onaylanmasıyla değiştirilmiştir.

Memantin, glutamaterjik disfonksiyonu hedefleyen ve NMDA (N-Metil-D-Aspartat) reseptör antagonisti olarak hareket eden bir ilaçtır. NMDA reseptörleri, sinir hücrelerinin normal işlevleri ile öğrenme ve hafıza süreçleri için önemli olan glutamat sinyallerini iletmekten sorumludur. Ancak Alzheimer hastalığında, glutamatın aşırı salınımı ve NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılması gibi patolojik değişiklikler meydana gelir. Memantin, NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılmasını engelleyerek sinir hücrelerine zarar veren aşırı kalsiyum akışını kontrol altına alır. Böylece hücrelere koruyucu bir etki sağlayarak sinir hücrelerinin ölümünü önleyebilir. Ayrıca, memantin sinir iletimindeki dengesizlikleri düzelterek hafıza ve bilişsel fonksiyonların iyileşmesine katkıda bulunabilir. Memantin, genellikle Alzheimer hastalığının hafif ila orta dereceli formlarının tedavisinde kullanılır. Hastalığın ilerleyici bir doğası olduğu için memantin hastalığın ilerlemesini durduramaz veya geri çeviremez; ancak belirtileri hafifletebilir ve yaşam kalitesini artırabilir. Memantin, diğer Alzheimer ilaçlarıyla kombinasyon halinde veya tek başına kullanılabilir.

Memantin, açık durumdaki NMDA reseptör kanalına bağlanarak etki gösterir. Normalde NMDA reseptörünün görevi nörotransmisyon için kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) akışını sağlamaktır. Ancak hastalık durumunda NMDA reseptörünün aşırı aktive olması uzun süreli kanal açılmasına ve aşırı  $Ca^{2+}$  akışına yol açarak eksitotoksisite ve hücre ölümüne neden olabilir. Bu nedenle kolinesteraz inhibitörleri ve memantin gibi ilaçlar Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan temel ilaçlardır. Bunlar bilişsel işlevleri desteklemek ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak için kullanılır. Ancak her hasta için en uygun tedavi planı hastanın özel durumuna ve semptomlarının şiddetine bağlı olarak belirlenmelidir.

Alzheimer hastalığı kompleks bir nörodejeneratif durumdur ve patogenezi üzerinde birçok faktörün etkili olduğu düşünülmektedir. Bu faktörlerden biri oksidatif strestir, Oksidatif stres, hücrelerde reaktif oksijen türleri olarak adlandırılan serbest radikallerin birikimi ve hücrelerin antioksidan savunma sistemlerinin dengesizliği sonucu ortaya çıkar. Alzheimer hastalığında, beyinde beta-amiloid protein birikimleri olarak adlandırılan amiloid plaklar oluşur. Bu amiloid plaklar, oksidatif stresin bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. Oksidatif stres, beta-amiloid proteinlerin hücrelere zarar verici etkisini artırabilir, nöronlarda hasara ve dejenerasyona sebep olup ölüme yol açabilir. Ayrıca, oksidatif stres beyinde enflamasyonu artırabilir ve nörotransmitter dengesini bozabilir, böylece Alzheimer hastalığının ilerlemesini destekleyebilir. Bununla birlikte Alzheimer hastalığında oksidatif stresin sadece bir sonuç olmadığı aynı zamanda bir tetikleyici veya katkı faktörü olduğu düşünülmektedir. Hastalığın erken aşamalarında oksidatif stresin arttığı ve antioksidan savunma sistemlerinin etkinliğinin azaldığı gözlenmiştir. Bu durum hücrelerin oksidatif hasara karşı korunmasını zayıflatır ve Alzheimer hastalığının ilerlemesine katkıda bulunabilir.

Küresel nüfusun yaşlanmasıyla birlikte Alzheimer hastalığı gibi yaşa bağlı hastalıkların morbiditesi önemli ölçüde artmaktadır. 2008 yılında Avrupa'da, tedavi maliyeti en yüksek morbidite ve ölüm oranına sahip hastalıklardan biri olan Alzheimer hastalığının maliyeti 177 milyar avroya ulaşarak tümörler ve kalp hastalıkları gibi diğer önemli hastalıkları geçmiştir (11). Ayrıca AH için mevcut tedavi seçenekleri sınırlıdır ve bu nedenle optimal sonuçlara ulaşmak zordur (12). Bu nedenle, AH için fayda sağlayacak güvenilir etkilere sahip ve klinik uygulamada kullanılabilecek minimum yan etki sunan yeni tedavilere ihtiyaç vardır. Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlar genellikle kolinin nörotransmisyonunu, serebral dolaşımı ve beyin hücrelerinin metabolizmasını iyileştirmeyi hedefler (13). Ayrıca AH tedavisinde kalsiyum antagonistleri, hormon tedavisi, steroidal olmayan antienflamatuar ilaçlar, serbest radikal temizleyiciler, antioksidanlar ve muskarinik reseptör agonistleri gibi ilaçlar da kullanılmaktadır. Ancak mevcut tedavi seçenekleri sınırlıdır ve optimal sonuçlara henüz ulaşılammıştır. Böylece AH için etkili tedavilerin geliştirilmesinin zorlu olduğunu göstermektedir.

Kafeik asit, Alzheimer hastalığı ile ilgili potansiyel faydalara sahip olan bir fenolik bileşiktir. Alzheimer hastalığı, beyinde amiloid plakların birikmesi ve nörofibril yumaklarının oluşması gibi patolojik değişikliklerle karakterizedir. Kafeik asit çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olup antienflamatuar, antibakteriyel ve antiviral etkiler içermektedir (14,15). Ayrıca, beyaz kan hücrelerinin ve kan trombositlerinin seviyelerini artırma potansiyeline sahiptir (16). Bu

nedenle, kafeik asit lökopeni ve trombositopeni tedavisine ek olarak kardiyovasküler hastalıklar ve beyin hasarı gibi durumlarda oksidatif stresi ve enflamatuvar tepkileri azaltmak, viral hastalıkları önlemek ve tedavi etmek için kullanılabileceği düşünülmektedir (17). Kafeik asit, antioksidan, antienflamatuvar, immün düzenleyici ve antibakteriyel etkileri sayesinde oksidatif stres ve enflamatuvar tepkilerle ilişkili hastalıkların tedavisinde potansiyel olarak önemli rol oynayabilir (14,17,18).

Kafeik asit, antioksidan ve anti-amiloid özelliklere sahip bir bileşiktir. Antioksidan özellikleri serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresin etkilerini azaltarak beyin hücrelerini koruyabilir. Ayrıca, kafeik asidin amiloid plakların oluşumunu engelleyebileceği ve mevcut plakların çözülmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Amiloid plaklar, beyinde biriken beta-amiloid adı verilen bir proteinin birikmesi sonucu oluşur. Bu plaklar sinir hücreleri arasındaki iletişimi ve işlevi etkileyerek Alzheimer hastalığının semptomlarını şiddetlendirebilir. Kafeik asit ayrıca antiinflamatuvar özelliklere sahiptir. Kronik inflamasyonun Alzheimer hastalığının gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Kafeik asit, beyindeki inflamasyonu azaltarak sinir hücrelerini koruyabilir ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatabilir. Oksidatif stresin Alzheimer hastalığı üzerindeki etkilerini anlamak ve potansiyel tedavi stratejileri geliştirmek için antioksidanlar ve antiinflamatuvar ajanlar gibi koruyucu bileşiklerin araştırıldığı birçok çalışma yapılmıştır. Ancak şu anda oksidatif stresin Alzheimer hastalığına karşı etkili bir tedavi yöntemi olmadığını belirtmek önemlidir. Bu nedenle oksidatif stresin rolünü daha iyi anlamak ve Alzheimer hastalığının karmaşık mekanizmalarını hedefleyen daha etkili tedavi stratejileri geliştirmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Ancak kafeik asidin Alzheimer hastalığının tedavisindeki etkinliği ve mekanizmaları hala tam olarak anlaşılmamıştır. İnsanlar üzerinde yapılan klinik çalışmalar sınırlıdır ve daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Şu anda kullanılan farmakoterapötik yaklaşımlar hastalığın semptomatik ilerlemesini geciktirmeyi hedefler. Ancak, bu ilaçlar sadece semptomları hafifletme üzerine odaklanmakta ve hastalığın temel nedenine yönelik bir çözüm sunmamaktadır. Bu bağlamda, Alzheimer hastalığının patogenezindeki önemli bir faktör olan oksidatif stresin rolüne odaklanmak ve potansiyel bir tedavi stratejisi olarak kafeik asidin incelenmesi bilimsel bir zeminde yeni bir bakış açısı sunabilir. Kafeik asidin antioksidan, antienflamatuvar ve anti-amiloid özellikleri Alzheimer hastalığına karşı potansiyel bir koruyucu ve tedavi edici ajan olarak göstermektedir. Bir polifenol olan kafeik asit antioksidan, antienflamatuvar ve nöroprotektif etkileri bilinmesine karşın, güncel çalışmalar arasında Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan bir NMDA (N-

Metil-D-Aspartat) reseptör antagonisti olarak hareket eden memantin ile birlikte kafeik asitin nöroprotektif etkilerinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, çalışmamızda memantin ile birlikte kafeik asitin hidrojen peroksit kaynaklı oksidatif hasarda koruyucu ve tedavi edici etkilerini hücre kültürü ortamında in-vitro olarak incelemeyi amaçladık. Öncelikle U-118 MG hücre serisinde tek başına memantin ve kafeik asidin hücre canlılığına üzerine etkisine bakıldı. Sonrasında ise U-118 MG hücrelerinde hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile oksidatif stres oluşturuldu. Oksidatif stres öncesinde ve sonrasında memantin ve kafeik asit tek başına veya kombinasyon şeklinde uygulandı. XTT (2,3-bis [2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5- karboksianilid tuzu) hücre proliferasyon canlılık testi ile hücre canlılığındaki değişime bakıldı.



## 2. GENEL BİLGİLER

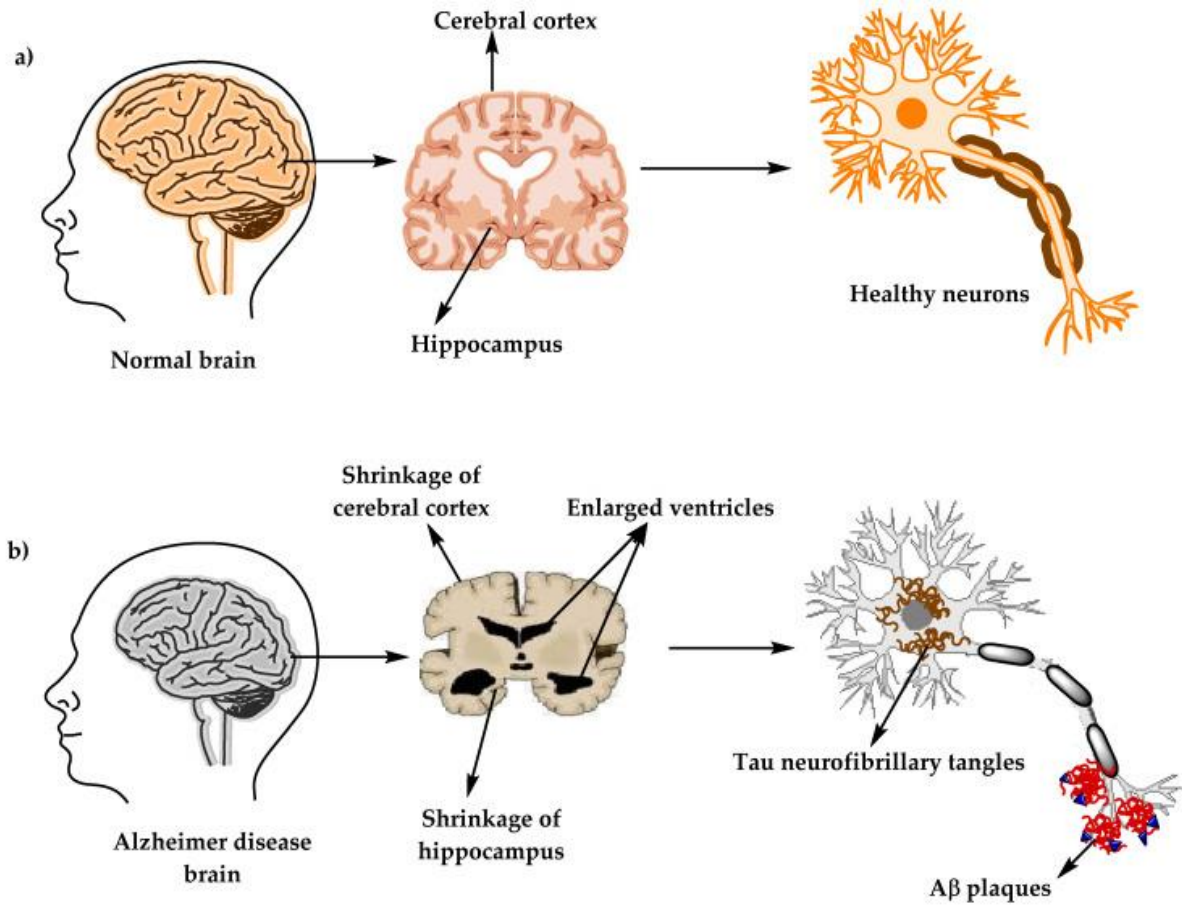
### 2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH), kronik bir nörodejeneratif hastalık olup sinir hücreleri arasındaki iletişimi bozar ve beyinde ilerleyici sinirsel dejenerasyona neden olan bir durumdur. Alzheimer hastalığı hafıza kaybı, bilişsel yeteneklerde azalma ve davranışsal değişiklikler gibi belirtilerle karakterizedir. Hastalığın ilerlemesiyle birlikte günlük yaşam etkinliklerini sürdürme yeteneği giderek azalır. Alzheimer hastalığı genellikle 65 yaş ve üstü bireylerde görülse de nadir durumlarda daha genç yaşlarda da ortaya çıkabilir. Alzheimer hastalığı demansın en yaygın türü olup Alman psikiyatrist Alois Alzheimer tarafından tanımlanmıştır. Hastalık nöritik plaklar ve nörofibriler düğümler olarak adlandırılabilen anormal protein birikimleri ile karakterizedir (Şekil 2.1). Bu anormal protein birikimleri en çok etkilenen beyin bölgeleri olan medial temporal lob ve neokortikal yapılarında bulunur. Amiloid plaklar özellikle beta amiloid adı verilen protein parçalarının (amiloid-beta peptidinin ( $A\beta$ )) birikmesi sonucu ortaya çıkar. Tau proteininin anormal birikimi ise nörofibriller yumaklar adı verilen yapıların oluşumuna yol açar. Bu yapılar sinir hücrelerinin normal işlevini bozarak hücre ölümüne ve beyin dokusunun zarar görmesine neden olur (19).

Alois Alzheimer, hafıza kaybı ve kişilik değişikliği yaşayan bir hastayı inceleyerek ölümünden önce yaptığı beyin incelemesinde amiloid plaklarının ve büyük miktarda sinir hücresi kaybının varlığını fark etmiş ve bu durumu serebral korteksin ciddi bir hastalığı olarak tanımlamıştır. Emil Kraepelin ise bu tıbbi durumu ilk kez 8. baskı psikiyatri el kitabında Alzheimer hastalığı olarak adlandırmıştır (20,21). Alzheimer hastalığı gibi serebral bozukluk veya zehirlenmeler, enfeksiyonlar, solunum ve dolaşım sistemlerinde anormallikler, beyne oksijen tedarikinin azalmasına neden olan beslenme eksikliği, B12 vitamini eksikliği, tümörler gibi diğer etkenler tarafından da bilişsel işlevlerin ilerleyici kaybına yol açabilir (22,23). Ayrıca AH'de beyin hücrelerinde meydana gelen haraplanmanın etiyojisi henüz tam olarak aydınlatılmamış olsa da hastalığın ortaya çıkmasındaki temel etkenlerin genetik faktörler, anormal proteinler, otoimmün reaksiyonlar, toksik reaksiyonlar, kafa travmaları ve virüsler olduğu düşünülmektedir (24). Hastalığın oluşumuna yol açan diğer etkenler arasında esansiyel elementlerin ve serebral kan damarlarının rolü olabileceği de varsayılmaktadır (25).

Ailesinde AH olan bir kişi, bu hastalık riskini taşımayanlara kıyasla 2 kat daha fazla Alzheimer hastalığına yakalanma riski ile karşı karşıyadır. Bu genetik geçiş %1 düzeyinde kalmaktadır ve temel olarak bu geçişin apolipoprotein E4 (Apo E4) alleli taşıyıcılığı, presenilin-1, presenilin-2,

ve amiloid prekürsör protein (APP) genlerindeki mutasyonlara bağlı olduğu düşünülmektedir (26,27). Orta ve ileri yaşlarda kalp damar rahatsızlıklarına neden olan kolesterolü taşıyan Apo E aleli normalde %16 pozitif iken, Alzheimer hastalığına sahip bireylerde bu oranın %35-50 dolaylarında pozitif olduğu saptanmıştır (28). Dolayısıyla bu proteini taşıyanların bir kısmının hastalığa yatkın olduğu söylenebilir (28). Hastalığın oluşum nedenleri arasında genetik faktörlerin bulunduğu belirtilmiş olsa da hastalığın oluşmasında genetik faktörün diğer etkenlere göre daha sınırlı ve düşük bir potansiyele sahip olduğu görülmektedir (26,28).



**Şekil 2.1** Beyin ve sinir hücrelerinin fizyolojik yapısı (a) Sağlıklı beyin (b) Alzheimer hastalığı (AD) beyin (19).

Şu anda dünya genelinde yaklaşık 50 milyon Alzheimer hastası bulunmakta, bu sayının her 5 yılda bir ikiye katlanarak 2050 yılında 152 milyona ulaşması beklenmektedir. Alzheimer hastalığı yükü bireyleri, aileleri ve ekonomiyi etkilemektedir ve tahmini olarak yıllık 1 trilyon dolarlık global maliyetlere neden olmaktadır. Şu anda Alzheimer hastalığı için bir tedavi bulunmamakla birlikte sadece belirtileri iyileştiren mevcut tedaviler bulunmaktadır. Dünya Alzheimer raporu 2015 verilerine göre dünya çapında tahmini 46,8 milyon demans hastası bulunmaktadır (29). Tüm demansların %60 ile %80'ini AH oluşturmaktadır (30).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2015 raporuna göre 60 yaş üzerinde tahmini AH prevalansı %11,2'dir. Türkiye'de ise bu oran %11 ile batılı ülkeler düzeyinde saptanmıştır (30). Yüksek prevalans oranı AH'yi ciddi bir halk sağlığı problemi yapıp araştırmalarda öncelikli bir konuma taşımaktadır (31). AH genel olarak 60'lı yaşlar sonrasında görülen bir hastalık olarak değerlendirilse de günümüzde var olan çevresel faktörler ve beslenme koşulları gibi etmenler neticesinde 45 yaş civarı gibi daha erken yaşlarda da görülebilmektedir.

**Tablo 2.1** Yıllara ve yaş gruplarına göre nüfus, Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) (30).

| Yıl  | Toplam      | 0-14       | 15-64      | 65+        | Oran (%) |       |      |
|------|-------------|------------|------------|------------|----------|-------|------|
|      |             |            |            |            | 0-14     | 15-64 | 65+  |
| 2018 | 81 867 223  | 19 203 792 | 55 500 077 | 7 163 354  | 23,5     | 67,8  | 8,7  |
| 2023 | 86 907 367  | 19 601 384 | 58 438 033 | 8 867 951  | 22,6     | 67,2  | 10,2 |
| 2040 | 100 331 233 | 19 333 893 | 64 623 369 | 16 373 971 | 19,3     | 64,4  | 16,3 |
| 2060 | 107 095 998 | 18 126 086 | 64 727 126 | 24 242 787 | 16,9     | 60,4  | 22,6 |
| 2080 | 107 100 904 | 16 813 783 | 62 873 761 | 27 413 359 | 15,7     | 58,7  | 25,6 |

Tablodaki rakamlar, yuvarlamadan dolayı toplamı vermeyebilir.

AH ilk kez Alman nöropatolog ve psikiyatrist Alois Alzheimer tarafından 1906 yılında tanımlanmıştır (32). Alzheimer hastalığı demansın en yaygın nedeni olarak bilinen bir nörodejeneratif hastalık türüdür (33). AH'nin temel olarak beynin algılama fonksiyonları üzerine olumsuz etkileri neticesinde unutkanlık ve konuşma bozukluklarının meydana geldiği bilinmektedir. Alzheimer hastalığının bir sinir sistemi hastalığı olması nedeniyle yapılan histopatolojik analizlerde hücre ölümü, sinaps kaybı (kolinerjik aktivitede zayıflama), nörofibriller yumakların (NFY) ve amiloid plakların artışıyla karakterize edilen bir hastalık tablosu gözlemlenmektedir (34). Bu hastalıkta nörofibriller yumaklarının ve amiloid plakların sinir hücrelerinin ölümleri tam olarak başlamadan önce bellek kaybı ve bunama belirtileri belirgin hale gelmeden önce oluşmaya başladığı düşünülmektedir (35).

Alzheimer hastalığının oluşum sürecinde genetik faktörlerin ve özellikle yaş ve çevresel faktörlerin değişkenliğine bağlı olarak hastalık patolojisinde nörofibriller yumaklar ve senil plaklar rol oynamaktadır (26). Bu hastalığın meydana gelmesindeki en önemli faktör A $\beta$  olarak adlandırılan plakların oluşması ve hücrelerarası boşlukta birikmesidir (26). A $\beta$  plakları transmembran bir protein olan APP'in metabolize edilmesi sonucu ortaya çıkar. Alzheimer hastalığında oluşan A $\beta$ 'nın kümeler halinde çökmesi SP olarak adlandırılan oluşumları meydana getirir. Bu plaklar toksik etkileri olmayan ve nöronlarda inflamasyona neden olmayan bir yapıya sahiptir (36). Ancak, ortamda oluşan oksidatif stres ve mikrogial aktivasyon gibi nedenlerle birlikte A $\beta$  plakları sert yapılı bir yapıya dönüşerek nörotoksik etkiye sahip zararlı bir oluşum halini almaktadır (36). Dejenere olmuş akson ve dentrit parçaları ile çözünür olmayan fibriller A $\beta$  yapıları nörofibriller yumaklar ile birlikte nöritik plakları oluşturmaktadır (37). Bireylerin yaşları ilerledikçe özellikle yaşlılık evresinde diffüz (senil) plaklar normal olarak görülürken, Alzheimer hastalığı bulunan bireylerin beyinlerinde ise nöritik plaklar daha çok yerleşim yeri olarak neokortekste gözlemlenmektedir (37).

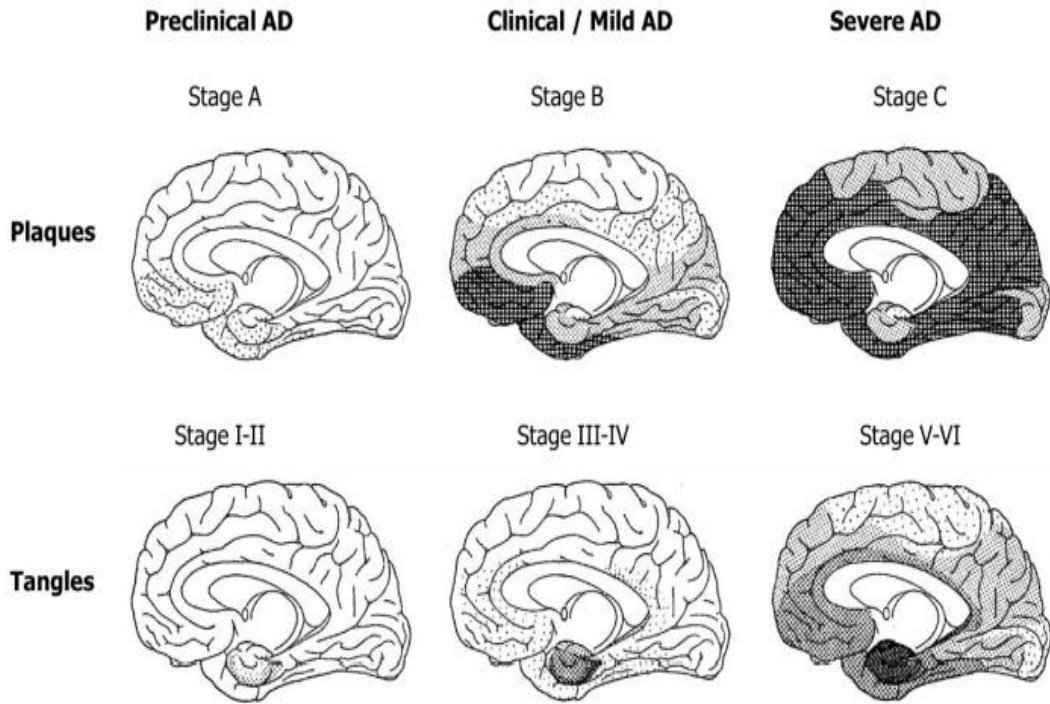
### **2.1.1 Alzheimer Hastalığı Tanı Kriterleri**

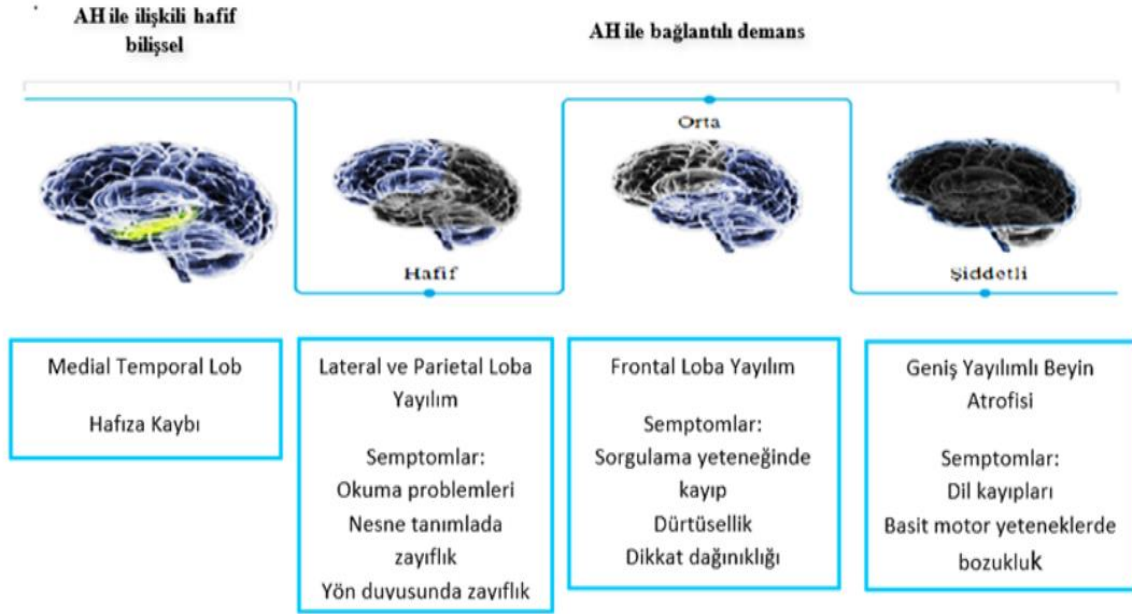
Alzheimer hastalığı tanısı konulan kişilerden alınan histopatolojik kesitlerde görülen nörofibriller yumaklar, aşırı şekilde hiperfosforile olmuş tau proteinlerinin çift sarmallı filamanlar halinde hücre içine çökmesi sonucunda oluşmaktadır (38). Bu nörofibriller yumaklar ilk etapta limbik alanda belirirken, hastalığın ilerleyişine bağlı olarak assosiasyon korteksinde görülmektedir (39). Alzheimer hastalığı nöropatolojisinde tespit edilen diğer nedenler sinir hücresi ölümleri ve buna bağlı olarak gelişen sinaps kayıpları, doğal akson ve dentrit yapılarındaki morfolojik değişiklikler, ayrıca mevcut nörotransmitter sistemlerin ve kortikal kolinerjik uyarımların işlevselliğindeki kayıpları içermektedir (38,39). Hasta bireyde demans tablosu ortaya çıkmadan önceki evre olarak tabir edilen preklinik evrede görülen patofizyolojik belirtilerin hastalığın teşhisi ve önlenmesinde ciddi bir öneme sahip olduğu bilinmektedir. Teşhis sürecinde dünya Alzheimer derneği en son 2011 yılında Alzheimer Hastalığını preklinik evre, Alzheimer hastalığı kaynaklı hafif kognitif bozukluk evresi ve Alzheimer hastalığı kaynaklı demans evresi olmak üzere 3 evrede tanımlamıştır (40,41).

Alzheimer hastası olduğundan şüphelenilen bir hastanın değerlendirilmesi için tıbbi ve aile öyküsü alınmasının yanı sıra nörolojik muayene yapılmalıdır. Ayrıca, nöronlar için manyetik rezonans görüntüleme (MRG), laboratuvar testleri arasında vitamin B12 düzeyleri gibi özel testler ve diğer tanısal testlere de başvurulması gerekebilir. Bu kapsamlı değerlendirme Alzheimer hastalığının tanısını destekleyebilir ve diğer potansiyel nedenleri dışlamak için

önemlidir (42). Vitamin B12 eksikliğinin nörolojik sorunlarla ilişkilendirildiği ve Alzheimer hastalığı riskini artırabileceği birçok çalışmada belirtilmiştir. Vitamin B12 eksikliğinin özel bir belirleyicisi yüksek homosistein düzeyleridir. Böylece oksidatif stres, kalsiyum girişinin artması ve apoptozis yoluyla beyin hasarına neden olabilir. Vitamin B12 eksikliği tanısı serum vitamin B12 düzeyi ölçümü ile birlikte tam kan sayımı ve serum homosistein düzeyleri testleri kullanılarak konulabilir (43,44).

1984 yılında Ulusal Nörolojik ve İletişimsel Bozukluklar ve İnme Enstitüsü (NINCDS) ve Alzheimer Hastalığı ve İlgili Bozukluklar Derneği (ADRDA), Alzheimer hastalığı için klinik tanı kriterlerini belirlemek üzere bir çalışma grubu oluşturdu. Bu kriterler şunları içermektedir: Olası Alzheimer hastalığı, nöropsikolojik testlerle teyit edilen bunama, ilerleyici hafıza kaybı, günlük yaşam aktivitelerinde bozulma ve dil bozukluğu (afazi), motor beceri bozukluğu (apraksi), algı kaybı (agnozi) gibi diğer semptomlar ile teşhis edilebilir. Bu semptomlar genellikle 40-90 yaş aralığında başlar ve herhangi bir sistemik veya beyin hastalığı bulunmamaktadır. Mümkün Alzheimer hastalığı nörolojik veya psikiyatrik bozuklukların olmaması ve başka bir hastalık durumunda uygulanabilir. Ancak, bunlar demansın temel nedeni değildir. Kesin Alzheimer hastalığı biyopsi veya otopsi sonucu elde edilen histopatolojik onay ile teyit edilir (45,46).





**Şekil 2.2** Alzheimer hastalığının beyin bölgelerinde yayılımı (39)

2011 yılında Ulusal Yaşlanma Enstitüsü-Alzheimer Derneği, Alzheimer hastalığının tanısında daha yüksek özgüllük ve duyarlılık için 1984 NINCDS-ADRDA kriterlerinde birkaç değişiklik yapmış ve güncellemeler yapmıştır. Yeni önerilen kriterler klinik ortamlarda kullanılmak üzere olası ve olası olmayan Alzheimer hastalığı demansını ve klinik biyobelirteçlerin yanı sıra patofizyolojik kanıtlara sahip olası veya olası Alzheimer hastalığı demansını içermektedir. Alzheimer hastalığı biyobelirteçleri iki ana kategoriye ayrılmıştır: (a) beyin amiloid belirteçleri, pozitron emisyon tomografisi (PET) ve beyin omurilik sıvısı (BOS) gibi yöntemlerle ölçülen amiloid beta ( $A\beta$ ) protein birikimlerini içerir; (b) nöron hasarının belirteçleri, serebrospinal sıvı tau, metabolik aktivite için florodeoksiglukoz (FDG) ve atrofi ölçümü için manyetik rezonans görüntüleme (MRG) gibi faktörleri içerir (47,48).

### 2.1.2 Alzheimer Hastalığı'nın Nöropatolojisi

Alzheimer hastalığındaki nöropatolojik değişiklikler, hastalığın ilerlemesi ve semptomları hakkında kanıt sağlayan iki tür değişikliği içerir. Pozitif lezyonlar (birikime bağlı): Alzheimer hastalarının beyinlerinde bulunan nörofibriller demetler, amiloid plaklar, distrofik nöritler, nöropil iplikler ve diğer birikintilerin birikmesiyle karakterizedir. Bu lezyonlar, hastalık ilerledikçe artan bir şekilde birikir ve Alzheimer hastalığının nöropatolojik özelliklerini oluşturur. Negatif lezyonlar (kayıplara bağlı): Sinirsel, nöropil ve sinaptik kayıplara bağlı olarak büyük atrofi ile karakterizedir. Bu tür lezyonlar hastalığın ilerlemesiyle birlikte sinir hücrelerinin kaybını ve beyin dokusunun küçülmesini gösterir. Ayrıca, nöroinflamasyon,

oksidatif stres ve kolinerjik nöronların hasarı gibi diğer faktörler de nörodejenerasyona neden olup ve Alzheimer hastalığının kompleks patofizyolojisine katkıda bulunabilir (49,50).

### **2.1.3 Senil Plaklar (SP)**

Senil plaklar beta-amiloid proteinin ( $A\beta$ ) hücre dışında birikimleridir ve farklı morfolojik formları içerir. Bu formlar arasında nevritik, yaygın, yoğun çekirdekli veya klasik ve kompakt tipte plaklar bulunmaktadır. Bu çeşitlilik senil plakların yapısal özelliklerini yansıtarak Alzheimer hastalığının patofizyolojik karmaşıklığını ortaya koymaktadır. Senil plakların oluşumu proteolitik kesim enzimleri aracılığıyla gerçekleşir. Bu enzimler arasında  $\beta$ -sekretaz ve  $\gamma$ -sekretaz bulunur. Bu enzimler transmembran amiloid öncül protein (APP) üzerinden  $A\beta$  birikimlerinin biyosentezinden sorumludur. Bu süreç Alzheimer hastalığının temel patofizyolojik mekanizmalarından biri olup ve  $A\beta$  birikimi sinir hücrelerini etkileyerek hastalığın ilerlemesine katkıda bulunabilir (51,52). Bu enzimler, transmembran amiloid öncül proteini (APP) birkaç amino asit parçasına keserek  $A\beta$  monomerlerini oluştururlar. Bu parçalar arasında 43, 45, 46, 48, 49 ve 51 amino asitleri içerir ve son hali olan  $A\beta$ 40 ve  $A\beta$ 42'ye ulaşırlar. Oluşan  $A\beta$  monomerleri arasında büyük ve çözünmeyen amiloid fibrillerin yanı sıra çözünür oligomerler de bulunmaktadır. Bu çeşitli  $A\beta$  türleri, amiloid plaklarını oluşturmak için birikime uğrayabilir ve çözünür oligomerler beyin boyunca yayılabilir.  $A\beta$ 'nin nörotoksitesi ve nöral fonksiyondaki önemi nedeniyle hipokampus, amigdala ve serebral kortekste yoğun plak birikimi, astrogliaların uyarılmasına, akson ve dendrit hasarına, sinaps kaybına ve bilişsel bozukluklara neden olabilir. Bu Alzheimer hastalığının temel patofizyolojik süreçlerinden biri olarak hastalığın ilerlemesine katkıda bulunabilir (52,53).

### **2.1.4 Nörofibril Demetleri (NFT'ler)**

NFT'ler bazı aşamalarda birbirine dolanabilen hiperfosforile tau proteini filamentleridir. Bu filamentler nöral-perikaryal sitoplazmada, aksonlarda ve dendritlerde birikerek sitoskeleton mikrotübüllerinin ve tübülünle ilişkili proteinlerin kaybına neden olurlar. Hiperfosforile tau proteini Alzheimer hastalarının beyinlerindeki NFT'lerin ana bileşeni olup evrimi NFT'lerin morfolojik aşamalarını yansıtabilir. Bu aşamalar şunları içerir: Pre-demet aşaması: Fosforile tau proteinlerinin somatodendritik bölmeye PHF oluşumu olmadan biriktiği NFT'yi içerir. Olgun NFT'ler: Tau proteininin filament birikimiyle karakterize ve nükleus somanın çevresine doğru yer değiştirdiği aşamadır. Ekstraselüler demetler veya hayalet NFT aşaması: Kısmi proteolize dirençli büyük miktarda filamentöz tau proteinine bağlı olarak nöron kaybından kaynaklanır (54,55).

### 2.1.5 Sinaptik Kayıp

Nörokorteks ve limbik sistemdeki sinaptik hasar hafıza bozukluğuna neden olabilir. Genellikle Alzheimer hastalığının erken evrelerinde gözlenir. Sinaptik kayıp mekanizmaları aksonal taşıma kusurları, mitokondriyal hasar, oksidatif stres ve diğer süreçleri içerir. Bu mekanizmalar sinaptik sitelerde beta-amiloid (A $\beta$ ) ve tau proteininin birikmesine katkıda bulunurlar. Bu süreçlerin sonunda dendritik dikenlerin, presinaptik terminalin ve aksonal distrofinin kaybına yol açar. Bu sinaptik hasar hastalığın ilerleyen aşamalarında daha geniş bir nöronal kayba ve bilişsel bozukluklara katkıda bulunabilir (56). Sinaptik proteinler sinaptik kaybın tespiti ve şiddeti için biyobelirteçler olarak kullanılır. Örneğin, postsinaptik bir nöronal protein olan nörogranin ve visinin benzeri protein-1 (VILIP-1) sinaptik hasarın belirlenmesinde potansiyel biyobelirteçler olarak öne çıkmaktadır. Ayrıca, sinaptotagmin-1 gibi diğer sinaptik proteinler de sinaptik kaybın biyolojik belirteçleri olarak kullanılır. Bu tür biyobelirteçler Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif durumların erken teşhisi ve ilerleyişinin izlenmesi gibi klinik uygulamalarda önemlidir (57,58).

### 2.1.6 Alzheimer Hastalığının Evreleri

Alzheimer hastalığının klinik evreleri şu şekilde sınıflandırılır: Ön klinik veya önsemptomatik evre: Birkaç yıl veya daha fazla sürebilen evre olarak hafif hafıza kaybı ve korteks ile hipokampusta erken patolojik değişikliklerle karakterizedir. Günlük aktivitelerde işlevsel bozulma olmayıp Alzheimer hastalığının klinik belirtileri ve semptomları henüz ortaya çıkmamıştır (19,59,60). - Hafif veya erken Alzheimer evresi: Hastalarda konsantrasyon ve hafıza kaybı, yer ve zaman karışıklığı, ruh hali değişikliği ve depresyon gibi bir dizi semptom ortaya çıkar (60,61). - Orta derecede Alzheimer evresi: Hastalığın hafıza tanıma güçlüğü, dürtü kontrolünün kaybı, okuma yazma ve konuşmada zorluk gibi alanlara yayılmasıyla karakterizedir (60). - Şiddetli Alzheimer veya ileri evre: Hastalığın tüm korteks alanına yayılmasıyla karakterizedir. Nöritik plakların ve nörofibriller demetlerin şiddetli birikimine yol açar. Sonuç olarak ilerleyici bir işlevsel ve bilişsel bozulma ortaya çıkar. Hastalar ailesini hiç tanıyamaz ve yatağa bağımlı hale gelir, yutma ve idrar yapma zorlukları yaşar ve sonunda bu komplikasyonlar nedeniyle ölüm gerçekleşir (19,62). Alzheimer hastalığının teşhisi genellikle klinik belirtiler, bilişsel testler ve beyin görüntüleme yöntemleri kullanılarak konur. Ancak, kesin tanı için genellikle otopsi veya beyin doku analizi gibi daha kesin yöntemlere ihtiyaç duyulabilir.

**Tablo 2.2** Demansta üç temel ve üç ikincil alanın sorgulanması (63)

|         | Kategori    | Etki Çeşidi                                                                                      | Gözlemler, Bulgular                                                                                                                  |
|---------|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Temel   | Kognitif    | Bellek                                                                                           | Yakın: yakın geçmişe ait kişisel ve aktüel olaylar;<br>Uzak: ilkökul öğretmenini, okuduğu okullar, evlilik, emeklilik tarihleri, vb. |
|         |             | Dikkat                                                                                           | Dalgalanma, konsantrasyon, çelinebilirlik                                                                                            |
|         |             | Dil                                                                                              | Kelime bulma, anlama, okuma, yazma, hesaplama güçlükleri                                                                             |
|         |             | Görsel-mekânsal işlevler                                                                         | Yabancı/tanıdık mekânlarda dolaşabilme, yazı karakterinde (Ortografik) değişiklik                                                    |
|         |             | Yürütücü işlevler                                                                                | Problem çözme, yargılama, soyutlama bozuklukları                                                                                     |
|         |             | Praksis                                                                                          | Alet kullanma, giyinme, oturma-yürüme güçlükleri                                                                                     |
|         |             | Gnosis                                                                                           | Nesneleri tanıma, mekânda birbirinden ayırma                                                                                         |
|         | Davranışsal | Kişilik değişiklikleri                                                                           | Apati, disinhibisyon, sosyal uygunsuzluk                                                                                             |
|         |             | Duygudurum bozuklukları                                                                          | Keder, isteksizlik, huzursuzluk, yerinde duramama, sinirlilik, uygunsuz                                                              |
|         |             | Algı bozuklukları                                                                                | Neşe, eşin peşinden ayrılmama, görsel ve diğer halüsinasyonlar                                                                       |
|         |             | Düşünce bozuklukları                                                                             | Hırsızlık, sadakatsizlik, Capgras ve diğer türden hezeyanlar                                                                         |
| İkincil | İşlevsel    | Sokakta GYA'lar                                                                                  | İş yaşamı, yolculuk, mali işler, alışveriş, sosyal ilişkiler                                                                         |
|         |             | Evde GYA'lar                                                                                     | Hobiler, ev aygıtlarını kullanma, yemek pişirme, diğer ev işleri, küçük tamirat, gazete-tv ilgisi                                    |
|         |             | Kendine bakım                                                                                    | Yemek yeme, yıkanma, giyinme, makyaj, traş olma, tuvalet mekânı                                                                      |
|         | Motor       | Yürüyüş bozukluğu, düşmeler, donmalar, dengesizlik, hareket yavaşlığı, güçsüzlük, erime, seyirme |                                                                                                                                      |
|         | Otonom      | İnkontinans, empotans, ortostatizm, konstipasyon, terleme                                        |                                                                                                                                      |
|         | Uyku        | REM-davranış bozukluğu, aşırı gündüz uykusu, uyku apne sendromu                                  |                                                                                                                                      |

Manyetik rezonans görüntüleme (MR) tekniği kullanılarak beyin incelendiğinde, genel yapısında küçülme gözlemlenir. Hastalığın ilerleyen aşamalarında bu küçülme daha belirgin hale gelirken, nörofibriller demetlerin oluşumuyla başlayarak ilk olarak temperomedial bölgedeki harabiyete bağlı olarak yakın bellek bozukluğu, hastalığın başlangıcı sonrası evrelerde gözlemlenmeye başlar. (39,64). AH'yi klinik olarak değerlendirmek için bulguların şiddetine bağlı olarak erken, orta ve ileri evreler olmak üzere üç evrede incelenir.

EVRE I (ERKEN): Amnestik Dönem (Bellek ve Konuşma Bozukluğu): Erken evrede semptomlar olarak yeni bilgilerin öğrenilmesinde zorluk ve bellek bozukluğu ortaya çıkar. Kelime veya cümle tekrarı, objelerin yerlerinin karıştırılması gibi belirtiler ortaya çıkar. Önceki ismini iyi bildiği kişilerin isimlerini unutma durumu da hastalığın tipik belirtilerindendir. Alzheimer hastalığının genellikle belirgin amnestik bilişsel bozulma ile kendini gösterdiği doğrudur. Ancak bazen, amnestik olmayan bilişsel bozukluklar da gözlemlenebilir. Kısa süreli bellek güçlüğü hastalığın en yaygın semptomudur, ancak aynı zamanda anlamlı konuşma, görsel-uzaysal işleme ve yürütme (zihinsel çeviklik) işlevlerinde de bozulmalar meydana gelir.

EVRE II (ORTA): Demans Dönemi (Entelektüel Bozulma): Orta evrede yeni bilgi öğrenimi tamamen durmuş, hastalığın başlangıç evresindeki belirtiler ilerlemiş ve kısmen günlük yaşamsal faaliyetlerde kayıp söz konusudur. Kişi yardıma ihtiyaç duyar.

EVRE III (İLERİ): Vejetatif Dönem (Bakım Gereksinimi): İleri evrede günlük yaşamsal faaliyetler, beslenme, giyinme vb. dışa bağımlı olarak ikinci bir kişinin yardımıyla gerçekleştirilir. Hasta yatar pozisyonda yaşamak durumunda olup ve yatak yarası enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonu, solunum sistemi hastalıkları, emboli ve beslenme bozukluklarına bağlı gelişen komplikasyonlar genellikle ölüm nedenlerini oluşturur. Zihinsel işlevler ileri evrede en alt seviyede olur (65).

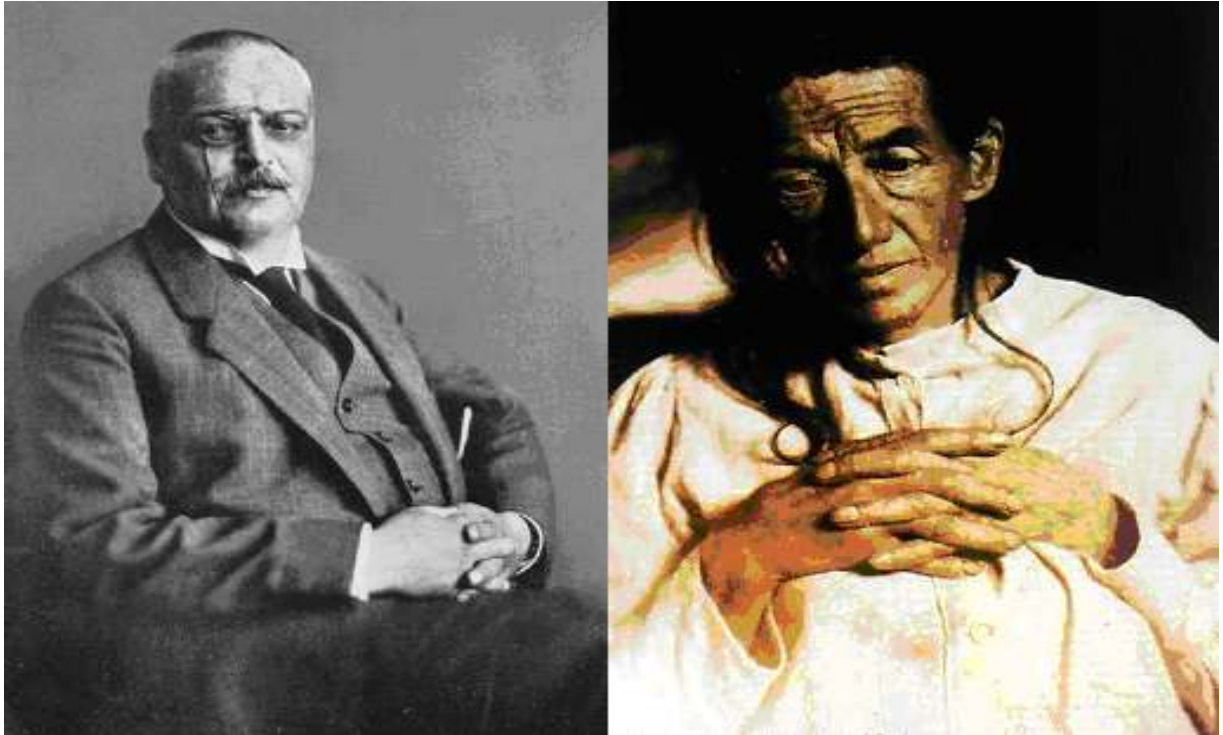
AH teşhisini takiben hastanın hayatta kalma süresi teşhis anındaki yaşa bağlı olarak değişiklik gösterebilir. 65 yaşında AH teşhisi konan kişiler için ortalama hayatta kalma süresi yaklaşık 8,3 yıl iken 90 yaşında kişiler için bu süre yaklaşık 3,4 yıl olabilir. Ancak bu süreler hastadan hastaya büyük farklılıklar gösterebilir ve her bireyde hastalığın seyri farklı olabilir. Tercih edilen medikal tedavi prensipleri semptomlara göre değişiklik göstermektedir. Alzheimer hastalığındaki tedavi yaklaşımları şunlardır:

➤ APP ekspresyonunu inhibe etmek, ➤ Aβ proteinlerin üretimini inhibe etmesi: α-sekretaz aktivasyonu, β-sekretaz inhibisyonu, γ-sekretaz modülasyonu ➤ Amiloid fibril formlarının inhibisyonu ➤ Aβ fibrillerin toksisitesinin inhibisyonu ➤ Asetil kolin esteraz inhibitörleri ➤ NMDA reseptör antagonistleri (Memantin) ➤ Non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) ➤ Kolesterol azaltıcı ilaçlar ➤ Metal şelatörleri ➤ Östrojenler ➤ Antioksidanlar ➤ Antifibrilizasyon ajanları (proteoglikanlar) ➤ Tau proteinlerinin hiperfosforilasyonunun önlenmesi; Lityum tedavisi, tau proteinlerinin fosforilasyonu ile NFY oluşumu için kritik öneme sahiptir. Glikojen sentaz kinaz 3 beta (GSK 3β) gibi hücre içi kinazlara bağlıdır. Bu mekanizmayı lityum ve valproik asit inhibe eder. Lityumun hücre kültüründe ve transgenik farelerde GSK 3β'yı inhibe ederek tau proteinlerinin hiperfosforilasyonunu azaltabileceği

gösterilmiştir. ➤ Sinir Büyüme Faktörü Gen Terapisi (CERE-110): Sıçanlarda yapılan çalışmalar, ekzojen sinir büyüme faktörü (NGF) uygulamasının, eksitoksik neokorteks lezyonları sonrasında bazal çekirdeklerde nöron kaybını azalttığını ve atrofiyi düzelttiğini göstermiştir (65).

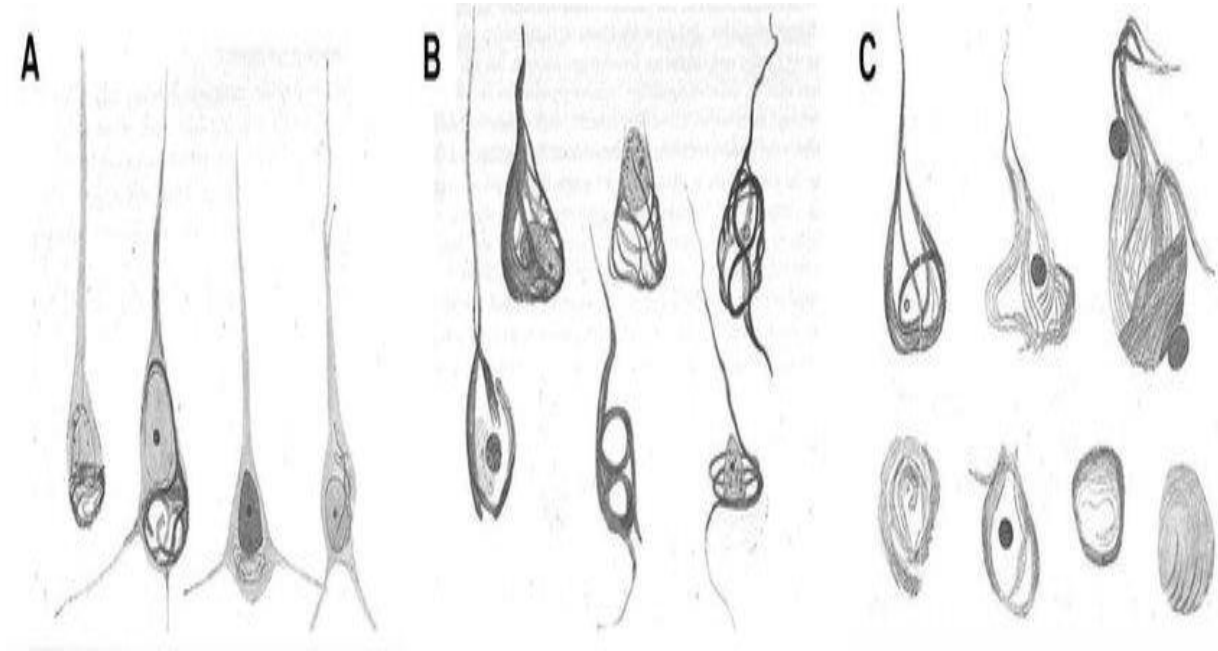
### 2.1.7 Alzheimer Hastalığının Tarihçesi

Alzheimer hastalığı adını Alman nöropatolog Alois Alzheimer'den almaktadır. Mart 1901'de 50 yaşındaki Auguste Deter'in kocası karısında hızlı bir ilerleme gösteren yoğun uyku bozuklukları, hafıza kaybı, saldırganlık, ağlama ve kafa karışıklığı belirtilerini fark etti. Bunun üzerine 51 yaşındaki hasta 25 Kasım 1901'de tedavi için Frankfurt Akıl Hastanesine yatırıldı. Hastalığın tarihi, Alois Alzheimer'in 1906 yılında bir kadın hastayı inceleyerek yaptığı gözlemlerle başlar. Alzheimer 1901 yılında "Auguste D" olarak anılacak olan 51 yaşındaki bir kadın hastayı tedavi etmek üzere Frankfurt'taki bir psikiyatri hastanesine başvurmuştur. Auguste D'nin hafıza kaybı, anksiyete, dil bozuklukları ve davranışsal değişiklikler gibi belirtiler gösterdiğini gözlemlemiştir. Auguste Deter'in semptomlarını yıllarca derinlemesine inceleyen kıdemli asistan Alois Alzheimer, hastanın semptomlarının zamanla giderek kötüleşmesi nedeniyle Auguste Deter'in 8 Nisan 1906'de ölümüne kadar hastanede kalmasını sağlamıştır.



**Fotoğraf 2.1** Alois Alzheimer ve Auguste Deter (66)

Auguste Deter'in ölümünden sonra, Alzheimer hastalığıyla ilgili araştırmalarını sürdüren Alois Alzheimer, hastanın 4 yıl boyunca tutulan tıbbi kayıtlarını kullanarak hastanın semptomları ile beyin dokusu arasındaki ilişkiyi araştırmak için beyin biyopsisi yapmıştır. Bu çalışmada, serebral korteksin genel olarak incelendiği ve hafızayı, dili, yargılamayı ve düşünmeyi kontrol eden bölgenin ciddi şekilde bozulduğu belirlendi. Ayrıca, nöronlarda senil plaklar ve nörofibriller yumaklar tespit edildi. Alzheimer'ın bulguları, dönemin tıp doktorları arasında 70 yaşın üzerindeki hastalarda senil plakların bulunabileceği fikrine rağmen, aynı hastada nörofibriller yumakların da ortaya çıkmasıyla çelişki oluşturdu. Bu sonuçlar ve 4 yıldan fazla bir süre boyunca kaydedilen klinik bulgular arasındaki ilişki, Alzheimer'ın Tübingen toplantısında yaptığı konuşmanın temelini oluşturdu.



**Şekil 2.3** Alzheimer hastalığının farklı nörofibriller sarmal evrelerini gösteren çizimler (66)

Kraepelin'in teşviki üzerine Alzheimer, Almanya'nın güneybatısında bulunan Tübingen'de düzenlenen 37. psikiyatri konferansında, 51 yaşındaki Auguste Deter'in semptom ve beyin biyopsisi sonuçlarını "Serebral korteksin kendine özgü ciddi bir hastalık süreci" adlı çalışmasıyla 3 Kasım 1906 yılında bildirilmiş, ancak akademi tarafından yeterli ilgi görmemiştir. Alzheimer, çalışmalarını bir yıl sonra 1907'de bir araştırma makalesi olarak yayınlarak raporun içeriğini güçlendirmiştir. Hastalık, 1910'da Emil Kraepelin tarafından yayınlanan psikiyatri kitabında ilk kez "Alzheimer Hastalığı" olarak adlandırılmıştır. Alzheimer'in çalışmaları 1910 yılında "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde" (Beyin kabuğunun tuhaf bir hastalığı hakkında) başlıklı bir makaleyle yayımlanmıştır. Bu makalede

Alzheimer, hastalığın sinir sistemi üzerindeki etkilerini detaylı bir şekilde açıklamış ve hastalığın temel belirtilerini ve patolojik bulgularını tanımlamıştır. Alzheimer'in keşifleri, amiloid plaklar ve nörofibriller yumaklarının Alzheimer hastalığının temel özellikleri olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgular, Alzheimer hastalığının nörodejeneratif bir hastalık olduğunu ve sinir hücrelerinin ilerleyici olarak hasar gördüğünü göstermiştir.

Alois Alzheimer'in çalışmaları, Alzheimer hastalığı hakkındaki bilgilerin ilerlemesine ve hastalığın daha iyi anlaşılmasına önemli katkılarda bulundu. Günümüzde Alzheimer hastalığıyla ilgili yapılan araştırmalar, tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ve hastalığın yaygınlığının azaltılması için devam etmektedir. Alzheimer hastalığı genellikle demans vakalarının %60 ila %80'ini oluşturan en yaygın demans alt tipi olarak kabul edilmektedir. Klinik olarak teşhis edilen Alzheimer hastalığının prevalansı yüksektir. Bu durumun popülasyonun yaşlanmasıyla ilişkili olarak artması beklenmektedir (56,57). Yapılan birçok çalışmanın AH prevalansı üzerine sunduğu tahminlere göre hastalık genellikle 60 yaş üstü popülasyonun %3-4'ünü etkilemektedir (58). Çin'de yapılan bir araştırmada elde edilen prevalans tahminlerine göre hastalığın prevalansı 55-59 yaş aralığında %0,2 civarında iken, bu oranın 95-99 yaş aralığında %48,2'ye yükseldiği gözlenmiştir (59). Ayrıca, yapılan çalışmalarda Alzheimer hastalığının kadınlardaki prevalansının erkeklerden daha fazla olduğu belirtilmiştir. Prevalansta olduğu gibi insidansta da yaşa bağlı olarak artış gözlenmektedir. Avrupa'da yürütülen çalışmaların bir meta analizinde kadınlarda yılda her 1000 kişiden 13.3'ünde, erkeklerde ise yılda her 1000 kişiden 7.02'sinde Alzheimer hastalığı bulunmuştur (60).

### **2.1.8 Alzheimer Hastalığının Nedenleri ve Risk Faktörleri**

Hastalığın ilerlemesiyle ilişkilendirilen risk faktörlerini anlamak hastaların gelecekle ilgili kararlar almalarına yardımcı olur. Ayrıca, klinik gelişim ve tedavi kullanımına rehberlik ederek ilerlemeyi yavaşlatma potansiyel bir rol oynayabilir (61). AH yaştan ilerlemesi, genetik faktörler, baş yaralanmaları, vasküler hastalıklar, enfeksiyonlar ve çevresel faktörler (ağır metaller, iz elementler) gibi birçok risk faktörü ile ilişkili çok faktörlü bir hastalık olarak kabul edilir (Tablo 2.3). Alzheimer hastalığının patolojik mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak, amiloid beta birikimi, tau proteininin hiperfosforilasyonu, kolinerjik sistemin bozulması ve beyindeki inflamasyon gibi birçok hipotez ve teori hastalığın olası gelişim mekanizmalarını açıklamaya çalışmaktadır. Bu hipotezlerden hiçbirisi tek başına yeterli

olmazken Alzheimer hastalığının karmaşıklığı genetik, çevresel ve yaşa bağlı faktörlerin birleşimine işaret etmektedir (67,68).

**Tablo 2.3** Başlıca Alzheimer için risk faktörleri (69)

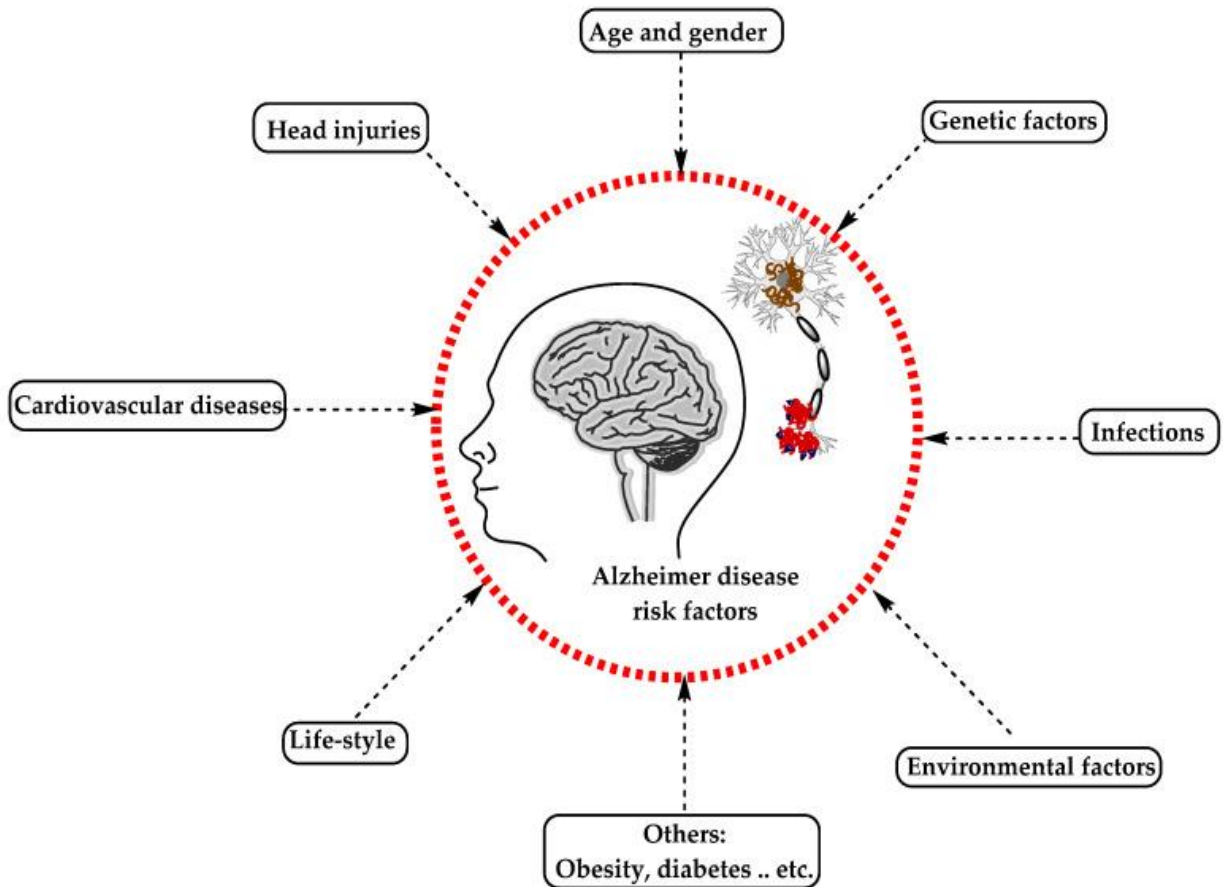
|                              |                              |
|------------------------------|------------------------------|
| İleri Yaş                    | Hipertansiyon                |
| Aile hikayesi                | Homosistein                  |
| Apolipoprotein E4 alleli     | Diyabet                      |
| Down sendrom                 | Vitamin B12 eksikliği        |
| Düşük eğitim seviyesi        | Dislipidemiler               |
| Sık kafa travması            | Hipotiroidizm                |
| Kadın cinsiyet               | İnfeksiyonlar                |
| Nörotoksinler, sigara, alkol | Serum demir eksikliği        |
| Serebrovasküler hastalık     | Ferritin yüksekliği          |
| Östrojen kullanımı koruyucu  | C-reaktif protein yüksekliği |
| NSAİİ koruyucu               | Folat eksikliği              |
| Miyokard infarktüsü          | Menapoz                      |

## 2.2 Alzheimer Hastalığının Hipotezi

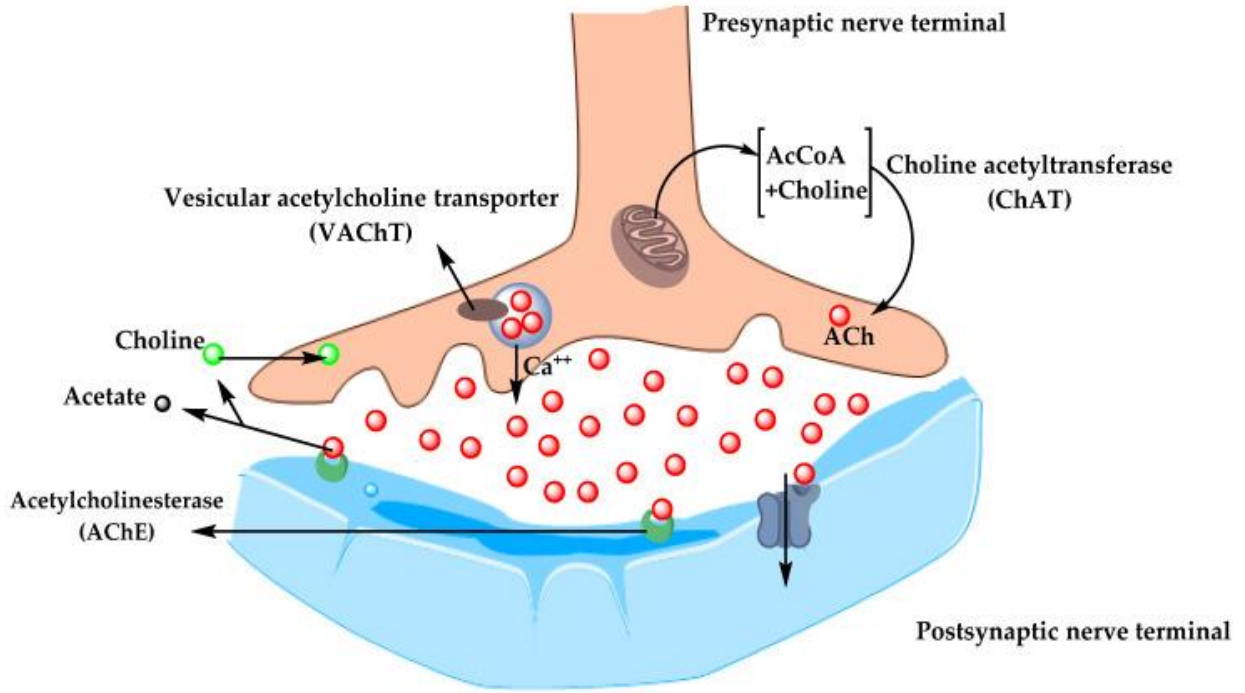
### 2.2.1 Kolinerjik Hipotezi

1970'lerde, Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilen neokortikal ve presinaptik kolinerjik eksikliklerin, asetilkolin (ACh) sentezinden sorumlu olan kolin asetiltransferaz (ChAT) enzimi ile bağlantılı olduğu keşfedildi. Bilişsel fonksiyonlarda asetilkolinin temel rolü göz önüne alındığında, Alzheimer hastalığı için bir kolinerjik hipotez öne sürüldü. ACh, ChAT enzimi tarafından kolin ve asetil-koenzim A'dan kolinerjik nöronlarda sitoplazmada sentezlenir ve sinaptik veziküllere veziküler asetilkolin taşıyıcı (VACHT) tarafından taşınır (Şekil 2.5).

Beyindeki ACh hafıza, dikkat, duysal bilgi, öğrenme ve diğer önemli fizyolojik süreçlerde kritik bir rol oynar. Alzheimer hastalığında kolinerjik nöronların dejenerasyonu gerçekleşir ve bu durum bilişsel fonksiyonlarda ve hafıza kaybında değişikliklere neden olur. B-amiloidin, kolinerjik nörotransmisyonu etkileyerek kolin alımında azalmaya ve ACh salınımında düşüşe yol açtığı düşünülmektedir. Araştırmalar A $\beta$  oligomerlerinin nörotoksitesi ve AChE ile A $\beta$  peptid arasındaki etkileşimlerin kolinerjik sinaptik kaybı ve amiloid fibril oluşumu ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Presinaptik kolinerjik terminallerde bulunan nikotinik ve muskarinik (M2) ACh reseptörlerindeki azalmaya ve uyarıcı amino asit (UAA) nörotransmisyonundaki eksikliğe ek olarak Alzheimer hastalarının beyinlerinde glutamat konsantrasyonu ve D-aspartat alımında önemli ölçüde azalma görülmektedir. Ayrıca, Alzheimer hastalığının ilerlemesine katkıda bulunan faktörler arasında kolinerjik reseptör antagonisti olan skopolamin gibi maddelerin kullanımı da yer alır. Ancak, bu etkiler asetilkolin oluşumunu aktive eden bileşiklerin kullanımıyla tersine çevrilebilir (70,71).



Şekil 2.4 Alzheimer hastalığı için risk faktörleri (67)



**Şekil 2.5** Presinaptik ve postsinaptik sinir uçları arasında asetilkolinin sentez ve taşıma yolları (70).

Sonuç olarak, kolinerjik hipotez üç temel kavrama dayanmaktadır. Serebral kortekste azalmış presinaptik kolinerjik işaretleyicilerin varlığı, bu da Meynert bazal çekirdeğinde (NBM) kolinerjik innervasyonun ciddi nörodejenerasyonu ile ilişkilidir. - kolinerjik antagonistlerin, agonistlere kıyasla bellek bozukluğunda rol oynadığı ve bu etkinin tersine çevrilebildiği bir mekanizma ile ilişkilidir (72).

### 2.2.2 Amiloid Hipotezi

Yıllardır merkezi sinir sisteminde  $\beta$ -levhaların anormal bir şekilde birikmesinin demans ile güçlü bir ilişkisi olduğu tespit edilmiş ve amiloid hipotezi kavramına yol açmıştır. Ancak, amiloid plakların (AP) yaşlanmayla birlikte normal sağlıklı beyinlerde de biriktiği bulunmuştur. Böylece AP birikiminin Alzheimer hastalığının başlangıcından sorumlu olup olmadığı sorusunu gündeme getirmiştir. Son yıllarda Alzheimer hastalığının kalıtsal olmayan formu (NIAD) için alternatif hipotezler önerilmiş olsa da şu anda amiloid hipotezi kalıtsal Alzheimer hastalığı (IAD) için en kabul gören patolojik mekanizma olarak kalmaktadır. Amiloid hipotezi, APP'den  $\beta$ - ve  $\gamma$ -sekretaz tarafından türetilen  $A\beta$ 'nin yıkımının yaşla veya patolojik durumlarla azaldığını ve böylece  $A\beta$  peptitlerinin ( $A\beta_{40}$  ve  $A\beta_{42}$ ) birikimine yol açtığını öne sürmektedir.  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  oranının artması,  $A\beta$  amiloid fibril oluşumunu indükler. Bu durum nörotoksite ve tau patolojisi indüksiyonuna yol açar, nöron hücre ölümü ve nörodejenerasyon meydana gelir. Alzheimer hastalığı risk faktörleri arasında APP, PSEN1 ve

PSEN2 gibi çeşitli genlerin mutasyonları etkileyerek A $\beta$ 'nin hızlı birikimine ve nörodejenerasyonun hızlı ilerlemesine neden olur (73,74).

### **2.3. Alzheimer Hastalığının Risk Faktörleri**

#### **2.3.1 Yaşlanma**

Alzheimer hastalığındaki en önemli risk faktörü yaşlanmadır. Genç bireyler nadiren bu hastalığa sahiptir ve çoğu Alzheimer hastalığı vakası 65 yaşından sonra başlar (75). Yaşlanma, beyin hacminin ve ağırlığının azalması, sinaps kaybı, belirli bölgelerde ventrikül genişlemesi ile birlikte amiloid plak birikimi ve nörofibril yumak oluşumu gibi karmaşık ve geri dönüşümsüz süreçleri içerir. Ayrıca yaşlanma sürecinde glikoz hipometabolizması, kolesterol disomeostazı, mitokondri fonksiyon bozukluğu, depresyon ve bilişsel gerileme gibi çeşitli durumlar ortaya çıkar. Bu değişiklikler normal yaşlanmanın bir parçası olarak kabul edilir ve bu nedenle erken AH vakalarını ayırt etmeyi zorlaştırır (76,77). Alzheimer Hastalığı, başlangıç yaşına göre iki temel tipe ayrılabilir: Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı (EOAD) ve daha yaygın olan Yaşlı Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı (LOAD). EOAD, nadir görülen bir form olup vakaların %1-6'sını oluşturur. Genellikle 30-60 veya 65 yaş arasında görülen bu vakalar, Alzheimer hastalığına sahip birden fazla üyeye sahip ailelerde ortaya çıkar. LOAD ise 65 yaşın üzerinde başlangıç gösteren daha yaygın bir durumdur. Her iki tip de Alzheimer hastalığı geçmişi pozitif olan ailelerde ve geç başlangıçlı hastalığa sahip ailelerde ortaya çıkabilir (78).

#### **2.3.2 Genetik**

Yıllar içinde genetik faktörlerin keşfi Alzheimer hastalığının gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Alzheimer hastalığı vakalarının %70'i genetik faktörlere bağlıdır. Erken başlangıçlı Alzheimer hastalığı vakalarının çoğu otozomal dominant kalıtım desende miras alınır ve Amiloid prekürsör protein (APP), PSEN-1, PSEN-2 ve ApoE gibi baskın genlerdeki mutasyonlar Alzheimer hastalığı ile ilişkilidir. Bu bağlamda Alzheimer hastalığındaki güçlü genetik risk faktörlerini tartışıyoruz (79,80).

#### **2.3.3 Amiloid Prekürsör Protein (APP)**

APP,  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$ -sekretaz tarafından kesilerek A $\beta$  ve diğer proteinlerin salınımını sağlayan tip I transmembran proteinidir ve APP geni kromozom 21'de bulunmaktadır. APP geninde toplam 30 mutasyon bulunmaktadır, bunlardan 25'i Alzheimer hastalığı ile ilişkilidir ve yüksek miktarda A $\beta$  birikimine neden olurlar. Ayrıca, A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 ve A $\beta$ 'nin salınımını azaltarak Alzheimer hastalığına karşı koruyucu bir etkisi olduğuna inanılan A673T adlı bir koruyucu

mutasyon da bulunmaktadır (81,82). Tüm mutasyonlar, sekretaz kesim bölgesini etkiler. Örneğin, KM670/671NL mutasyonu fare modellerinde hipokampus ve kortekste artan seviyelerde amiloid plaklarını göstermiştir. A673V, D678H, D678N, E682K ve K687N mutasyonları kortikal atrofiye neden olurken E682K mutasyonu hipokampal atrofiye yol açmıştır. NFT'lerin ve A $\beta$ 'nin varlığını, mikroglia ve astrosit aktivasyonunu, ayrıca nöron kaybını içeren nöropatolojik raporlar, A673V mutasyonuna özgü olarak ortaya çıkmıştır. Diğer belirtilen mutasyonlarla karşılaştırıldığında intrasellüler A $\beta$ 'de bir değişiklik gözlenmemiştir (81,83).

T714I, V715A, V715M, V717I, V717L, L723P, K724N ve I716V gibi diğer mutasyonlar  $\gamma$ -sekretaz kesim bölgesini etkileyerek A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 oranında artışa neden olurken E693G, E693K, D694N ve A692G mutasyonları  $\alpha$ -sekretaz kesim bölgesini etkiler ve hücre zarı bütünlüğünü bozabilen polimorfik agregatlar oluşturur. Ayrıca, E693delta sinaptotoksik A $\beta$  oluşumunu arttıran bir silme mutasyonudur (84,85).

### **2.3.4 Presenilin-1 (PSEN-1) ve Presenilin-2 (PSEN-2)**

EOAD'nin otozomal dominant şekilde kalıtılan formlarını temsil eden PSEN1 ve PSEN2 genleri sırasıyla kromozom 14 ve kromozom 1 üzerinde bulunan genlerdir. PSEN-2 ve PSEN-1 homologdur ve %67 benzerliğe sahiptir, ancak N-terminus ve hidrofilik bölgede farklılıklar bulunur. PSEN1 genindeki mutasyonlar daha yaygındır ve 200'den fazla mutasyon içermektedir, PSEN2 geninde ise daha az sayıda (40'tan az) mutasyon tanımlanmıştır (86,87). PSEN1,  $\gamma$ -sekretaz kompleksini aktive eden ve APP'den A $\beta$ 'nin üretiminde önemli bir rol oynayan çekirdek bir proteindir. Farelerde yapılan PSEN1 geni silme çalışmaları sinaptik işlev bozukluğu ve bellek bozukluğu göstermiştir. Bu da PSEN1'in belleği ve nöronları korumadaki temel rolünü vurgulamaktadır (84). PSEN1 mutasyonları basit bir amino asit değişimi içerebileceği gibi, şiddetli mutasyonlar iki amino asidin yerine geçmesi sonucunda ortaya çıkabilir (88).

PSEN1 genindeki mutasyonlar, A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 oranını artırarak A $\beta$ 40 düzeylerini azaltması ile etki gösterir. Sun ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, PSEN1 knock-in farelerindeki C410Y veya L435F mutasyonları A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 oranını artırmıştır. Böylece A $\beta$ 40'taki azalma nedeniyle A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 oranının daha yüksek olduğunu göstermektedir (89). PSEN-2 mutasyonları genellikle nadir olup A $\beta$  üretiminde daha küçük bir rol oynar. Ancak, PSEN-2'deki herhangi bir mutasyon normal PSEN-1 alellerinin varlığında ailesel Alzheimer hastalığına neden olabilecek şekilde A $\beta$  42/40 oranında ciddi bir etkiye sahiptir. PSEN-2 mutasyonlarından

bazıları  $\gamma$ -sekretaz aktivitesinde önemli bir artışa neden olarak  $A\beta$ -42 ve  $A\beta$  42/40 oranını yükselten mutasyonları içerir. Diğerleri (N141I, T122P, M239V ve M239I) ise nadir polimorfizmalar olarak kabul edilir ve  $A\beta$ -42,40 ve  $A\beta$  42/40 oranı düzeyleri üzerinde etkisi yoktur, bu nedenle patojenik mutasyonlar olarak kabul edilmez (86,90).

### **2.3.5 Apolipoprotein E (ApoE)**

ApoE protein, karaciğerde ve beyinde astroglia ile bazı mikrogliyalarda yoğun olarak ifade edilen bir glikoproteindir. Normal beyin fonksiyonu için miyelin üretimi ve kolesterol gibi lipoprotein parçacıklarının reseptör aracılı endositoz ligandı olarak görev yapar. ApoE geni kromozom 19'da yer alır ve üç izoforma (ApoE2, ApoE3, ApoE4) sahiptir. Bu izoformlar, tek nükleotid polimorfizmaları (SNP'ler) nedeniyle kodlama dizisinde değişikliklere yol açarlar. ApoE $\epsilon$ 4 aleli, ApoE $\epsilon$ 2 ve ApoE $\epsilon$ 3 alelleriyle karşılaştırıldığında erken başlangıçlı Alzheimer hastalığı ve yaşlı başlangıçlı Alzheimer hastalığı için güçlü bir risk faktörü olarak daha yüksek risk ve koruyucu etki ile ilişkilidir (91). ApoE $\epsilon$ 4 AH'de senil plak olarak bilinen  $A\beta$  birikiminde önemli bir rol oynar ve serebral amiloid anjiyopati (CAA) oluşturur. ApoE $\epsilon$ 4, Alzheimer hastalığı patogeneziyle bağlantılı olarak beyinde vasküler hasarla ilişkilendirilmiştir (92,93).

### **2.3.6 ATP Bağlayıcı Kaset Taşıyıcı A1 (ABCA1)**

Adenozin trifosfat (ATP) bağlayıcı kaset taşıyıcı A1 (ABCA1), dolaşımda kolesterolün yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) gibi lipoprotein parçacıklarına yanı sıra beyne kolesterol efleksi için büyük ABC taşıyıcı ailesinin bir parçasıdır. Ayrıca ABCA1, ApoE'nin lipidasyonunun stabilitesini sağlar ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) oluşumunda aracı olarak görev yaparak ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıklarda rol oynar. Alzheimer hastalığı fare modelinde yapılan çalışmalar, ABCA1 eksikliğinin amiloid plaklarını artırdığını ve ApoE lipidasyonunu ortadan kaldırdığını göstermiştir (94). İnsanlarda ABCA1 mutasyonu, düşük seviyelerde yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ve ApoAI ile karakterize olan ve doku içinde kolesterol birikimi ile ilişkilendirilen Tangier hastalığına neden olur (95).

### **2.3.7 Küme Geni (CLU) ve Köprü Entegratörü 1 (BIN1)**

PSEN1, PSEN2 ve APP mutasyonlarına ek olarak LOAD için yeni risk faktörleri arasında küme ve Köprü Entegratörü 1 genleri yer alır. 2009'da gerçekleştirilen Genom Çapında Birleşik Çalışmalar (GWAS), Alzheimer hastalığına ait beyin korteksi ve hipokampus, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve plazmada artan CLU genini tanımlamıştır. Böylece CLU'nun Alzheimer hastalığı için umut verici bir biyobelirteç olarak değerlendirilmesini sağlamıştır. CLU,  $A\beta$  ile

etkileşime girerek ya temizlenmesini teşvik eder ve koruyucu bir rol oynar yada A $\beta$ 'nin temizlenmesini azaltarak nörotoksik bir rol oynayabilir. CLU'nun nörokoruyucu veya nörotoksik rolü A $\beta$  oranı değerlerine bağlıdır (96). BIN1, zar kıvrılmasının oluşumu ve diğer endositoz hücresel işlevlerde rol alan Bin-Amfifizin-Rvs (BAR) adaptör proteinidir. Çeşitli izoformlara sahip olan BIN1, beyinde bulunan bazı izoformlar aracılığıyla klatrin, sinaptojanin ve amfifizin 1 gibi farklı proteinlerle etkileşime girer. Diğer izoformlar ise sinaptik vezikül endositozunu düzenler. Son zamanlarda BIN1'in ApoE'den sonra LOAD için ikinci en önemli risk faktörü olarak kabul edilmiş ve A $\beta$  üretiminde tau ve NFT patolojisi modülatörü olarak rol oynadığı belirlenmiştir (97,98).

### **2.3.8 Toll Yolunda'ki Evrimsel Olarak Korunmuş Sinyal Aracı (ECSIT)**

AH beyinlerinde A $\beta$ 'nin belirgin birikimi protein oksidasyonundaki artışla bağlantılıdır. Bu durum A $\beta$  sitotoksitesisi ve AH patogenezi açısından mitokondrinin kritik rolünü yansıtmaktadır. Genetik açıdan korunmuş bir sinyal aracı olan Toll yolundaki gen, AH riski ile ilişkilendirilmiş ve kromozom 19'da konumlanmıştır. ECSIT, mitokondriyal solunum kompleksinin stabilizasyonundan sorumlu olan bir adaptör proteinini kodlar. Aynı zamanda nükleer faktör (NF)- $\kappa$ B, interferon düzenleyici faktörler (IRF'ler) ve aktivasyon protein-1'in aktivasyonunda rol alır. Bunun yanı sıra immün toll benzeri reseptör (TLR), homeostatik kemik morfogenetik yolu (BMP) ve dönüşüm büyüme faktörü-beta (TGF-b) yollarına bağlanmada da görev alır (99). ECSIT mitokondriyal proteinler (Lon proteaz homologu (LONP1), glutaril-CoA dehidrogenazı (GCDH), ApoE, PSEN-1 ve PSEN-2 gibi AH genleri ile etkileşime girer. Bunlar intra-mitokondriyal proteoliz ve redoks sinyalleşme ile ilgili olanlar ardından AH tohum nitrik oksit sentazı (NOS3) ile etkileşir. Bu etkileşimler ECSIT'in oksidatif stres, enflamasyon ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu arasında moleküler bağlantı olarak rolünü desteklemektedir (99,100).

### **2.3.9 Östrojen Reseptörü Geni (ESR)**

Alzheimer hastalığı kadınlar ve erkekler arasında etkili olsa da vakaların yaklaşık üçte ikisi kadınlarda görülmektedir. Yapılan birçok çalışma kadınların AH'de erkeklere kıyasla daha kötü mental bozulma yaşadığını göstermiştir. Genetik düzeyde ApoE4 aleli gibi bazı genetik varyasyonlar kadınlarda Alzheimer riskini önemli ölçüde artırabilir. Diğer araştırmalar kadınlarda Alzheimer riskinin menopoz sırasında yumurtalık hormonlarının kaybıyla ilişkilendirildiğini belgelemiştir. Östrojen beyinde nörotransmisyon, sinir gelişimi, hayatta kalma, oksidatif stresle mücadele, A $\beta$  peptid seviyelerinin azaltılması ve tau

hiperfosforilasyonunun azaltılması gibi birçok faaliyeti düzenler. Östrojenin etkisi östrojen reseptörleri (hücrel iç, transmembran, membrana bağlı ER'lar) aracılığıyla gerçekleşir. Bu reseptörlerin iki ana alt tipi ER $\alpha$  ve ER $\beta$ 'dir ve sırasıyla kromozom 6 ve 14'te kodlanmıştır. ER $\alpha$  reseptörü hipotalamusta ve amigdalada bulunurken ER $\beta$  reseptörleri hipokampusta ve kortekste bulunur. ER $\alpha$  ve ER $\beta$  genlerindeki tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), yaşlı kadınlarda ekzojen östrojen etkilerini etkileyebilir ve bilişsel yaşlanmayı etkileyebilir. Örneğin, ER $\alpha$ 'da bulunan PvuII (rs9340799) ve XbaI (rs223493) SNP'leri Alzheimer hastalığı ve bilişsel bozukluklarla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca ER $\beta$ 'deki birçok SNP'nin kadınlarda Alzheimer riskini artırdığı bilinmektedir (101,102,103).

### 2.3.10 Çevresel Faktörler

Alzheimer hastalığının gelişiminde çevresel faktörlerin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu faktörler arasında yaş, eğitim seviyesi, yaşam tarzı unsurları (sigara içme, beslenme, fiziksel aktivite düzeyi), kafa travmaları, diyabet, hipertansiyon, obezite, depresyon ve uyku düzeni bulunur. Sigara içme alışkanlığı ve fiziksel aktivitenin düşük olması bilişsel gerileme ve Alzheimer hastalığı riski ile ilişkilendirilmiştir (104,105). Ayrıca, kafa travmalarının uzun vadeli bilişsel bozukluklara ve Alzheimer hastalığı riskine neden olabileceği belirlenmiştir (106). Kardiyovasküler risk faktörleri arasında yer alan diyabet, hipertansiyon ve obezitenin de Alzheimer hastalığı riskini artırabileceği gösterilmiştir (107). Depresyon, bilişsel gerileme ve AH arasında da bir ilişki vardır (108). Uyku düzenindeki bozukluklar ve malnütrisyon Alzheimer hastalığı riskini artırabilir. Folat, B12 vitamini ve D vitamini gibi besin maddelerindeki eksiklikler, bilişsel fonksiyonlarda azalmaya neden olabilir ve Alzheimer hastalığı riskini artırabilir (109). Ayrıca, Alzheimer hastalarında yeme ve yutma ile ilgili sorunlar yaygındır, bu da malnütrisyon riskini artırabilir (110).

### 2.3.11 Metaller

Metaller, doğada ve biyolojik sistemlerde bulunup organizmaların fizyolojik işlevlerini destekleyen biyometaller (bakır, çinko, demir) ve biyolojik işleve sahip olmayan metaller (alüminyum, kurşun) olmak üzere iki ana kategoriye ayrılabilir (111). Alüminyum, işlenmiş gıdalar, kozmetik ürünler, tıbbi preparatlar ve ilaçlar birçok endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır. Vücutta alüminyum plazma transferrine ve sitrat moleküllerine bağlanır ve bu sayede beyne transfer edilebilir. Yapılan çalışmalar alüminyumun korteks, hipokampus ve serebellum bölgelerinde biriktiğini, proteinlerle etkileşime girerek Alzheimer hastalığına özgü

tau proteininin yanlış katlanmasına, agregasyonuna ve fosforilasyonuna neden olduğunu göstermiştir (112).

Kurşun, kalsiyum gibi biyometallerin bağlanma bölgeleriyle rekabet ederek kan-beyin bariyerini hızla geçebilir. Nöral diferansiyasyonu ve sinaptogenezi değiştirebilir ve ciddi hasara neden olabilirler. Yapılan çalışmalar, kurşuna akut maruziyetin Alzheimer hastalığı ile ilişkili olduğunu,  $\beta$ -sekretaz ekspresyonunu ve A $\beta$  birikimini artırdığını göstermiştir. Kadmiyum suda çözünen bir karsinojenik metal olup kan-beyin bariyerini geçebilir ve Alzheimer hastalığı gibi nörolojik hastalıklara neden olabilir. Elde edilen sonuçlar, kadmiyum iyonlarının Alzheimer hastalığı beyininde A $\beta$  plaklarının ve tau'nun kendi kendine birikimine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Metal birikimi ile ilgili veriler, bu metallerin Alzheimer gelişiminde rol oynayan risk faktörleri arasında olduğunu düşündürmektedir (113).

### **2.3.12 Enfeksiyonlar**

Merkezi sinir sistemi (MSS) üzerindeki kronik enfeksiyonlar, Alzheimer hastalığının beyindeki A $\beta$  plaklarının ve NFT birikimlerinin gelişimine katkıda bulunabilir. Bu nedenle Alzheimer hastalığının risk faktörleri arasında düşünülmektedir. Dr. Itzhaki'nin çalışmaları, herpes simpleks virüsünün (HSV-1) DNA'sının ApoE- $\epsilon$ 4 alel taşıyıcılarında bulunduğunu göstermiştir. Böylece AH geliştirme riskinin yüksek olmasını açıklar. HSV-1, beyinde replike olarak inflamatuvar yanıtın aktive olmasına ve A $\beta$  birikiminin artmasına neden olarak nöronlara zarar verebilir, böylece Alzheimer hastalığının giderek gelişmesine yol açar. Miklossy ve Balin'in çalışmaları ise kronik bakteriyel enfeksiyonların Alzheimer hastalığındaki rolünü vurgulamıştır. Örneğin sifiliz demansı, sifiliz etkeni olan spiroket bakterileri (*Treponema pallidum*) tarafından oluşturulan serebral kortekste biriken lezyonlara ve nörofibriller yumaklara benzer lezyonlara neden olmuştur. Ayrıca, *Klamidia pneumonia* bakterisi, astrosit ve sitotoksik mikrogliya aktivasyonu ile geç başlangıçlı Alzheimer hastalığına sebep olur. Kalsiyum regülasyonunu ve apoptozu bozarak bilişsel fonksiyonun kötüleşmesine ve Alzheimer hastalığı riskinin artmasına yol açabilir (114,115).

### **2.3.13 Tıbbi Faktörler**

Alzheimer hastalığının gelişimiyle ilişkilendirilen birçok risk faktörü bulunmaktadır. Ayrıca, Alzheimer hastalığına sahip yaşlı bireyler genellikle kardiyovasküler hastalık (KVH), obezite ve diyabet gibi tıbbi durumlarla da sıkça karşılaşmaktadır. Bu durumlar, Alzheimer hastalığı riskinin artmasıyla ilişkilidir (116,117).

### **2.3.14 Kardiyovasküler Hastalıklar (KVH)**

KVH'ler, nöral doku kaybına bağlı demans riskinin artmasıyla ilişkilendirilen önemli bir Alzheimer hastalığı (AH) risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Atriyal fibrilasyon, inmeye neden olan embolilerin oluşmasına yol açarak bellek ve bilişsel fonksiyonlarda azalmaya neden olabilir. Aynı zamanda kalp yetmezliği, kalbin pompalama fonksiyonunu etkileyerek vücuda yetersiz kan sağlamasına ve beyin hipoperfüzyonuna neden olur. Böylece hipoksi ve nöral hasara yol açabilir. Koroner kalp hastalığı hipotezi, ateroskleroz, periferik arter hastalığı, hipoperfüzyon ve embolilerin AH riski ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Hipertansiyon, damar duvarlarının kalınlaşması ve lümenin daralması ile ilişkili olup serebral kan akışını azaltabilir ve kronik vakalarda serebral ödeme neden olabilir. Bu nedenle KVH AH risk faktörleri olarak rol oynar. KVH düzenlenebilir bir risk faktörüdür ve AH ile ilişkisine odaklanarak hastalığı önlemek ve geciktirmek için bir yol elde edilebilir (117,118).

### **2.3.15 Obezite ve Diyabet**

Obezite, bireylerde tüketilen kalorilerin yakılan kalorilerden fazla olması nedeniyle vücutta fazla miktarda yağ birikmesini ifade eden bir terimdir ve vücut kitle indeksi (VKİ) kullanılarak hesaplanır. Vücuttaki yağ miktarının artması, beyin kan akışının azalmasıyla ilişkilidir. Bu durum beyin iskemisi, bellek kaybı ve vasküler demansı teşvik edebilir. Obezite, sağlıksız beslenme ve diğer faktörlerin etkisiyle glukoz tolerans bozukluğu (GTB) veya diyabete yol açabilir. Diyabet, periferik dokuları ve kan damarlarını etkileyen hiperglisemi ile karakterize olan bir durumdur. Kronik hiperglisemi amiloid-beta birikimini, oksidatif stresi, mitokondriyal işlev bozukluğunu ve nöroinflamasyonu artırarak bilişsel bozukluğa neden olur. Obezite, adipöz dokudan proinflamatuvar sitokin salgılanmasının artmasıyla karakterizedir. Böylece makrofajları ve lenfositleri uyarabilir ve nihayetinde lokal ve sistemik inflamasyona yol açar. Bu inflamasyon insülin direncini, hiperinsülinemi ve sonuç olarak hiperglisemiye teşvik eder. Obezite tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi hastalıkların iyi bilinen bir risk faktörüdür. Bu hastalıklar demans ve Alzheimer hastalığı için risk faktörleri olarak tanımlanmıştır. Beyin inflamasyonu mikrogliya sayısının artmasına, sinaptik plastisitenin azalmasına ve bozulmuş nörojenez yol açabilir. Mikrogliya, sinir sağlığında önemli bir rol oynayan insülin reseptör substratı 1 (IRS-1) üzerinde etkide bulunabilir ve hücre içi insülin sinyallemesini engelleyebilir. Bu nedenle insülin etkisinin değişmesi, Aβ birikimine ve Alzheimer hastalığı ile ilişkili tau proteininin parçalanmasının azalmasına yol açabilir (119,120,121).

## 2.4 Tedaviler

Şu anda dünya genelinde Alzheimer hastalığı vakalarının sayısı yaklaşık 24 milyon olarak raporlanmıştır ve 2050 yılında bunama hastalığı olan insanların sayısının 4 kat artması öngörülmektedir. AH bir halk sağlığı sorunu olmasına rağmen şu anda tedavide onaylanmış sadece iki ilaç sınıfı bulunmaktadır: kolinesteraz enzim inhibitörleri (doğal, sentetik ve hibrit analoglar) ve N-metil D-aspartat (NMDA) antagonistleri. AH'de birçok fizyolojik süreç asetilkolin üreten hücreleri tahrip ederek beyinde kolinerjik iletimi azaltır. Asetilkolinesteraz inhibitörleri (AChEI) geri dönüşlü, geri dönüşsüz ve pseudo-reversibl olarak sınıflandırılır. Bu ilaçlar asetilkolinin kolinesteraz enzimleri (AChE ve butirilkolinesteraz (BChE) tarafından parçalanmasını engelleyerek sinaptik aralıktaki asetilkolin seviyelerini artırır (122,123).

Diğer taraftan NMDAR'nin aşırı aktivasyonu artan  $Ca^{2+}$  seviyelerine yol açar. Böylece hücre ölümünü ve sinaptik işlev bozukluğunu teşvik eder. NMDAR antagonistleri NMDA glutamat reseptörünün aşırı aktivasyonunu önleyerek ve dolayısıyla  $Ca^{2+}$  akınını düzenleyerek normal aktivitesini geri getirir. Bu iki ilaç sınıfının terapötik etkisi sadece Alzheimer hastalığının semptomlarının tedavisinde etkilidir, ancak hastalığı tedavi etmez veya önlemez (124,125). Ne yazık ki, son on yılda Alzheimer hastalığı üzerine yürütülen birkaç klinik deneme başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Alzheimer hastalığı patolojisini anlamak ve başarılı tedaviler geliştirmek için anormal tau protein metabolizması,  $\beta$ -amiloid, inflamatuvar yanıt ve kolinerjik ile serbest radikal hasarı gibi çeşitli mekanizmalar önerilmiştir (126,127).

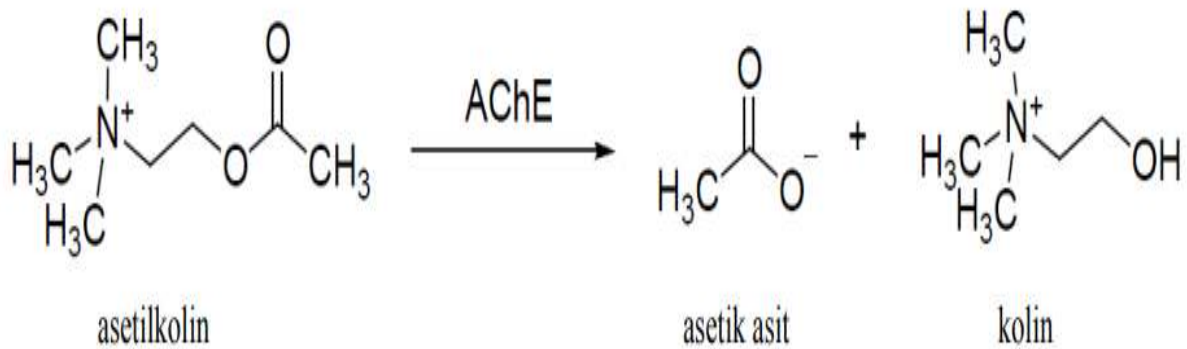
Öte yandan, kardiyovasküler veya yaşam tarzı alışkanlıkları gibi çoğu Alzheimer hastalığına neden olan değiştirilebilir risk faktörleri tıbbi müdahale olmadan önlenebilir. Ayrıca, Akdeniz diyeti (MD), entelektüel aktivite ve daha yüksek eğitim, Alzheimer hastalığının ilerlemesini ve hafıza kaybını azaltabilirken beyin kapasitesini ve bilişsel fonksiyonları artırabilir. Yapılan birçok çalışma, yaşlı bireylerde yaşam tarzının (beslenme, egzersiz ve bilişsel eğitim) Alzheimer semptomlarının tedavisi ve kardiyovasküler risk faktörlerinin kontrolü gibi çoklu alan müdahalesinin bilişsel fonksiyonları artırabileceğini veya sürdürebileceğini, ayrıca yeni Alzheimer vakalarının önüne geçebileceğini göstermiştir (128). Bu noktada Alzheimer hastalığının tedavisi için kullanılan mevcut ilaçlarla birlikte yeni tedavilere yönelik bazı teorileri özetlemekteyiz.

#### 2.4.1 AH'nın Semptomatik Tedavisi

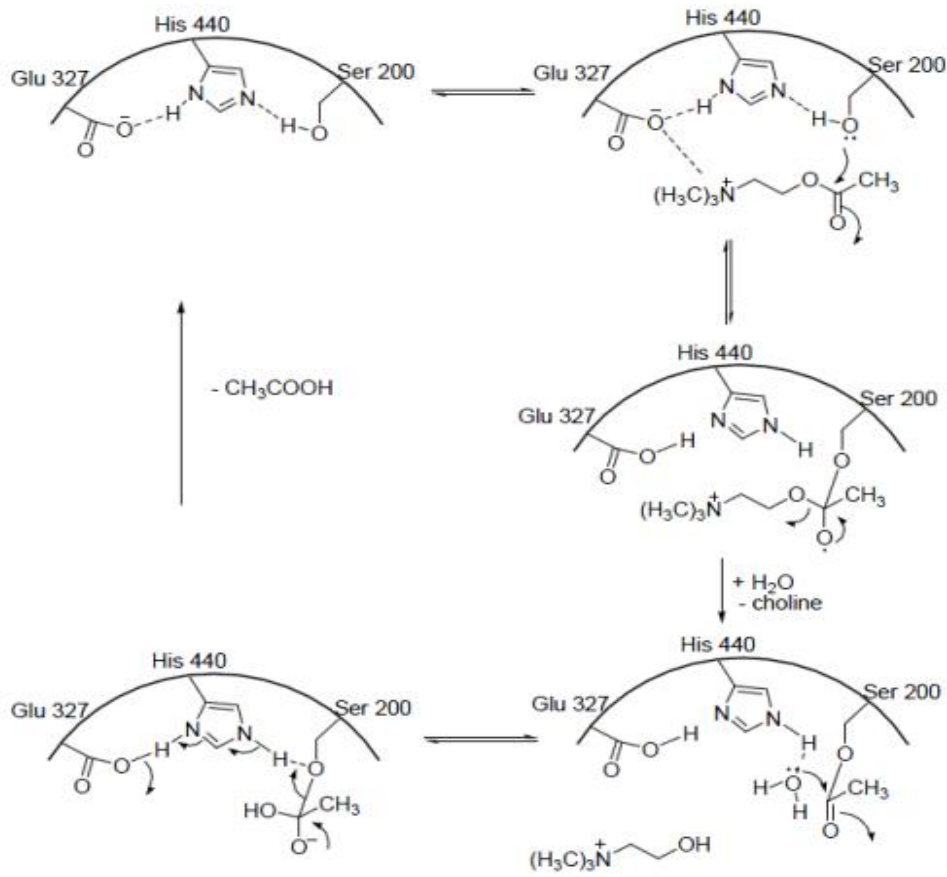
#### 3.4.2 Kolinesteraz İnhibitörleri

Kolinerjik hipoteze göre Alzheimer hastalığının nedeni asetilkolin (ACh) biyosentezindeki azalmadır. AChE'yi inhibe ederek kolinerjik seviyeleri arttırmak, bilişsel ve sinir hücresi fonksiyonunu arttıran bir tedavi stratejisi olarak kabul edilir. AChE inhibitörleri sinaptik aralıktaki asetilkolinin parçalanmasını engellemek için kullanılır. Böylece ACh'nin sürekli birikmesine ve kolinerjik reseptörlerin aktive olmasına sebep olur. Takrin (tetrahidroaminoakridin), Alzheimer hastalığı tedavisi için FDA onaylı ilk kolinesteraz inhibitör ilacı olup muskarinik nöronlardaki ACh'yi artırarak etki gösterir. Ancak yüksek yan etki insidansı olan hepatotoksisite ve yetersiz fayda gibi nedenlerle hemen piyasadan çekilmiştir, benzer durumlar birçok denemede gözlemlenmiştir. Daha sonra donepezil, rivastigmin ve galantamin gibi birçok AChEI tanımlanmış ve hala Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde kullanılmaktadır (129,130,131,132).

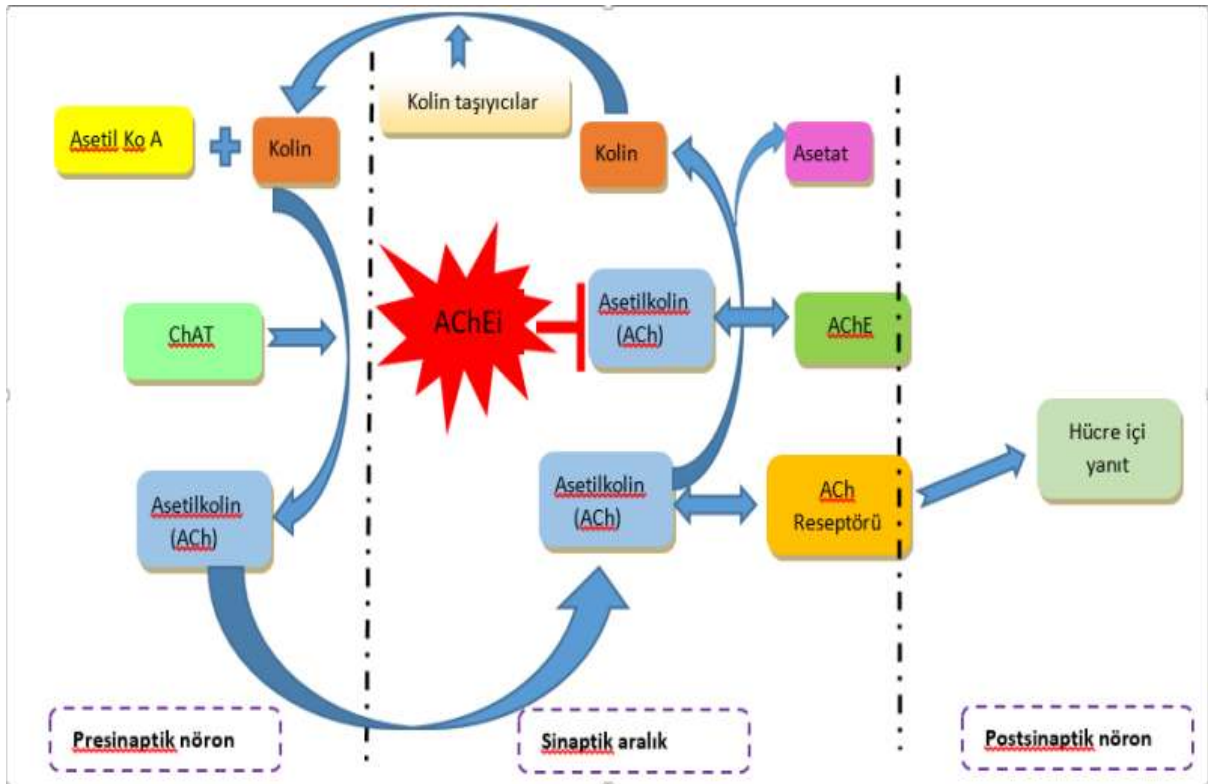
Alzheimer hastalığının tedavisine yönelik başka bir strateji presinaptik uçlarda kolinin geri alımını arttırmak ve buna bağlı olarak asetilkolin sentezini artırmaktır. Bu kolin taşıyıcısını (CHT1) hedef alarak elde edilebilir. CHT1 taşıyıcı, asetilkolin sentezi için gerekli olan kolinin temininden sorumludur. Plazma zarında CHT1'in artırılmasını sağlayabilen ilaçların geliştirilmesi gelecekte Alzheimer hastalığı tedavisi için umut vadeden bir strateji olabilir (133).



Şekil 2.6 ACh'nin AChE tarafından hidrolizi (134).



Şekil 2.7 ACh'nin AChE tarafından hidroliz mekanizması (135).



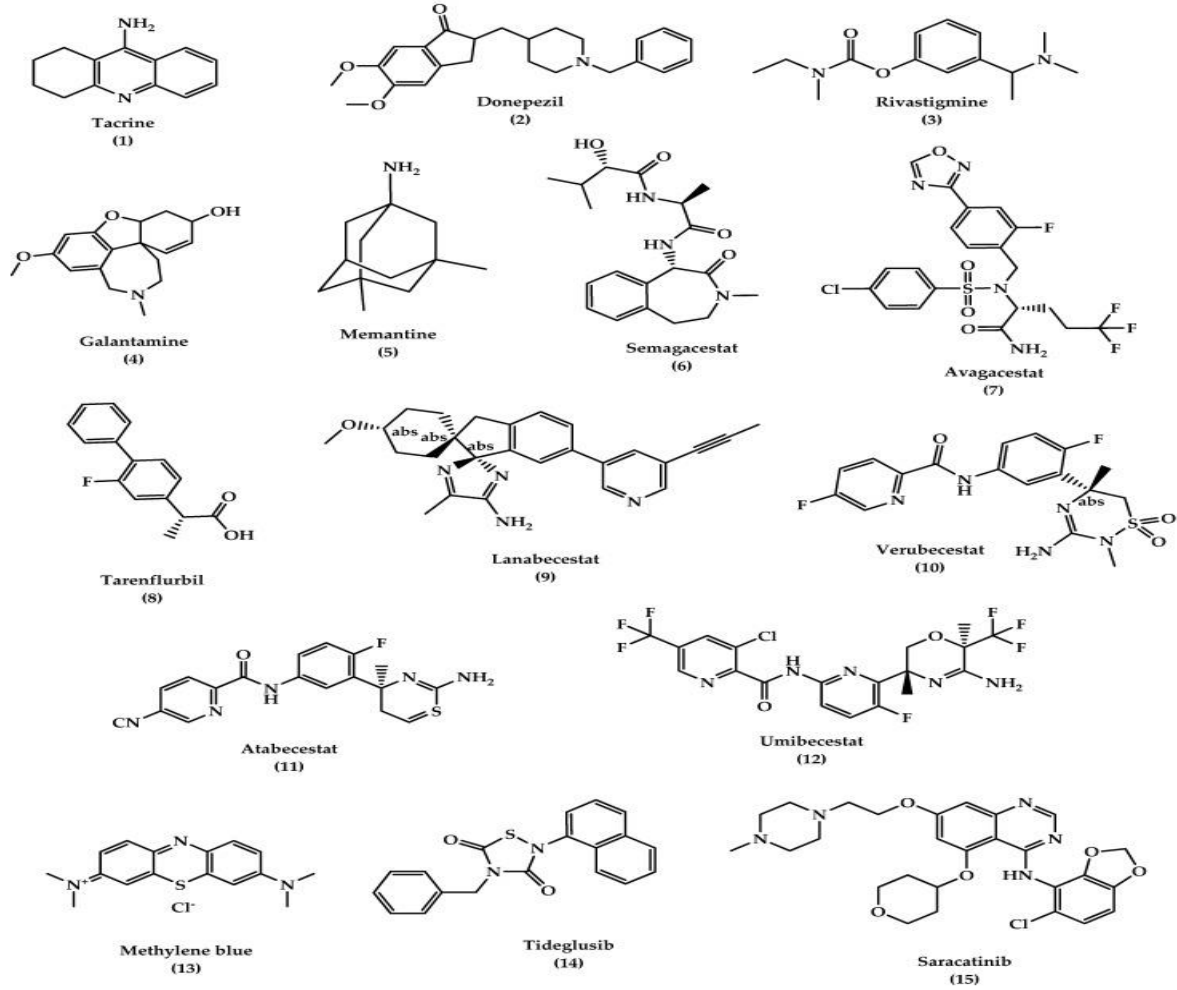
Şekil 2.8 AChE inhibitörlerinin fonksiyonları (136)

### 2.4.3 Donepezil

Donepezil, bir indanonbenzilpiperidin türevidir ve asetilkolinesteraz (AChE) enzimine geri dönüşlü olarak bağlanarak asetilkolin hidrolizini inhibe eder. Buna bağlı sinaptik aralıklarda daha yüksek asetilkolin konsantrasyonuna yol açar. İlaç hafif ve geçici kolinerjik yan etkilere sahip olup gastrointestinal ve sinir sistemleri ile ilişkilidir. Donepezil, Alzheimer hastalığının ilerleyişini değiştirmeksizin bilişsel fonksiyonları ve davranışı iyileştirmek amacıyla semptomların tedavisinde kullanılır (137,138).

### 2.4.4 Rivastigmin

Rivastigmin, asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BuChE) için bir psödo-geri dönüşümsüz inhibitördür. İki aktif bölgeye (anyonik ve esterik bölgeler) bağlanarak AChE'nin etkisini gösterir ve böylece asetilkolin metabolizmasının engellenmesine neden olur. ChE normal beyinde çoğunlukla glial hücrelerde bulunurken, AH beyininde AChE aktivitesinin sadece %10'u bulunur. ChE aktivitesi eş zamanlı olarak %40-90 oranında artarken ACh aktivitesi ise azalır. Buna bağlı orta ila şiddetli demansa işaret edebileceğini gösterir. Rivastigmin AChE'den daha yavaş bir şekilde ayrışır ve bu nedenle psödo-geri dönüşümsüz olarak adlandırılır, sinapsta AChE ve ChE tarafından metabolize olur. İlaç hafif ila orta dereceli AH vakalarında kullanılır ve bilişsel fonksiyonları ile günlük yaşam aktivitelerini iyileştirir. Oral yolla alındığında bulantı, kusma, dispepsi, asteni, iştahsızlık ve kilo kaybı gibi yan etkilere neden olur. Birçok durumda bu yan etkiler ilacın bırakılmasının ana nedeni olabilir, ancak zamanla düzeltilebilir ve daha iyi tolere edilebilir hale gelebilir. Rivastigmin, hafıza kaybı ve yutma sorunları yaşayan çoğu Alzheimer hastası için uygun bir tedavi seçeneği olabilir. Düzenli aralıklarla oral olarak uygulanabileceği gibi deri üzerinden kontrollü ve sürekli ilaç verimini sağlayan transdermal yamalar aracılığıyla da uygulanabilir. Bu yöntem tolerabiliteyi artırabilir ve bakım verenin memnuniyetini artırabilir. Ayrıca, yamalar tabletlere kıyasla daha düşük bir dozajı teslim edebilir, böylece yan etkilerin azalmasına neden olabilir (139,140,141).



**Şekil 2.9** AH'nın semptomatik tedavisinde onaylanmış ilaçların (takrin, donepezil, rivastigmin, galantamin, memantin) ve klinik denemelere giren hastalığı modifiye eden bileşiklerin (semagasestat, avagasestat, tarenflurbil, lanabecestat, verubecestat, atabecestat, umibecestat, metilen mavi, tideglusib, saracatinib) kimyasal yapıları (131,132).

#### 2.4.5 Galantamin (GAL)

Galantamin, hafif ila orta dereceli Alzheimer hastalığı vakaları için standart bir birinci basamak ilaç olarak kabul edilir. GAL, rekabetçi bir AChE inhibitörü olarak işlev görebilen ve nikotinik asetilkolin reseptörlerinin  $\alpha$ -alt birimine allosterik olarak bağlanarak onları aktive edebilen seçici bir üçüncül izokinolin alkaloididir. GAL, diğer AChE inhibitörleri gibi iyi etkinlik ve tolere edilebilirlikle davranışsal semptomları, günlük yaşam aktivitelerini ve bilişsel performansı iyileştirebilir. İlaç dağıtımını optimize etmek için çeşitli teslimat sistemleri geliştirilmiştir. Wahba ve ekibinin yaptığı bir çalışmada, Galantamin'i (GAL) etkilenen beyin bölgelerine seçici olarak taşımak için ceria içeren hidroksiapatit partiküllerine Galantamin bağlanmıştır. Misra-Fornaguera ve diğerleri, Galantamin hidrobromür taşımak için sırasıyla katı-lipit nanopartikül ve nano-emülsifikasyon yöntemlerini kullanmışlardır. Bu çalışmaların

sonuçları, ilacın güvenli bir şekilde taşınması için umut verici bir strateji sunmuştur. Hanafy ve ekibi, nazal Galantamin hidrobromür/kitosan kompleks nanopartiküller geliştirerek iyi farmakolojik etkinlik göstermiştir. Woo ve arkadaşları ise ilacın kontrollü salınım dozaj formu için bir taşıyıcı olarak yama sistemini kullanmışlardır (142,143,144).

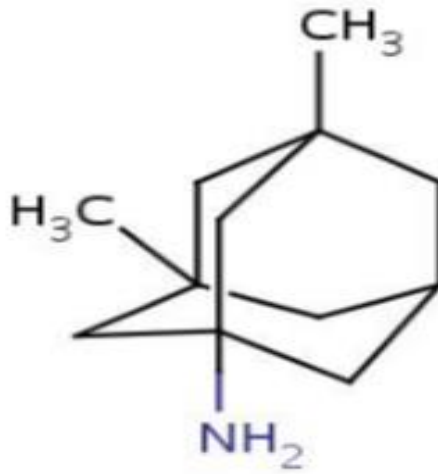
## **2.5. N-metil-D-aspartat (NMDA) Antagonistleri**

NMDAR, Alzheimer hastalığının patofizyolojisinde baskın bir rol oynamaktadır. NMDAR stimülasyonu, hücre içine kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) girişine yol açarak sinir hücrelerinde sinyal iletimini aktive eder ve uzun süreli potansiyasyon (LTP) oluşumu için kritik olan gen transkripsiyonunu tetikler. LTP, sinaptik sinir iletimi, plastisite ve bellek oluşumu için kritik bir role sahiptir. NMDAR'ların aşırı aktive olması, kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) sinyalleme düzeyinde anormal bir artışa ve merkezi sinir sistemindeki glutamat adlı primer uyarıcı amino asidin aşırı uyarılmasına yol açar. Bu durum uyarıcı toksisite, sinaptik disfonksiyon, nöronal hücre ölümü ve bilişsel fonksiyonlarda düşüşe neden olur. Birçok NMDAR rekabetçi olmayan antagonist geliştirilmiş ve klinik denemelere girmiştir. Ancak çoğu düşük etkinlik ve yan etkiler nedeniyle başarısız olmuştur. Memantin, orta ila şiddetli Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan tek onaylı ilaçtır. Ayrıca diğer NMDAR rekabetçi olmayan antagonist bileşikler de geliştirilmektedir. Örneğin, RL-208 (3,4,8,9-tetrametiltetrasilo [4.4.0.03,9.04,8]dek-1-il) metilamin hidroklorür yaşa bağlı bilişsel sorunlar ve Alzheimer hastalığı için umut vadeden bir terapötik etkiye sahip olabilir (145,146,147).

### **2.5.1 Memantin (1-amino-3,5-dimetil amantadin hidroklorid)**

Memantin (MEM), Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan bir non-kompetitif düşük afiniteli NMDA antagonistidir. Memantin, 1-amino-3,5-dimetilamantadin hidroklorid olarak da bilinir ve amantadinin bir analogudur (148). Memantin amantadin ile benzer bir yapıya sahiptir. Amantadinin bir analogu olarak memantin molekülü amantadinin yapısını temel alır, ancak 3. ve 5. karbon atomlarındaki metil grupları arasında farklılıklar gösterir. Memantin molekülü fizyolojik koşullarda  $-NH_3^+$  pozitif bir yüke sahiptir, buna bağlı molekülün su içinde çözünür bir bileşik olduğunu gösterir. Bu özellik memantinin su içinde çözünürlüğünü ve biyolojik sistemlerdeki etkileşimini etkileyebilir. Bu memantinin farmakokinetiği ve terapötik etkileri üzerinde önemli bir rol oynayabilir. İlk kez 1960'larda kan şekeri düşürme amacıyla sentezlense de memantin bu etkiyi göstermemiştir. Daha sonra 1972'de Merz şirketi memantinin çeşitli nörolojik bozuklukların tedavisinde kullanılabileceği fikrini öne sürmüştür.

Orta ve ileri evredeki Alzheimer hastalığı olan bireylerde tercih edilen memantin, Alzheimer hastalığının tedavisinde tek başına veya asetilkolinesteraz inhibitörü ile birlikte kullanılır. İlaç güvenli ve iyi tolere edilebilir olmasıyla bilinir ve sinir hücrelerindeki aşırı glutamat aktivasyonuna bağlı olarak hücre içi kalsiyum yoğunluğunu azaltarak fonksiyon bozukluğuna engel olma amacıyla tercih edilir (149). Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar memantin hafıza ve sinaptik plastisitede meydana gelen değişiklikleri geri çevirebileceğini göstermiştir (150). Son 15 yılda Alzheimer ve vasküler demans gibi hastalıkları içeren çeşitli faz II-III klinik çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda, memantin 2003 yılında Alzheimer hastalığının tedavisinde FDA onayını almıştır (151).



**Şekil 1. Memantin yapısı ve şekli**

Memantin yapısal formülü:  $C_{12}H_{21}N$

Moleküler ağırlığı: 179,30

**Şekil 2.10 Memantin yapısı ve şekli (148)**

Hücre dışında kalsiyum iyonu miktarı (1.2 mM), hücre içindeki miktarla (80-100 nM) karşılaştırıldığında 10.000-20.000 kat daha yüksek bir oranda bulunmaktadır. Memantin, düşük afinitesi sayesinde normal sinaptik iletimi engellemeden uyarıcı reseptörü bloke eder. Yüksek glutamat konsantrasyonları NMDAR'dan memantini hızla çıkarabilir. Bu nedenle uzun süreli bir blokajdan kaçınmasına olanak tanır. Sorunlu bölgede meydana gelen asidite oksidatif stres veya diğer nedenlerle aktif hale gelen kalsiyum kanalları, bu dengeyi bozarak hücre içi kalsiyum yoğunluğunu artırır. Artan kalsiyum iyonu yoğunluğu başta mitokondride ve sitozolde olmak üzere bir dizi hücrel reaksiyon zincirini başlatarak hücre ölümüne yol açabilir (152). Merkezi sinir sisteminde hızlı uyarıcı transmitterler olarak glutamat, aspartat ve

homosisteat bulunmaktadır. Ancak, beyindeki uyarıcı iletimin büyük bir kısmından sorumlu olan glutamat, kendine özgü dört uyarıcı reseptör tipi olan NMDA, AMPA, kainik asit reseptörleri ve metabotropik reseptörlerle etkileşimde bulunarak %75'lik bir etki gösterir (153). NMDA reseptörleri beyin korteksi, hipokampus, striatum, septum ve amigdala gibi kognitif işlevle ilgili bölgelerde post-sinaptik kısımlarda bulunmaktadır. Yukarıda bahsedilen reaksiyonların ve hücre apoptozisinin önlenmesi  $Ca^{+2}$  girişine aracılık eden NMDA reseptörlerinin memantin tarafından bloke edilmesi ile gerçekleşmesi ayrı bir öneme sahiptir (154,153).

Öğrenme ve belleğin gelişiminde, hücre içi  $Ca^{+2}$  düzeyindeki anlık değişimlerin ve nöronal sinaptik bağlantıların çok etkin bir rol oynadığı kabul edilmektedir (155,156). Glutamat, hücreler arası iletişimi sağlayan önemli bir fizyolojik mediatör olmasının yanı sıra, bazı nörodejeneratif hastalıklarda glutamat reseptörlerinin aşırı ve zamansız uyarılması sonucu ortaya çıkan "eksitotoksisite" durumu nedeniyle nöron ölümüne yol açabilir (157). Eksitotoksitenin birçok akut ve kronik merkezi sinir sistemi nörodejeneratif bozukluğunda rol oynadığı ve aşırı  $Ca^{+2}$  yükü ile ilişkilendirildiği ileri sürülmüştür (158). Eksitotoksisite, birçok nörodejeneratif hastalıkta hücrelerin apoptozise uğramasını açıklayan en yaygın kabul gören hipotezdir. Memantin, AH tedavisinde tercih edilen NMDA reseptör antagonisti bir ilaç olmakla birlikte orta ve ileri derecedeki Alzheimer tipi demansın semptomatik tedavisi için endikedir ve herhangi büyük bir yan etkisi saptanmamıştır (159,160).

Memantin, NMDA reseptörünün düşük afiniteli bir rekabetçi olmayan antagonisti olarak işlev gösterir ve Alzheimer hastalığı vakalarında nörotoksositeye yol açabilen glutaminerjik sistemdeki aşırı aktivasyonu önler. Oral olarak alındığında, memantin yaklaşık olarak alınan miktarın %80'i değişmeden dolaşır. Başlıca metabolitleri arasında N-3,5-dimetil-gludantan 4- ve 6-hidroksi memantin'in karma izomeri ve 1-nitrozo-3,5-dimetil-adamantan bulunur. Bu metabolitler reseptörlere karşı antagonistik özellik göstermez. In vitro çalışmalarda, sitokrom P450 sistemi tarafından katalizlenen herhangi bir reaksiyon saptanmamıştır. Memantin'in eliminasyon yarı ömrü 60-100 saattir.

Memantin %75-90 oranında değişmeden renal yolla atılır ve böbrek tübüler sekresyonu ve kationik transport proteinleri yoluyla reabsorbsiyonu içerir (161). Ana metabolitleri idrarla atılan memantin-N-gludantan konjugatı 4 ve 6-hidroksi memantin ve 1-nitrozodeamine memantindir. Memantin alınan dozun yaklaşık %10-25'i safra ve dışkı yoluyla atılır. Böbrek yetmezliği, epileptik nöbet öyküsü, yakın zamanda geçirilmiş miyokard enfarktüsü, konjestif

kalp yetmezliği veya kontrol altına alınamayan hipertansiyon gibi durumlarda dikkatli bir şekilde kullanılmalı ve memantin dozu ayarlanmalıdır (Tablo 2.4).

**Tablo 2.4** Memantin farmakokinetik özellikleri (161).

|                                                     |                |
|-----------------------------------------------------|----------------|
| <b>Maksimum doz (mg/gün)</b>                        | <b>20</b>      |
| <b>Günde kaç kez alındığı</b>                       | <b>1</b>       |
| <b>İnitial doz (mg)</b>                             | <b>10</b>      |
| <b>t<sub>max</sub> (saat)</b>                       | <b>3-8</b>     |
| <b>Plazma proteinine bağlanma(%)</b>                | <b>45</b>      |
| <b>Eliminasyon yarı ömrü t<sub>1/2</sub> (saat)</b> | <b>60-80</b>   |
| <b>CYP450 sistemi ile etkileşim</b>                 | <b>yok</b>     |
| <b>Besinler ile etkileşim</b>                       | <b>yok</b>     |
| <b>İlaç-ilaç etkileşimi</b>                         | <b>yok</b>     |
| <b>Metabolitler</b>                                 | <b>inaktif</b> |
| <b>Biyoyararlanım (%)</b>                           | <b>100</b>     |
| <b>Kan beyin bariyerini geçişi</b>                  | <b>var</b>     |

Memantin, MK-801 gibi diğer kompetitif antagonistlara göre daha düşük reseptör afinitesine sahip olduğu için daha iyi tolere edilebilir (148). Memantin, NMDA antagonistleriyle yapılan klinik çalışmalarda ortaya çıkan halusinasyon, ajitasyon, katatoni, hipertansiyon ve anestezi gibi yan etkilerin başarısızlık nedeni olduğunu göstermiştir. Her hastada görülme de memantin yan etkileri konstipasyon, konfüzyon, baş ağrısı, senkop, ataksi, ciltte döküntü, vertigo, anemi, kusma ve yorgunluk gibi etkileri içerebilir (148).

Memantin, NMDA reseptörlerinin fizyolojik fonksiyonlarını değiştirmeden reseptörün patolojik aktivasyonunu engelleyerek kognitif fonksiyonları iyileştirir. Ayrıca memantin

antioksidan etkisi sayesinde BDNF (Beyinden Türetilmiş Nörotropik Faktör) üretimini artırır. Kalsiyum bağımlı oksidatif stres ile ilişkili hücre eksitotoksitesini engelleyerek antioksidan etki gösterir (148). Terapötik konsantrasyonlarda memantin, öğrenme bozulması ve psikometrik benzeri davranışsal sendromlar gibi durumları oluşturmada nöroprotektif etki gösterdiğini gösteren prelinik çalışmalar mevcuttur (162). Memantin, ilaç kanalı açıldıktan sonra akımı bloke etme özelliğinden dolayı "açık kanal engelleyicisi" olarak adlandırılır. Memantin ve  $Mg^{+2}$  aynı bağlama bölgesini paylaştıkları ileri sürülmüş ve memantin blokajıyla  $Mg^{+2}$  azalır (163). Memantin kanalı bloke ettikten sonra kanal kapanır ve agonistler bağlanamaz, böylece memantin "tuzak" mekanizmasıyla kanal içinde kalır. Buna "tuzak kanal blokerleri" denir (164).

Son zamanlarda yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar memantin kinolinik asite bağlı toksisiteye, beyin travması, iskemi ve  $A\beta 1-40/A\beta 1-42$  aracılı nörotoksisiteye karşı etkili bir koruma sağlayabildiğini bildirmektedir (165,166). Daha önce yapılan çalışmalarda rapor edilen sonuçlara göre sıçan kortikal kültür nöronlarında memantin tau proteinlerinin fosforilasyonu ve  $A\beta 1-42$  aracılı tau kinazların (GSK-3 $\beta$  and ERK-1/2) aktivasyonunun zayıflamasıyla şekillenen toksisiteye karşı da koruyucu etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (167). Tüm bunlara ek olarak memantin  $A\beta$  ile indüklenen kaspaz 3 bölünmesini ve siklik AMP yanıt elementi bağlayıcı proteinin defosforilasyonunu da azaltır. Böylece her ikisinin de hücrenin hayatta kalması için kritik bir öneme sahip olduğu bildirilmiştir (167). Bununla birlikte memantin  $A\beta$  peptidinin oluşumunu veya içselleşmesini değiştirmede ve  $A\beta$ 'nın neden olduğu hücre dışı glutamat potansiyelini hafifletmediği bildirilmiştir (167). Toksisite üzerine olan etkilerinin yanı sıra memantin in vivo olarak  $A\beta$ 'nın fare hipokampal kesitlerinden elde edilen kültürlerde ve yetişkin sıçan hipokampusunun CA1 bölgesinde indüklediği uzun süreli potansiyel artış bozukluklarını geri döndürebilir (168,169).

Bu sonuçlar ile tutarlı olarak  $A\beta$  peptidlerini aşırı ifade eden transgenik farelerde memantin kognitif bozukluklar ve Alzheimer hastalığına bağlı patoloji üzerine faydalı etkileri gösteren birkaç çalışma mevcuttur (170,165). Memantin TG2576 transgenik fare hipokampuslarında  $A\beta$  plak yığınlarını azalttığı ve sinaptik yoğunluğu artırdığına dair bildirimler bulunmaktadır (170). Memantin, insan ve fare nöron hücrelerinde etki gösterir. Memantin tedavisi alan yaşlı farelerde hafıza ve öğrenmeyi artırdığı gösteren çalışmalar mevcuttur. Çalışmalar memantin yaşlı farelerde sinaptik plastisiteyi artırdığını ve RAM Morris su labirenti gibi kognitif fonksiyonların değerlendirildiği modellerde öğrenme ölçütlerini artırdığını göstermiştir.

Memantinin öğrenme ve hafıza üzerindeki olumlu etkilerini gösteren çalışmaların yanı sıra nöroprotektif bir ajan olduğunu ve ağrı düzeyine olumlu etkileri olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (170,172,173). Memantin, antiparkinsoniyel ve antiepileptik olarak kullanıldığı gibi Alzheimer hastalarında da kullanılmaktadır (174,175). Memantinin NMDA reseptör antagonisti olması nedeniyle kronik ağrı tedavisinde kullanımıyla ilgili araştırmalar da bulunmaktadır (173). Ratlarda yapılan çalışmalar memantinin diyabetik nöropati ağrısını azalttığını göstermiştir. Parkinson ve Huntington gibi diğer nörodejeneratif hastalıkların yanı sıra glokom, multipl skleroz, epilepsi ve nöropatik ağrı gibi aşırı reseptör aktivasyonu ile ilişkili diğer hastalıkların tedavisinde de umut vaat ettiği bildirilmektedir (162,174). Demansta kognitif ve fonksiyonel performans geliştiren ajanların genellikle davranışta da etkileri vardır. Örneğin davranışsal anomalilerde azalma,  $\alpha$ -tokoferol artışı selejilin ve kolinesteraz inhibitörlerinin klinik çalışmalarında gösterilmiştir. Memantinin potansiyel davranışsal etkileri ayrıntılı olarak çalışılmamıştır.

## **2.6 Umut Veren Gelecek Tedaviler**

### **2.6.1 Hastalığı Modifiye Edici Terapötikler (DMT)**

Hastalığı modifiye edici tedavi veya terapi (DMT), Alzheimer hastalığının ilerlemesini değiştiren patofizyolojik mekanizmalar üzerinde çalışır. Bu tedaviler depresyon, hezeyan gibi semptomları azaltma ve bilişsel fonksiyonları iyileştirme amacını taşır, ancak hastalığı etkileme veya değiştirme yeteneğine sahip değildir. DMT'ler, immünoterapiler veya küçük moleküller şeklinde uygulanabilir ve Alzheimer'ı önlemek veya ilerlemesini azaltmak için geliştirilmektedir. Sentetik A $\beta$  peptidleri (AN-1792, insan A $\beta$ 1–42 peptidi ile immün adjuvan QS-21'in birleşimi) gibi birçok DMT, klinik denemelere girmiş, ancak meningoensefalit yan etkisi nedeniyle faz II klinik denemelerinde durdurulmuştur. Anti-A $\beta$  antikorları (solanezumab, bapineuzumab),  $\gamma$ -Sekretaz inhibitörleri (semagasestat, avagasestat, tarenflurabil) ve  $\beta$ -sekretaz inhibitörleri (BACE) (lanabecestat, verubecestat, atabecestat) gibi diğer ilaçlar da geliştirilmiş, ancak klinik denemelerde başarısız olmuştur (Tablo 2.5).

DMT'lerin başarısızlığı, tedavinin geç başlaması, yanlış ana hedefe yönelik tedavi, uygun olmayan ilaç dozları ve Alzheimer hastalığının patofizyolojisinin yanlış anlaşılması gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Yıllar içinde birkaç immünoterapi geliştirilmiştir. Bu tedaviler arasında hala klinik denemelerde olan CAD106, hayvan modellerinde A $\beta$  antikorlarını indükleyen bir aktif A $\beta$  immünoterapisidir. CAD106, çoklu A $\beta$ 1–6 peptidini Q $\beta$  kaplama proteini virüs benzeri bir parçacık ile birleştirir. CNP520 (umibecestat), beta-sekretaz-1 (BACE-1) inhibitörü olan küçük

bir moleküldür ve bu nedenle A $\beta$  üretimini inhibe eder. CNP520'nin sıçanlar, köpekler ve 60 yaş üstü sağlıklı yetişkinlerde A $\beta$  plak birikimini beyin ve beyin omurilik sıvısı (BOS) içindeki A $\beta$  seviyelerini azalttığı bulunmuştur ve hala klinik denemelerde bulunmaktadır. Ayrıca aducanumab, gantenerumab ve crenezumab agregat A $\beta$ 'ye yüksek afiniteli bağlanan insan A $\beta$  monoklonal antikorlarıdır ve diğer DMT'lerle birlikte klinik aşamalarda incelenmektedir (176,177,178).

**Tablo 2.5** Klinik denemelerde Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan hastalık değiştirici ajanlar (176).

| Sıra No.                | Hastalık Değiştirici Ajanlar  | Etki Mekanizması                                                                                                                                                                   |
|-------------------------|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Faz 3 Klinik Denemeleri |                               |                                                                                                                                                                                    |
| 1                       | Aducanumab                    | İnsan A $\beta$ 'ye yüksek afiniteli bağlanan bir monoklonal antikordur. $\beta$ -amiloidi hedef alarak vücuttan uzaklaştırmayı amaçlar. Hala klinik denemelerde kullanılmaktadır. |
| 2                       | Gantenerumab                  | İnsan A $\beta$ 'ye yüksek afiniteli bağlanan bir monoklonal antikordur. $\beta$ -amiloidi hedef alarak vücuttan uzaklaştırmayı amaçlar. Hala klinik denemelerde kullanılmaktadır. |
| 3                       | CAD106b                       | Amyloid aşısı, $\beta$ -amiloid proteini karşı üretilen antikorları uyaran bir aşıdır.                                                                                             |
| 4                       | BAN2401                       | Monoklonal antikor, $\beta$ -amiloidin protofibriller formunu azaltma yeteneğine sahiptir.                                                                                         |
| 5                       | TRx0237 (LMTX)                | Tau proteininin anormal birikimini azaltmayı veya engellemeyi amaçlayan bir inhibitördür.                                                                                          |
| 6                       | AGB101                        | Düşük doz levetirasetam, sinaptik işlevi iyileştirir ve amiloid tarafından indüklenen nöronal aşırı aktiviteyi azaltır.                                                            |
| 7                       | ALZT-OP1 (cromolyn+ibuprofen) | Mast hücre stabilizatörü ve anti-inflamatuar özelliklere sahiptir. Amiloidin mikrogial temizliğini teşvik eder.                                                                    |
| 8                       | Azeliragon                    | RAGE (İleri Glikasyon Son Ürünleri için Reseptör) antagonisti olarak çalışır. İltihaplanmayı ve amiloidini beyne taşınmasını azaltır.                                              |

|                        |                       |                                                                                                                                                                                                                                                                |
|------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 9                      | BHV4157 (Troriluzole) | Glutamat düzenleyici olarak çalışır ve glutamatın sinaptik seviyelerini azaltırken sinaptik işlevi iyileştirir.                                                                                                                                                |
| 10                     | Masitinib             | Tirozin kinaz inhibitörü olarak etki eder ve enflamatuvar mast hücrelerini düzenler, amyloid protein ve tau fosforilasyonunu azaltır.                                                                                                                          |
| 11                     | Solanezumab           | A $\beta$ 'ye karşı geliştirilen bir anti-A $\beta$ antikorudur. Faz III klinik denemelerinde başarısız olmuştur.                                                                                                                                              |
| 12                     | Bapineuzumab          | A $\beta$ 'ye karşı geliştirilen bir anti-A $\beta$ antikorudur. Faz III klinik denemelerinde başarısız olmuştur.                                                                                                                                              |
| 13                     | Semagacestat          | $\gamma$ -Sekretaz inhibitörüdür. Faz III klinik denemelerinde başarısız olmuştur.                                                                                                                                                                             |
| 14                     | Avagacestat           | $\gamma$ -Sekretaz inhibitörüdür. Faz III klinik denemelerinde başarısız olmuştur.                                                                                                                                                                             |
| 15                     | Lanabecestat          | $\beta$ -Sekretaz inhibitörüdür. Faz III klinik denemelerinde başarısız olmuştur.                                                                                                                                                                              |
| 16                     | Tarenflurbil          | $\gamma$ -Sekretaz modülatörüdür. Faz III klinik denemelerinde başarısız olmuştur.                                                                                                                                                                             |
| 17                     | Verubecestat          | $\beta$ -Sekretaz inhibitörüdür. Faz III klinik denemelerinde başarısız olmuştur.                                                                                                                                                                              |
| 18                     | Atabecestat           | $\beta$ -Sekretaz inhibitörüdür. Faz III klinik denemelerinde başarısız olmuştur.                                                                                                                                                                              |
| 19                     | CNP520 (Umibecestat)  | Beta-sekretaz-1 (BACE-1) inhibitörüdür ve A $\beta$ üretimini engeller. Farelerde, köpeklerde ve 60 yaşından büyük sağlıklı yetişkinlerde A $\beta$ plak birikimini ve A $\beta$ seviyelerini azalttığı görülmüştür. Hala klinik denemelerde kullanılmaktadır. |
| 20                     | CAD106                | A $\beta$ 1–6 peptidinin Q $\beta$ kaplı proteinle bağlandığı aktif bir A $\beta$ immün terapisi. Hala klinik denemelerde kullanılmaktadır.                                                                                                                    |
| Faz 2 klinik deneyleri |                       |                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 1                      | Crenezumab            | Bir monoklonal antikorü olup, çözünür oligomerlere yönelik hedef alır ve $\beta$ -amiloit birikimini azaltır. A $\beta$ 'ye karşı yüksek afiniteli ve hala klinik denemelerde kullanılmaktadır.                                                                |

|    |                         |                                                                                                                                                                                                       |
|----|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2  | ABBV-8E12               | Tau yayılımını önleyen bir monoklonal antikordur.                                                                                                                                                     |
| 3  | ABvac40                 | $\beta$ -amiloidi hedefleyen ve onu uzaklaştıran bir aktif immün tedavidir.                                                                                                                           |
| 4  | BAN2401                 | Amiloid protofibrillerini uzaklaştıran ve amiloid plaklarını azaltan bir monoklonal antikorudur.                                                                                                      |
| 5  | BIIB092                 | Tau proteini uzaklaştıran ve tau yayılımını azaltan bir monoklonal antikorudur.                                                                                                                       |
| 6  | LY3002813 (donanemab)   | Monoklonal antikor- A $\beta$ 'nin agregat pirglutamat formunu tanıyarak amyloidleri uzaklaştırır.                                                                                                    |
| 7  | LY3303560 (zagotenemab) | Monoklonal antikor- Çözünür tau agregatlarını nötralize eder.                                                                                                                                         |
| 8  | Semorinemab (RO7105705) | Monoklonal antikor- Ekstraselüler tau'yu uzaklaştırır.                                                                                                                                                |
| 9  | APH-1105                | Alfa-sekretaz modölatörü- Amyloid'i azaltır.                                                                                                                                                          |
| 10 | Daratumumab             | Monoklonal antikor- CD38'e hedeflenerek immünomodölatör etki gösterir ve mikroglial aktiviteyi düzenler.                                                                                              |
| 11 | Dasatinib + Quercetin   | Tirozin kinaz inhibitörü (dasatinib) + flavonoid (Quercetin)- Senesans hücreleri ve tau agregasyonunu azaltır.                                                                                        |
| 12 | IONIS MAPTRx (BIIB080)  | Epigenetik, Tau Antisense oligonükleotid- Tau üretimini azaltır.                                                                                                                                      |
| 13 | Lityum                  | Nörotransmitter reseptörlerinin iyon kanalı modölatörü- Nöropsikiyatrik belirtileri iyileştirir.                                                                                                      |
| 14 | Nilotinib               | -Tirozin kinaz inhibitörü- Amyloid ve tau proteinlerinin temizlenmesini destekler                                                                                                                     |
| 15 | Posiphen                | APP'nin seçici inhibitörü- Amyloid, tau ve $\alpha$ -sinüklein üretimini azaltır.                                                                                                                     |
| 16 | PTI-125                 | Filamin A protein inhibitörü- Tau hiperfosforilasyonunu azaltır, sinaptik işlev bozukluğunu düzeltir. Çözünür amyloid ve $\alpha$ 7 nikotinik asetilkolin reseptörü etkileşimini stabil hale getirir. |
| 17 | PQ912                   | Glutaminil siklaz (QC) enzim inhibitörü- Amyloid plaklarını ve piroglutamat A $\beta$ üretimini azaltır.                                                                                              |
| 18 | Riluzol                 | Glutamat reseptörü antagonist- Glutamat aracılıksız eksitotoksisiteyi azaltır.                                                                                                                        |

|    |                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 19 | Thiethylperazine        | (TEP)- ABCC1 (ATP bağlayan kaset alt ailesi C üyesi 1 taşıma proteini) aktive eder- Amyloidi uzaklaştırır.                                                                                                                                                                                  |
| 20 | AN-1792                 | İmmün terapi olarak kullanılan sentetik bir A $\beta$ peptidi (42 amino asitli insan A $\beta$ 1–42 peptidi) ve QS-21 adlı immün adjuvan içeren ilk aktif immün tedavidir. Faz II klinik denemelere girmiş, ancak hastaların %6'sında meningoensefalit yan etkisi nedeniyle durdurulmuştur. |
|    | Faz 1 Klinik Çalışmalar |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 1  | BIIB076                 | Monoklonal antikor- Tau'yu uzaklaştırır ve tau yayılmasını azaltır                                                                                                                                                                                                                          |
| 2  | Lu AF87908              | Monoklonal antikor- Tau'yu uzaklaştırır                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 3  | Anle138b                | Agregasyon inhibitörü- tau agregasyonunu azaltır                                                                                                                                                                                                                                            |
| 4  | RO7126209               | Monoklonal antikor- amiloidi uzaklaştırır                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 5  | TPI-287                 | Tubulin bağlayıcıyı stabilize eder, mikrotübülü azaltır ve tau tarafından neden olan hücresel hasarı azaltır                                                                                                                                                                                |

Diğer bir sınıf olan  $\alpha$ -sekretaz enzimini hedef alan ajanlar, potansiyel terapötik ajanlar olarak düşünülmekte ve APP'nin parçalanmasını uyararak etki göstermektedir. Aktivasyon yoluna dair sınırlı bilgi olmasına rağmen araştırmalar, bu sürecin fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K) /Akt yolu veya  $\gamma$ -aminobutirik asit (GABA) reseptör sinyali tarafından teşvik edildiğini varsaymaktadır. Bu yollar Alzheimer hastalığı için potansiyel terapötik ajanlar sunabilir (176).

Anti-amiloid ajanlara ek olarak, tau agregasyonunu inhibe eden tau agregasyon inhibitörleri diğer umut vadeden DMT'ler arasında yer almaktadır. Tau, Alzheimer hastalığında nörofibriler demetlerin bir biyobelirteci olarak rol oynar ve doğal olarak mikrotübül stabilitesini, sinyal yollarını ve aksonal taşımayı düzenler. Tau konformasyonundaki değişiklik toksik bir agregasyona yol açabilir. Bu nedenle tau agregasyonunu önlemek, Alzheimer hastalığının ilerlemesini azaltmak için potansiyel bir ilaç geliştirme stratejisi olarak ilgi çekicidir. Farelerde yapılan çalışmalar, tau oligomerlerinin mitokondriyal hasara, nöronal sinyal iletiminin bozulmasına, sinaptik kayba ve bellek bozukluğuna neden olduğunu göstermiştir. Metilen mavisi boyası, tau agregasyonunu inhibe edebilir ve hafif ila orta derecede Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılmak üzere 2. faz klinik çalışmalara girmiştir. Ancak, ilacın uygulanmasından sonra idrarın maviye dönmesi, bağlanmanın gerçekleşmediğini gösterir ve

bu nedenle çalışma eleştirilere maruz kalmıştır. Diğer yaklaşımlar, belirli kinazların inhibisyonunun tau hiperfosforilasyonunu engelleyebileceğini ve tau birikimini önleyebileceğini öne sürmektedir. Bu bileşiklerden bazıları arasında tideglusib veya NP-031112 (NP-12) olarak bilinen bir tiyazolidindiyon türevi bileşik, lityum, pirazolopiridinler, pirazolopirazinler, sodyum valproat ve diğerleri bulunmaktadır (179). Sarakatinib (AZD0530), başka bir protein kinaz inhibitörü olarak, tirozin kinaz inhibisyonu yaparak transgenik farelerde belleği iyileştirmede olumlu sonuçlar göstermiş ve hâlâ 2. faz çalışmalarda kullanılmaktadır (180, 181,182).

Davidowitz ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, tauopati fare modeli üzerinde tau birikimini önlemedeki etkinliğini incelemek için kullanılan optimize edilmiş bir baş lider bileşiğin başarısını araştırmışlar. Çalışmanın sonuçları, optimize edilmiş lider bileşiği kullanmanın tau seviyelerinde ve fosforile olmuş formda önemli bir azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Böylece bileşiğin tüm tau agregasyon yollarını inhibe etme yeteneğini göstermiştir (183).

### **2.6.2 Şaperonlar**

Proteinlerin mutasyonlar veya çevresel faktörler nedeniyle yanlış katlanması, toksik agregatların oluşmasına ve bu birikimin Alzheimer gibi nörodejeneratif bozukluklara yol açmasına sebep olmaktadır. Doğal olarak hücreler protein kalite kontrol (PQC) sistemleri geliştirir ve buna bağlı proteinlerin toksik etkilerini göstermeden önce yanlış katlanmalarını engellerler. Ancak yaşlanma süreciyle birlikte bu denge değişir ve yanlış katlanmış proteinler PQC sisteminin üzerinde ağır basar. Bu durum, katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak adlandırılan bir yanıtı tetikler. UPR, protein sentezini durdurur ve şaperon üretimini artırır. Genel olarak insan hücrelerinde diğer proteinlerin fonksiyonlarını yerine getirmelerine ve hücre içindeki hedeflerine ulaşmalarına yardımcı olan proteinler bulunur. Bu proteinlere "şaperonlar" denir. Şaperonlar, protein katlanması ve PQC sisteminin etkinliğinin artırılmasında önemli bir rol oynar. Bu nedenle, şaperonlar nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için umut vadeden bir aday olarak değerlendirilirler. Şaperonlar genellikle üç ana grupta sınıflandırılabilir. Moleküler şaperonlar: Diğer proteinlerin katlanma veya açılma süreçlerine yardımcı olan proteinlerdir. Örneğin, nörokoruyucu ajanlar olarak görev yapan ısı şoku proteinleri (Hsp'ler) bu gruba örnektir. Farmakolojik şaperonlar: Proteinlerin yeniden katlanmasını, yapılarının stabilize edilmesini ve işlevlerinin geri kazanılmasını sağlayan düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. Bu bileşikler, seçici bağlayıcı moleküller içerebilir, örneğin enzimler veya reseptör-ligand kompleksleri. Kimyasal şaperonlar: İki alt grupta incelenir. Birincisi osmolitlerdir, ikincisi ise

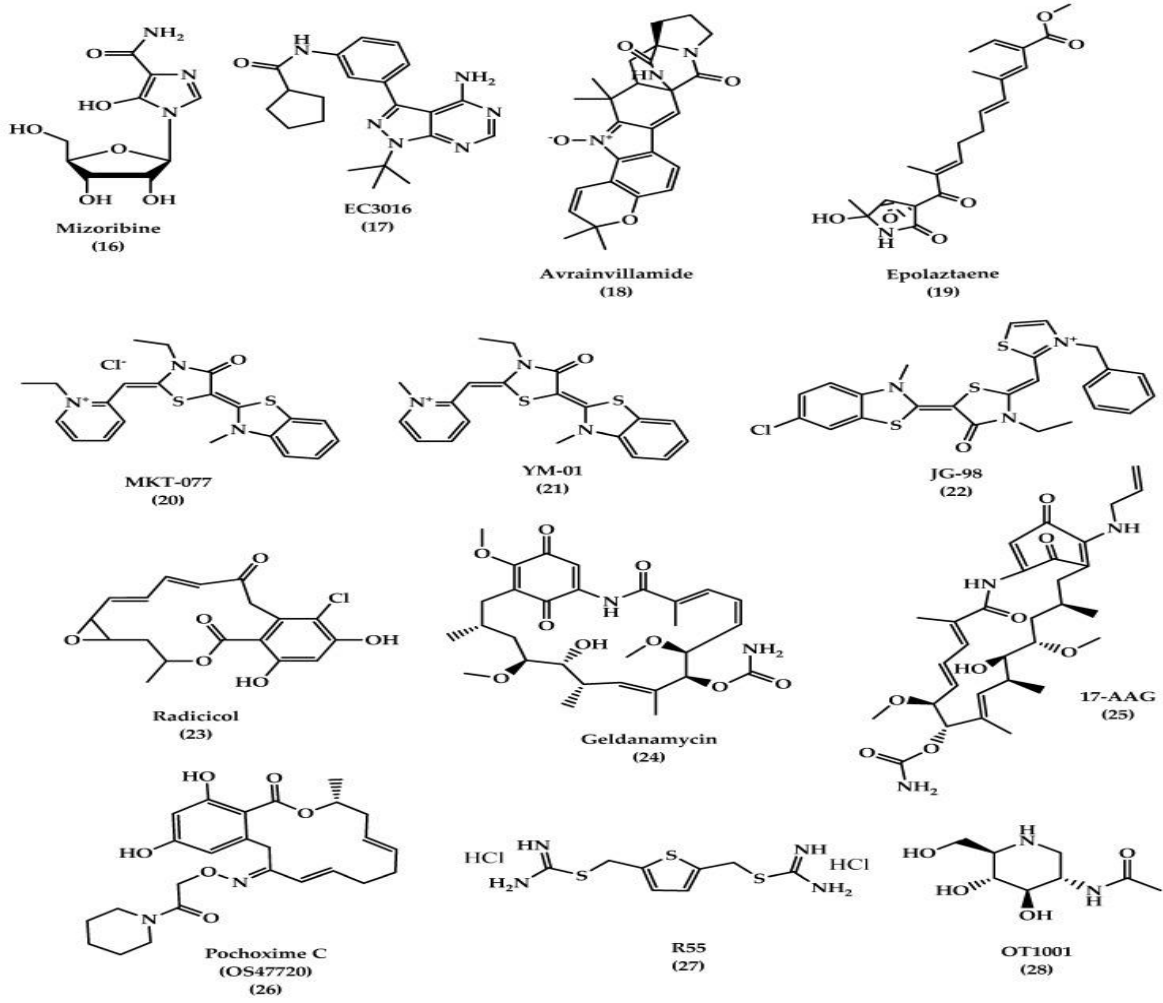
hidrofobik bileşiklerdir. Bu iki gruptaki üyelerin spesifik bir etki mekanizması genellikle yoktur ve terapötik etkilerini göstermek için yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç duyarlar.

### 2.6.3 Isı Şoku Proteinleri (Hsp'ler)

Çoğu nörodejeneratif hastalığın temel nedeni, proteinlerin yanlış katlanması ve agregasyonu sonucu hücre ölümüne yol açabilir. Moleküler şaperonlar hücre içinde bulunabilir. Bu kapsamda ısı şoku proteinleri (Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 ve Hsp110) ve hücre dışında kümeleşme ve alfa-makroglobulin gibi örnekler verilebilir. HSP'ler, protein katlanma sürecinde önemli bir rol oynar ve hücreleri zararlı stresle ilişkili olaylardan korur. Hsp iki aile içerisinde toplanır. - ATP bağlayıcı bir bölgeye sahip olan klasik Hsp'ler, 60 kD veya daha fazla moleküler ağırlığa sahiptir ve bu aile Hsp100, Hsp90, Hsp70 ve Hsp60'yı içerir. -ATP bağlayıcı bölgeye sahip olmayan küçük Hsp'ler, 40 kD veya daha az moleküler ağırlığa sahiptir ve örnekleri arasında  $\alpha$ B-kristalin, Hsp27, Hsp20, HspB8 ve HspB2/B3 yer alır. Bu proteinler diğer Hsp'lerin katlanma fonksiyonunda yardımcı olabilir. Bu mekanizmaların başarısız olması oksidatif stres, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve birçok diğer duruma yol açabilir. Bu durum hasara, sinir hücrelerinin kaybına ve nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesine neden olabilir. Farklı Hsp'ler, yanlış katlanmış proteinlerin amiloid oluşumunu tetikleyen proteinler (A $\beta$  ve tau) gibi agregasyon sürecini engelleyebilir ve bunların parçalanmasını teşvik edebilir.

### 2.6.4 Hsp60

Hsp60, mitokondriyal protein katlanmasında önemli bir rol oynar. Ancak, Alzheimer hastalığındaki rolü hala tam olarak anlaşılamamıştır. Bu proteinin koruyucu bir rol oynadığına inanılanlar olduğu gibi mikroglia tarafından aşırı ifade edilen ve nöronal hücre ölümünü uyarabilen toll benzeri reseptör 4 (TLR-4) gibi pro-inflamatuar faktörleri artıran zararlı bir etkisi olduğunu düşünenler de bulunmaktadır. Bu nedenle aktivasyonlu mikroglia ve Hsp60 ifadesinin inhibe edilmesi nörodejeneratif hastalıkları önlemek için umut vadeden bir strateji olarak değerlendirilebilir. Hsp60'ı inhibe eden mizoribin (immünsüpresan) ve pirazolopirimidin EC3016 gibi bileşikler bulunmaktadır. Her iki bileşik de Hsp60'ın ATPaz aktivitesini bloke ederek ve protein katlanmasını engelleyerek etki gösterir. Diğer yandan, fungal metabolit avrainvillamid ve bakteriyel metabolit epolaktan, Hsp60'ın sistein kalıntılarına bağlanarak ve katlanma aktivitesini inhibe ederek etki gösterir. Ancak Hsp60'ın Alzheimer hastalığındaki rolü hala tartışmalıdır ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.



**Şekil 2.11** Farklı şaperon moleküllerinin kimyasal yapıları: Mizoribin, EC3016, Avrainvillamid, Epolaktan, MKT-077, YM-01, JG-98, Radikol, Geldanamisin, 17-AAG, Pochoxime C (OS47720), R55 ve OT1001 (184,185,186).

### 2.6.5 Hsp70

Hsp70'ün A $\beta$ 42'ye bağlanarak kendi kendine agregasyonunu engellediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Martín-Peña ve arkadaşları, Alzheimer hastalığı modellerinde *Drosophila* sineklerinde Hsp70'ün sitozolik ve ekstrasellüler olmak üzere iki izoformunu inceleyerek A $\beta$ 42 agregasyonu kaynaklı hafıza bozulmasına karşı koruyucu rolünü değerlendirmiştir. Hayvan çalışmaları, Hsp70'ün hem hücre içinde hem de hücre dışında çift fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir. Hsp70, A $\beta$ 42 nörotoksitesine ve sinaptik kayba karşı koruma sağlar. Ayrıca, tau ve hiper-fosforile olmuş formuna bağlanarak agregasyonu azaltır ve tau'nun mikrotübüllere bağlanmasını teşvik eder. Hsp70, mikrogliya, insülin parçalayıcı enzim ve tümör büyüme faktörü- $\beta$ 1'i aktive ederek  $\beta$ -amiloidleri parçalar ve hafıza bozukluklarını önler. Alzheimer hastalığı beyin dokusunda Hsp70 düzeylerinin arttığı ve aktive glia ve stresli nöronların varlığıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, Hsp70'ün Alzheimer hastalığındaki

ekstrasellüler birikimlerle ilişkili olduğu bulunmuştur. Hsp70'ü hedefleyen ilaç tedavileri özellikle Hsp70 ATP bağlanma bölgesini hedefleyen ve inhibe eden önceki antikanser ilaçların in vitro ve ex vivo ortamlarda tau seviyelerini azaltma yetenekleri nedeniyle Alzheimer hastalığının tedavisinde aday olarak değerlendirilmektedir.

MKT-077 (1-etil-2-((Z)-((E)-3-etil-5-(3-metilbenzo[d]tiazol-2(3H)-iliden)-4-oksothiazolidin-2-iliden)metil) piridin-1-ium klorür), mitokondriyal Hsp70 bölgesine bağlanan bir antikanser rodasyanın bileşiğidir ve antiproliferatif bir ajan olarak işlev görür. Ancak, bu bileşiğin kullanımı toksisite yan etkileri ve düşük kan-beyin bariyeri penetrasyonu nedeniyle durdurulmuştur. Öte yandan, MKT-077 türevidi olan YM-01, MKT-077'nin piridinyum azotundaki etil grubunun metil grubuyla tek bir değişiklik yapılarak geliştirilmiştir. JG-98, YM-01'e kıyasla Hsp70 ile %60 daha yüksek bağlanma affiniteye sahip başka bir MKT-077 türevidir (187,184,185,186).

### 2.6.6 Hsp90

Hsp90, tau fosforilasyonu ve defosforilasyonunu düzenleyen başka bir HSP türüdür. Hsp90'in inhibe edilmesi, tau fosforilasyonunu azaltarak hiperaktivasyon durumunda tau patogenezi ile ilişkilendirilen tau kinazlerin azalmasına neden olur. Hsp90 inhibitörleri başlangıçta kanser tedavisinde kullanılmıştır. Ancak, son zamanlarda Alzheimer hastalığı için umut verici bir tedavi olarak değerlendirilmektedir. Radikicol (RDC) ve geldanamisin (GA) Hsp90 inhibitörleridir. Geldanamisin, doğal bir antifungal bileşiktir ve ilk keşfedilen Hsp90 inhibitörüdür. Ancak, bu inhibitör üzerindeki çalışmalar toksisitesi nedeniyle durdurulmuştur. Öte yandan 17-AAG (17-(Alilamino)-17-demetoksigeldanamisin), daha düşük toksisiteye sahip ve daha iyi farmakokinetik profili olan bir geldanamisin türevidir. Bu inhibitör tau fosforilasyon yolunu dolaylı olarak bloke ederek (Hsp70'ü indükleyerek) transgenik fare modelinde bilişsel fonksiyonun iyi bir şekilde iyileşmesini göstermiştir (188). Pochoxime C (OS47720), Alzheimer hastalığı fare modelinde test edildiğinde iyi güvenlik ve etkinlik profilleri sergileyen bir santral sinir sistemi geçirgen Hsp90 inhibitörüdür. Yapılan çalışmalar, OS47720'nin ısı şok faktörü (HSF-1) aktivasyonu ve bağımlı transkripsiyonel olaylar aracılığıyla sinaptik fonksiyonu güçlendirerek etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Kombinasyonlu çalışmalar, HSP'leri hedeflemenin patojenik tau seviyelerini azaltma ve normal tau homeostazını geri kazanma amacıyla yeni bir etki mekanizmasıyla ilaçlar geliştirmek için umut verici bir strateji olduğunu göstermektedir.

### 2.6.7 Vaküolar sınıflandırma proteini 35 (VPS35)

Nöronlarda ve gliyal hücrelerde protein birikimi hücresel protein homeostazının bozulmasına neden olabilir. Endozomal-lizozomal sistem, proteinlerin geri dönüşümü ve parçalanması için taşıma işlevini üstlenir. Bu sistemde herhangi bir işlev bozukluğu Alzheimer hastalığı gibi birçok hastalığa yol açabilir. Retromer, endozomdan trans-Golgi ağına kargo moleküllerini taşıyan düzenleyici proteinlerden oluşan bir komplekstir. Retromer fonksiyonunun kaybı, VPS35'in düzenlenmesinin azalmasına ve A $\beta$  oluşumunun artmasına, bilişsel bozuklukların ortaya çıkmasına ve sinaptik işlev bozukluğuna neden olması Alzheimer hastalarında rapor edilmiştir (190,191). VPS35 aşırı ifadesinin 3xTg fare beyinlerinde bellek fonksiyonu üzerindeki etkilerini değerlendiren bir çalışma, aşırı VPS35 ifadesinin A $\beta$  peptidinin ve tau nöropatolojisinin (çözünür, çökelmiş ve fosforile tau) önemli ölçüde azaldığını, ayrıca nöroinflamasyonun azaldığını ve sinaptik işlev bozukluğunun iyileştiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, VPS35'in Alzheimer hastalığı tedavisi için umut vadeden bir terapötik hedef olduğunu göstermektedir. Ayrıca, retromer stabilitesini ve işlevini artırarak A $\beta$  oligomerizasyonunu endozomdan uzaklaştırma ve APP'nin patojenik işlenmesini azaltma potansiyeline sahip küçük bir farmakolojik kaperon molekülü olan R55 (tiyofen-2,5-diylbis(metilen) dikarbamimidotiatedihidroklörür), nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için umut verici bir molekül olabilir (192).

### 2.6.8 OT1001

Nörodejeneratif hastalıklarda gangliosid birikiminin protein yanlış katlanması ve agregasyonu ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar incelenmiştir. Alzheimer hastalığı beyinlerinde monosialogangliosid (GM1, GM2 ve GM3) düzeylerinin anormal olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, A $\beta$ 'nin mutasyona uğramış formları özellikle Dutch mutan APPE693Q gibi GM2 ve GM3'ün pro-agregasyon özelliklerine duyarlılık göstermiş ve bu durum gangliosid bağlı A $\beta$  (GA $\beta$ ) peptidinin oluşumuna yol açmış, A $\beta$  peptitlerinin agregasyonunu veya birikimini hızlandırmıştır.  $\beta$ -heksosaminidaz ( $\beta$ -heks), GM2 gangliosidini katabolize eden lizozomal bir enzimdir ve aktivitesinin artırılması GM2 düzeylerinin ve A $\beta$  agregasyonunun veya birikiminin azalmasına yol açabilir. Küçük moleküller, farmakolojik şaperonlar gibi vahşi tip proteinlere seçici olarak bağlanarak ve normal katlanmalarını geri kazandırarak tedavi edici ajanlar olarak kullanılabilir. OT1001,  $\beta$ -heks'i hedefleyen bir iminosakkarit şaperondur ve beyindeki düzeyini arttırarak GA $\beta$  patolojisini azaltır. Dutch APPE693Q transgenik fareler üzerinde yapılan çalışmalar, OT1001'in iyi farmakokinetik özelliklere, beyne geçebilme

yeteneğine ve düşük yan etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Bu özellikler bileşiği  $\beta$ -heks aktivitesini artırmak için iyi bir ilaç adayı haline getirir (193).

### 2.6.9 Doğal Özütler

Doğal bileşikler uzun bir süredir birçok patolojik hastalığın tedavisinde terapötik ajanlar olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, bu bileşiklerin nörokoruyucu etkiye sahip olduğunu göstermiş ve in vitro ile in vivo çalışmalar, Alzheimer hastalığı için tedavi potansiyeline sahip olduklarını kanıtlamış ve bazılarının klinik deneme aşamalarına girmesine olanak tanımıştır. Nikotin, Alzheimer hastalığı için klinik denemelere giren ilk doğal bileşiktir. Daha sonra C, E ve D vitaminleri gibi diğer bileşikler nöroinflamasyon ve oksidatif hasara karşı koruyucu rolü nedeniyle daha fazla ilgi çekmiştir. Bugula neritina adlı bir bryozoandan elde edilen makrolid lakton özütü olan bryostatin,  $\alpha$ -sekretaz aktivitesini indükleyebilme, A $\beta$  üretimini azaltabilme ve Alzheimer fare modelinde öğrenme ve belleği artırabilme yeteneğini göstermiştir (194). Geleneksel Çin tıbbı (TCM) gibi halk tıbbında kullanılan diğer doğal bileşikler, Alzheimer hastalığını çeşitli mekanizmalar üzerinden etkileyerek tedavi etmede büyük potansiyele sahiptir (195).

**Tablo 2.6** Halk tıbbında kullanılan doğal bileşikler ve etki mekanizmaları (194).

| Sıra No. | Doğal bileşikler                                                                                                                                                                         | Etki mekanizması                                                                                                                                                                                                                                      |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1        | Schisantherin A, Ginsenoside Rh2 ve Angelica sinensis ekstreleri                                                                                                                         | A $\beta$ oluşum inhibitörleri                                                                                                                                                                                                                        |
| 2        | Shengmai (SM) formülü, Karinik asit C ve Tanshinon IIA (TIIA) ekstresi                                                                                                                   | A $\beta$ birikiminin azaltılması                                                                                                                                                                                                                     |
| 3        | Onjisaponin B, Notoginsenoside R1 ve delta-9-Tetrahidrokanabinol (THC)/kannabidiol (CBD)                                                                                                 | A $\beta$ 'nin parçalanmasının teşvik edilmesi                                                                                                                                                                                                        |
| 4        | Rhynchophylline (RIN), INM-176 (Angelica gigas'ın etanolik ekstresi), Houlttuynia cordata Thunb. (Saururaceae) su ekstreleri, Huperzin A ve Diospyros kaki L. f'ten etil asetat ekstresi | A $\beta$ nörotoksitesinin inhibe edilmesi ve mikrogial hücrelerin aşırı aktivasyonunun azaltılması, nöroinflamasyon, oksidatif stres ve kalsiyum homeostazının bozulması gibi durumların azaltılması, nöron kaybına neden olan etkilerin azaltılması |

|    |                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                        |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| 5  | Tongmai Yizhi Decoction (TYD) (altı adet hammadde içerir. Carthamustinctorius L.'den safran sarısı (SY), G. jasminoides J. Ellis meyvesinden geniposid, Panax ginseng C. A. Mey'den ginsenosid Rd, Crocus sativus L.'den krokin ve kinonlar): | Hiperfosforile tau proteininin inhibisyonu ve agregasyonunun önlenmesi |
| 6  | Ginkgo biloba                                                                                                                                                                                                                                 | Antioksidan, anti-enflamatuar, nörokoruyucu                            |
| 7  | Curcumin                                                                                                                                                                                                                                      | Anti-enflamatuar, antioksidan, amiloid-beta birikimini engelleyici     |
| 8  | Resveratrol                                                                                                                                                                                                                                   | Antioksidan, anti-enflamatuar, amiloid-beta birikimini engelleyici     |
| 9  | Yeşil çay ekstresi                                                                                                                                                                                                                            | Antioksidan, anti-enflamatuar, amiloid-beta birikimini engelleyici     |
| 10 | Huperzin A                                                                                                                                                                                                                                    | Asetilkolinesteraz inhibitörü, nörokoruyucu                            |
| 11 | Ginseng                                                                                                                                                                                                                                       | Antioksidan, anti-enflamatuar, nörokoruyucu                            |
| 12 | Ashwagandha                                                                                                                                                                                                                                   | Anti-enflamatuar, antioksidan, nörokoruyucu                            |
| 13 | Salvia miltiorrhiza                                                                                                                                                                                                                           | Anti-enflamatuar, antioksidan, nörokoruyucu                            |
| 14 | Houttuynia cordata                                                                                                                                                                                                                            | Anti-enflamatuar, antioksidan, nörokoruyucu                            |
| 15 | Polifenoller (meyve ve sebzelerde bulunur)                                                                                                                                                                                                    | Antioksidan, anti-enflamatuar, nörokoruyucu                            |

Halk tıbbında kullanılan bu doğal bileşikler, Alzheimer hastalığı için potansiyel terapötik etkilere katkıda bulunan çeşitli etki mekanizmalarına sahiptir. Antioksidan özellikleri sayesinde oksidatif stresi azaltır ve nöronları hasardan korur. Aynı zamanda anti-enflamatuar etkileri ile nöroenflamasyonu azaltır ve beyin fonksiyonu üzerindeki olumsuz etkilerini hafifletir. Curcumin, resveratrol ve yeşil çay ekstresi gibi bazı bileşikler, Alzheimer hastalığının belirtisi olan amiloid-beta birikimini engellemekte etkilidir. Asetilkolinesteraz inhibitörleri arasında yer alan Huperzin A, beyinde asetilkolin seviyelerini artırarak bilişsel fonksiyonu iyileştirebilir. Ayrıca, bu bileşikler nörokoruyucu özelliklere sahiptir, bu nedenle nöronların hayatta kalmasını ve fonksiyonunu destekler. Bu doğal bileşiklerin prelinik ve erken klinik çalışmalarda umut verici sonuçlar gösterdiği unutulmamalıdır, ancak Alzheimer hastalığının tedavisindeki güvenilirlik ve etkinliklerinin belirlenmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

## 2.7 Oksidatif Stres

Oksidatif stres, serbest radikallerin artışı ve bu reaktif moleküllerin endojen antioksidan savunma mekanizmalarıyla dengesiz bir etkileşimi sonucunda ortaya çıkar. Bu serbest radikaller DNA, lipidler, proteinler ve nükleik asitler üzerinde oksidatif hasara yol açarak oksijen veya azot türlerinden kaynaklanan zararlara neden olabilir. Yaşlanmanın altında yatan kesin hücresel mekanizmalar hala belirsiz olsa da oksidatif hasarın organlar, dokular ve hücrelerin işlev kaybına neden olduğu bilinmektedir. Oksidatif stres, amiotrofik lateral skleroz (ALS), Parkinson hastalığı (PH), Alzheimer hastalığı (AH) ve Huntington hastalığı (HH) gibi çeşitli nörodejeneratif bozuklukların gelişimine ve ilerlemesine katkıda bulunmaktadır (196,197).

### 2.7.1 Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Reaktif oksijen türleri (ROS), dış yörüngesinde tek sayıda elektron içeren atom veya moleküllerdir. Bu türler, elektronlarını çiftler halinde tutan bileşiklere kıyasla daha kararsızdır. ROS'lar eksik elektronları nedeniyle kararsızdır ve bundan dolayı diğer moleküllerle etkileşime girerek yapılarını bozmalarına neden olabilir. Bu reaktif türler çeşitli enzimatik ve oksidasyon reaksiyonlarının süreçleri sırasında oluşur. Mitokondriyal solunum zinciri ROS üretiminin ana kaynağıdır (198). Mitokondri iç zarında elektronlar taşınarak oksijenin suya dönüştürülmesi normalde bir enerji üretme sürecidir. Ancak, hipoksik koşullar altında bu işlem gerçekleşmez, bu da süperoksit anyonlarının üretiminin artmasına neden olur (199,200). Bu süreçte elektron taşıma sistemi (ETS) tamamen verimli değildir, en uygun koşullar altında bile bazal düzeyde elektron sızıntısı gerçekleşmektedir. Bu istenmeyen elektron sızıntısı moleküler oksijenle reaksiyona girerek hücresel ROS üretimini önemli ölçüde arttırmaktadır (201).

**Oksijen (O<sub>2</sub>),** yaşamsal fonksiyonların temel kaynağı olup aynı zamanda başlıca serbest radikal kaynağıdır. Oksijenin farklı faktörlerin etkisi altında veya yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu durumlarda süperoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) radikali, singlet oksijen (O<sup>2</sup>), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hidroksil (OH) radikali gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olmaktadır (202).

**Süperoksit radikali:** Toksik etkisi olmayan O<sub>2</sub>'un aerobik hücre metabolizması sonucunda bir elektron alarak oluşan bir türdür. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin kaynağıdır ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığıyla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub>'e dönüştürülür (203).

**Hidroksil Radikali:** Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarının ürünü olup en toksik reaktiftir. Nükleik asitler, amino asitler, fosfolipidler, organik asitler, şekerler ve lipoproteinler gibi

birçok madde ile reaksiyon oluşturabilir. Ancak, bu maddelerin özel bir antioksidan savunma mekanizması bulunmamaktadır. Hidroksil radikali, lipoproteinlere etki ederek hücre membranlarında hasara neden olabilir ve aynı zamanda protein oksidasyonunu artırarak hücre içi normal süreçleri bozabilir (204, 205).

**Hidrojen Peroksit:** Süperoksidin SOD enzimi aracılığıyla veya spontan olarak üretilen uzun ömürlü bir moleküldür. Eşlenmemiş elektron içermediği için serbest radikal olarak kabul edilmez. Ancak, süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve hasar verici serbest radikal olan hidroksil radikali oluşumuna neden olduğu için reaktif oksijen türü sayılmaktadır (206). Süperoksitin aksine, hücre membranıyla korunan yapılara kolaylıkla penetrasyona uğratabilir, bu nedenle süperoksitin ulaşamadığı bölgelerde hidroksil radikalını oluşturmaktadır. Ayrıca,  $Fe^{+2}$  iyonları ile reaksiyona girdiği durumlarda da hidroksil radikali üretimine neden olabilmektedir (206).

### 2.7.2 $H_2O_2$ ve Nörodejenerasyon

Oksidatif stres, nörodejenerasyon patolojileri dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların ayırt edici özelliğidir.  $H_2O_2$  genellikle nörodejeneratif bozukluklarda redoksle düzenlenen olayların merkezi unsuru olarak kabul edilir (207). ROS ve hastalık arasında doğrudan bir bağlantı bulunmaktadır. Süperoksit anyon radikallerini  $H_2O_2$  ve oksijene dönüştürerek redoks homeostazında rol oynayan bir enzim olan SOD ile ilişkili patoloji tarafından sağlanır. ALS'ye neden olduğuna inanılan SOD1'deki mutasyonlar, motor nöronlardaki SOD1 agregasyonu ile ilişkilendirilmiştir, bu da mitokondriden kaynaklanan serbest sisteinlerin oksidasyonu ile oksidatif stresin oluşabileceği düşünülmektedir (207). Ayrıca, down sendromunda kodlayan genin üçüncü bir kopyasına bağlı olarak SOD1'in aşırı aktivitesi, nöronal ölümü teşvik etmek için yeterli toksik seviyelere ulaşabilen  $H_2O_2$  birikimi ile sonuçlanır. Alzheimer hastalığında oksidatif stres içeren birçok kanıt bulunmaktadır. Özellikle, peroksiredoksin seviyeleri AH'de değişkenlik gösterir ve lipid peroksidasyonu, beyin amiloid beta ( $A\beta$ ) plak yükü ile pozitif bir korelasyon içindedir. Bu durum, ROS'un Alzheimer hastalığı patogenezinin bir katkısı olduğunu düşündürmektedir (208). Ayrıca, Huntington hastalığında oksidatif hasar, düşük moleküler ağırlıklı antioksidan metabolizmasını ve azaltılmış askorbat alımını tehlikeye atar ve serbest radikallerin üretimini artırabilir. Aynı zamanda Parkinson hastalığı ve ROS patlamasının nörodejenerasyona eşlik ettiği prion patolojisi gibi durumlarda da redoks dengesizliğini düşündürmektedir (209). Antioksidan uygulaması ROS'un temizlenmesiyle birlikte çeşitli

hastalıkların tedavisi, özellikle nörodejenerasyon gibi durumlar için geçerli bir terapötik strateji oluşturmaktadır (209).

### **2.7.3 Alzheimer Hastalığındaki Oksidatif Stresin Rolü**

#### **2.7.3.1 Amyloidler ve Oksidatif Stres**

Amiloid plaklar muhtemelen oksidatif stresin bir sonucu olarak oluşmaktadır. Abeta 42 proteini içindeki 35. pozisyonundaki metiyonin, reaktif oksijen türlerinin üretiminde önemli bir rol oynar. Yapılan çalışmalar, bu sürecin düşük moleküler ağırlıklı antioksidanların tükenmesine yol açtığını göstermiştir (210). Metiyonin 35. pozisyonundaki rolü, çeşitli oksitleyici ajanlar tarafından sülfür kısmının oksitlenmesine izin veren bir kimyasal süreç tarafından oluşur. Bu süreç, reaktif oksijen türlerine benzer maddelerin ortaya çıkmasına neden olarak metiyonin sülfoksiti meydana getirir. Metiyonin sülfoksitin indirgenmesi, metiyonin sülfoksit redüktaz gibi enzimler aracılığıyla gerçekleşir. Metiyonin sülfoksit daha sonra metiyonin sülfona kadar daha da oksitlenebilir. Metiyonin sülfoksit redüktaz, oksitlenmiş metiyonini içeren sülfoksit grubunu indirgenmiş forma dönüştürmekten sorumludur. Bu sürecin amiloid plak oluşumunu korumak için umut vadeden bir terapi hedefi olduğu belirtilmektedir (211). Metiyonin 35'in oksidatif durumunun Alzheimer hastalığındaki amiloid plak oluşumuyla ilişkili olduğunu belirten çalışmalar bulunmaktadır (212). Ancak, sülfoksit içeren Abeta 42'nin sitotoksitesinin de kanıtlandığı diğer çalışmalar göstermiştir (213). Bu çelişkili bulgular, metiyonin 35'in rolünün tam anlaşılabilmesi için daha fazla deneysel çalışma gerektirdiğini göstermektedir. Bazı çalışmalarda ise metiyoninin oksidatif durumunun plak oluşumunda ve reaktif oksijen türlerinin katalitik üretiminde önemli bir rol oynamadığına dair ifadeler bulunmuştur (214). Metiyonin 35'in rolünün anlaşılması için saf Abeta 42'nin kimyasal özellikleri ve hücre içindeki etkileşimleri daha detaylı bir şekilde araştırılmalıdır. Öte yandan, amyloidlerin oksidatif strese katkıda bulunabilen ağır metalleri şelatörleme kapasitesinin olması, daha ileri araştırmaların gerekliliğini ortaya koymaktadır.

#### **2.7.3.2 Metabolizma, Reaktif Bileşenlerin Kaynağı**

Temel metabolizma, reaktif oksijen türleri kaynağı ve Alzheimer hastalığının gelişimine katkıda bulunan karmaşık bir faktördür. Metabolizmanın antioksidan homeostazdaki ve Alzheimer hastalığındaki rolü, geniş ölçeği nedeniyle karmaşıktır (215). İnsanlar, metabolik işlevleri için oksijene ihtiyaç duyarlar ve bu ihtiyaç oksidatif fosforilasyonun bir parçası olarak enerji tüketimiyle sıkı bir şekilde bağlantılıdır. Alınan oksijenin yaklaşık %1'i, zararsız bileşikler yerine hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerine iletilir (216). Temel

metabolizma tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin miktarını anlamak önemlidir, ancak reaktif bileşiklerin üretimi aynı zamanda çeşitli diğer yollarla da gerçekleşebilir (217,218). Örneğin, çeşitli oksijenazlar, nitrik oksit sentazı ve mitokondrial solunum zinciri kompleks IV gibi faktörler reaktif oksijen ve azot türleri üretiminde rol oynar (219,220). Bu reaktif bileşiklerin üretimi, patolojik koşullar altında artabilir. Örneğin, hipoksi durumunda üretim önemli ölçüde artabilir.

Nitrik oksit, Alzheimer hastalığındaki özel bir reaktif bileşik rolüne sahiptir ve hastalıkla ilişkilendirilen risk faktörleri arasında yer alır. Bu bileşiğin Alzheimer hastalığındaki oksidatif stresi tetikleyen bir faktör olabileceği düşünülmektedir (221). Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından sentezlenen bir moleküldür. Bu sentez L-arginin, oksijen, NADPH ve NOS enzimi arasında gerçekleşen bir reaksiyonla meydana gelir. Ancak, bu süreç aynı zamanda süperoksit anyonu gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna da zemin hazırlar. Hastalık ilerledikçe NO sentezi artar ve böylece oksidatif stresin artışına neden olabilir. Oksidatif stres, hücrelerdeki reaktif oksijen ve azot türlerinin dengesiz bir birikimini ifade eder. Nitrik oksit, süperoksit anyonu ile reaksiyona girerek peroksintriti oluşturabilir. Peroksintrit, hücrelerde sitotoksik etkilere neden olan bir bileşiktir ve oksidatif stresin bir sonucudur (222,223).

Alzheimer hastalığıyla ilişkilendirilen diğer bir risk faktörü hipertansiyondur. Hipertansiyon, NO sentaz aktivitesini artırabilir, buna bağlı nitrik oksit seviyelerindeki artışa yol açabilir. Bu durum hastalığın ilerlemesini hızlandırabilir. Yapılan çalışmalar, endotel tipi nitrik oksit sentazını ifade edemeyen farelerde daha yüksek patolojik bulgular ve daha yoğun tau fosforilasyonu olduğunu göstermiştir. Bu bulgular nitrik oksidin Alzheimer hastalığındaki patolojik süreçlere karmaşık bir şekilde katıldığını göstermektedir (224). Düşük molekül ağırlıklı antioksidanların basit bir şekilde uygulanması veya antioksidan potansiyele sahip ilaçların hazırlanması, bu iki yol arasında müdahale edildiği için sınırlı terapötik etkiye sahip olabilir. Bu nedenle reaktif oksijen ve azot türlerinin hastalıklarda farklı rollerini anlamak ve buna yönelik tedavi stratejilerini geliştirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Mitokondrial solunum zincirinin karmaşık IV'ünün normal ve bozulmuş fonksiyonları, zararsız bir bileşik olan suyu üretirken aynı zamanda zararlı hidrojen peroksiti üreten önemli bir metabolik yol örneğidir. Bu durum mitokondrilerin, hücrenin en metabolik olarak aktif bölgeleri reaktif oksijen türlerinin önemli üreticileri olduğunu göstermektedir (225). Reaktif oksijen türleri mitokondriyi hasar verdiğinde tüm hücre için ciddi sonuçlara yani apoptoza neden olabilir (226). Mitokondrilerin Alzheimer hastalığındaki rolü önemli bir konu olarak

kabul edilmiş ve oksidatif stres ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir (227). Alzheimer hastalığının araştırılma sürecinde, mitokondri ile ilgili birkaç teori öne sürülmüştür. Bunlardan biri, mitokondrilerin Alzheimer patolojisi tarafından zarar gördüğünü ve hastalığın amiloid plaklar veya nörofibriller demetlerin varlığı ile birlikte kötüleştiğini öne sürerken, diğeri hastalığın etiolojisinin mitokondrilerde ve mitokondriyal bozulmanın veya reaktif bileşiklerin aşırı üretiminin amiloid plaklar ve nörofibriller demetlerin oluşumundan önce gelen bir adım olduğunu varsayar. Alzheimer hastalığındaki mitokondri rolüne dair şüpheler,  $\gamma$  sekretazın mitokondriye çok yakın olan endotel tipi nitrik oksit sentazını ifade ettiği hücre zarlarında yüksek aktivite sergilemesiyle de desteklenmektedir (228,229). Bu nedenle, mitokondrial metabolizmadaki bozukluklar amiloid plakların oluştuğu bölgelere kolayca ulaşabilir. Yapılan çalışmalar, mitokondriyal metabolizmanın hiperfosforile tau veya mitokondri yakınındaki amiloid plaklar nedeniyle değiştiğini doğrulamıştır (230,231).

#### **2.7.4 Oksidatif Stres Modelleri**

Oksidatif stresin modellenmesine yönelik en yaygın yaklaşımlar, birincil nöral hücre kültürleri, beyin dokusu eksplantları, nöral hücre hatları gibi modellerin hiper veya hipoksi, enerji kaynaklarının eksikliği (glikoz) gibi pro-oksidatif koşullara maruz bırakılması ve harici pro-oksidanların eklenmesi aracılığıyla oluşturulur (232-233). Farklı deneysel modeller arasında hücre veya doku kültürleri, nöral hücrelerin oksidatif durumundaki değişiklikleri doğrudan ölçmek için benzersiz bir olanak sağlar ve doku/hücre kültürü, oksidatif stresin patolojik bir sürece dahil edilmesiyle ilgili olarak tercih edilen model haline getirir (234).

Hücre kültüründe oksidatif stresin etkilerini incelemek için çeşitli hücre tipleri kullanılmaktadır. Farklı hücre türlerinin pro-oksidatif ajanlara maruz bırakılması, çeşitli beyin hücrelerinin belirli hastalıkların patogeneğinde rol oynayan oksidatif hasarlara duyarlılığındaki potansiyel farklılıkların araştırılmasına olanak tanır. Oksijen ve glikoz yoksunluğu yoluyla oluşturulan oksidatif stres modeli, oligodendrositlerin de oksijen ve glikoz yoksunluğunun nöronlarda mitokondriyal disfonksiyonu indüklediğini göstermektedir (235,236).

Kültürlenmiş nöron hücrelerinde amiloid beta peptitleri kaynaklı toksisitenin, doğrudan oksidatif strese bağlı etkileşimlerden kaynaklandığı gösterilmiştir (237). Bu nedenle, hücre kültürü modellerinin kullanımı, alzheimer hastalığı gibi nörolojik bozukluklarla ilişkili mekanizmalar hakkındaki hipotezlerin test edilmesine olanak sağlar. Beta amiloidin toksisitesi, nöronal hücre hatları kullanılarak A $\beta$ 'nın neden olduğu nörodejenerasyon mekanizmalarının anlaşılmasına katkı sağlamaktadır. Farklı A $\beta$  peptitlerine maruz bırakılan birincil nöron

kültürleri, nöral hücre dizileri ve organotipik beyin kültürleri üzerine yapılan çalışmalar, Alzheimer hastalığında oksidatif stresin gelişiminde A $\beta$ 'nin olası rolünü destekleyen veriler sağlamıştır (238,239). Beta peptitlerin artan ROS üretimine, lipidlere ve proteinlere, oksidatif hasara, antioksidan savunma değişikliklerine ve oksidatif strese bağlı gen ekspresyonu değişikliklerine neden olma yeteneği, birçok araştırma tarafından kanıtlanmıştır.

Huntington hastalarından alınan ölüm sonrası beyin dokusunda mitokondriyal kompleks II'nin azalmış aktivitesi tespit edilmiştir. Hastaların korteks ve striatal doku örneklerinde izoprostanlar ve 3-nitropropionik asit (3-NP) gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin artan seviyeleri de belirlenmiştir. Bu nedenle 3-NP kompleks II'nin huntington hastalığı ile ilişkili oksidatif stresin modellenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kültürlerde 3-NP ile indüklenen nörotoksosite çalışmaları, oksidatif hasarın nöronal hücre ölümü mekanizmasında yer aldığını ve Huntington hastalığı ile ilişkili oksidatif stresin ayırt edici özelliklerini açıklayabileceğini göstermiştir (240,241).

Parkinson hastalığında oksidatif hasarın biyolojik belirteçleri öncelikle nigrostriatal sistemde bulunur. Dopaminerjik nöron kaybı beyindeki oksidatif stresin olası bir nedeni olarak dopamin metabolizmasındaki bozulmaları işaret eder. 6-hidroksidopaminin (6-OHDA) toksisitesi ile oluşturulan oksidatif stres Parkinson hastalığı modellemesine olanak sağlamaktadır (242,243). Buna ek olarak N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP), parkinsonizmin etkeni olarak tanımlanmıştır (244). Hücre kültürü ve hayvan modellerinde, MPTP nörotoksitesi ile oksidatif stres oluşturularak Parkinson hastalığı modellemesi yapılmıştır (245). Ayrıca, deneysel Parkinson hastalığı modeli oluşturmak ve hastalığın mekanizmasını araştırmak amacıyla kullanılan rotenon, organik bir pestisitir. İnsan nöroblastoma hücre serisi olan SH-SY5Y hücrelerinde rotenon toksisitesi ile oluşturulan oksidatif hasar, rotenonun SH-SY5Y hücrelerinde nörotoksik etkilere neden olduğunu ve in vitro Parkinson hastalığı modeli oluşturmak amacıyla kullanılabileceğini göstermiştir (246). Donapezilin ve kuarsetin kombinasyonunun Alzheimer hastalığı (AH) tedavisindeki koruyucu ve tedavi edici etkilerini araştırmak amacıyla glioblastoma (U-118 MG) hücre hattında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toksisitesi aracılığıyla oluşturulan oksidatif hasar modellemesi yapılmıştır (247).

### **2.7.5 Antioksidanlar**

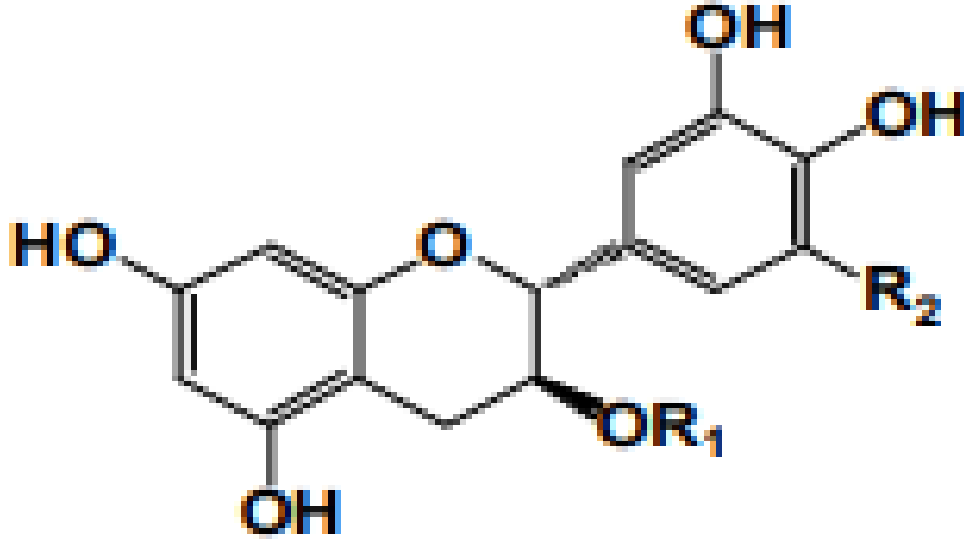
Serbest radikallerin oluşmasını engelleyerek veya mevcut radikallerle savaşarak oluşturabilecekleri hücre ve doku hasarını önleyen maddelere "antioksidanlar" denir. Antioksidanlar bu korumayı serbest radikallerle hızlı bir şekilde reaksiyona girerek

otooksidasyon ve/veya peroksidasyonun ilerlemesini önleyerek gerçekleştirirler. Endojen ve ekzojen antioksidanlar olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Endojen antioksidanlar kendi içerisinde enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olarak ayrılırken; ekzojen antioksidanlar vitamin ve ilaç olarak yararlanılanlar olarak gruplandırılırlar. Endojen antioksidanlardan biri, süperoksit dismutaz,  $O_2^-$  radikalinin,  $H_2O_2$  ve  $O_2$  dönüşümünü katalizleyerek antioksidan savunmayı gerçekleştirir.

Oluşan  $H_2O_2$ , katalaz veya glutatyon peroksidaz yardımı ile ortamdan uzaklaştırılır. Katalaz,  $H_2O_2$ 'in  $H_2O$  ve  $O_2$ 'ye dönüşümünü katalizlerken, glutatyon peroksidaz  $H_2O_2$ 'in indirgenmesinde rol oynamaktadır. Nonenzimatik antioksidanlar ise glutatyon, bilirubin, albümin, ürik asit, melatonin, koenzim Q10, transferrin, selenyum gibi örnekler verilebilir (248). Ekzojen antioksidanların vitamin olarak kullanılanlarına Beta-karoten (Vitamin A), askorbik asit (Vitamin C),  $\alpha$ -tokoferol (Vitamin E) ve folik asit (Vitamin B9) örnek verilebilir (249). Kafeik asit, hidroksisinamik asitler polifenoller adı verilen büyük bir kimyasal grubun önemli bir temsilcisidir ve genellikle klorojenik asit adı verilen bir kinik asit esteri olarak gıdalarda bulunur. Kafeik asit, doğal olarak çeşitli yiyecekler, içecekler, kuruyemişler, bitkiler, sebzeler, meyveler ve yağlarda bulunur. Kafeik asit içeren gıdaların tüketimi vücudun antioksidan seviyesini artırabilir ve hücrel sağlığın desteklenmesine yardımcı olarak oksidatif stresi azaltma özelliklerine sahiptir (274).

## 2.8 Polifenoller

Polifenoller bitkilerde doğal olarak bulunan kimyasal bileşiklerin geniş bir grubun adıdır. Bu bileşikler bitkilerin meyve, sebze, çay, kahve, şarap, baharatlar ve diğer besinlerinde yaygın olarak bulunurlar. Polifenoller bitkilere renk, aroma ve tat verirken aynı zamanda bitkilerin savunma mekanizmalarında da rol oynarlar. Polifenoller fenolik yapısal birimlerden oluşur. Bu yapısal birimler fenol halkaları ve bunlara bağlı olan hidroksil gruplarından oluşurlar. Polifenollerin yapısı ve özellikleri fenolik yapısal birimlerin sayısı, düzenlenmesi ve yan zincirlerin varlığı gibi faktörlere bağlıdır. Bu nedenle polifenoller arasında büyük bir çeşitlilik bulunur. Polifenollerin birçok farklı alt grubu vardır. Bunlar arasında flavonoidler (flavonlar, flavanoller, izoflavonlar, flavononlar, antosiyaninler), stilbenler, lignanlar ve hidroksisinamik asitler bulunur. Her bir alt grubun kendine özgü kimyasal yapısı ve biyolojik aktiviteleri vardır. Polifenollerin sağlık üzerinde bir dizi olumlu etkisi olduğu düşünülmektedir. Birçok polifenol antioksidan özelliklere sahiptir ve serbest radikallerle etkileşerek oksidatif stresi azaltabilir. Hücrelerin ve dokuların hasara uğramasını önleyerek ve oksidatif stresin neden olduğu iltihaplanmayı azaltarak gerçekleşebilir.



**Şekil 2.12** Polifenol kimyasal yapısı (250)

Oksidatif stres hücrelerdeki DNA, protein ve lipid hasarına neden olan serbest radikallerin birikmesi durumudur ve birçok hastalığın gelişimine katkıda bulunabilir. Polifenollerin antioksidan etkileri serbest radikallerle etkileşerek onları stabilize ederek veya antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak gerçekleşebilir. Ayrıca anti-inflamatuar etkileri sayesinde iltihaplanma süreçlerini baskılayabilirler. Bazı polifenollerin kardiyovasküler hastalıklar, kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve metabolik sendrom gibi hastalıkların riskini azaltabileceği belirtilmektedir. Polifenollerin günlük diyetimizde çeşitli besinler yoluyla alınması önemlidir. Renkli meyve ve sebzeler, çay, kahve, kırmızı şarap, zeytinyağı, çikolata ve baharatlar gibi besinlerde polifenoller bulunur. Ancak polifenollerin etkinliği ve sağlık üzerindeki etkileri hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Yeşil çay, kırmızı şarap, zeytinyağı, meyve ve sebzeler de polifenollerin diğer önemli kaynakları arasında yer almaktadır. Bu besinler, sağlıklı bir beslenme düzeninin önemli bir parçası olarak tüketildiğinde polifenollerin antioksidan ve diğer sağlık faydalarından yararlanılabilir.

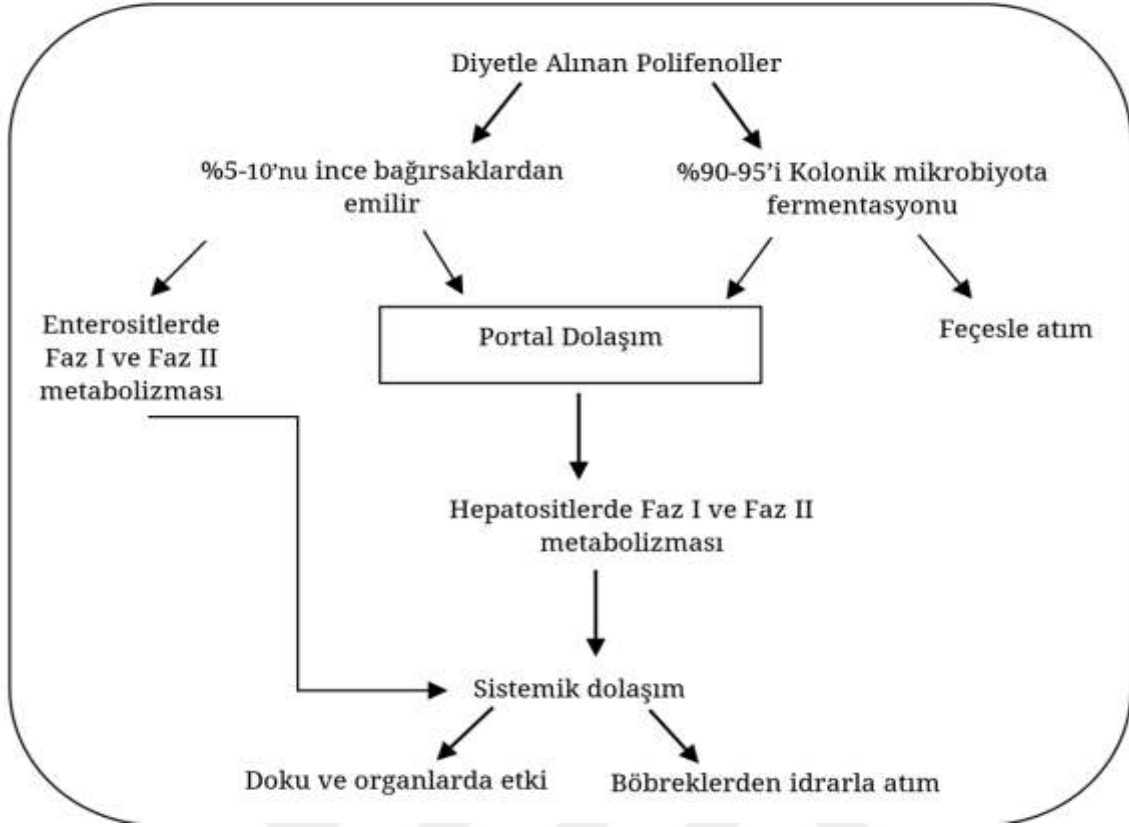
### 2.8.1 Polifenollerin Biyoaktiflikleri

Polifenoller, doğal bileşikler olup sentetik ve yarı sentetik bileşikler de içerirler. Bu bileşikler, fenolik yapısal birimlerin varlığıyla karakterizedir. Meyveler, sebzeler, tahıllar ve içecekler, polifenoller içeren besin kaynaklarından sadece birkaç örnektir. Üzüm, elma, armut, kiraz gibi meyveler önemli polifenol kaynakları arasında yer alırken; kırmızı şarap, çay, kahve, çikolata, tahıllar ve kuru baklagiller de diğer polifenol içeren örneklerdir (251). Son olarak polifenoller bitkilerin yaprakları, baharatları, sapları ve çiçeklerinde bulunur. Birçok ülkede polifenoller

günlük diyetin bir parçası olarak tüketilir (252). Polifenoller, bazı besin bileşenlerinde bol miktarda bulunan antioksidanlardır. Bu besinsel bileşiklerin günlük alımı 1 g/gün kadar yüksek olabilir. Bu nedenle, polifenoller genellikle diğer fitokimyasal besinsel antioksidanlardan daha yüksek miktarlarda besinlerde bulunurlar (253).

Polifenoller bitkilerin ikincil metabolitleridir ve ultraviyole radyasyon ve patojenlere karşı korunma gibi savunma sistemine dahil olan bileşiklerdir (254). Polifenoller acılık, buruk renk, koku ve oksidatif süreçlere karşı koruma özelliklere sahiptir. Bugüne kadar bitkilerde 8000'den fazla fenolik bileşik tanımlanmıştır. Polifenollerin örnekleri flavonoidler (flavonoller, flavonlar, izoflavonlar, antosiyanidinler) resveratrol, curcumin, taninler, lignanlar ve fenolik asitlerdir (255). Polifenoller bazı anti-enflamatuar ve antibiyotik özelliklere sahip olabilir ve ayrıca transkripsiyon faktörü Nrf2'yi aktive edebilir. Nrf2 hücrelerin oksidatif stres ve enflamasyona karşı korunmasında önemli bir rol oynar (256).

Çevresel faktörler, diyetin polifenol içeriği üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Bu faktörler arasında toprak tipi, ışık maruziyeti, yağış, kültür yöntemleri ve ağaç başına meyve verimi bulunur. Flavonoid konsantrasyonları ayrıca ışık maruziyetine bağlıdır. Olgunlaşma süreci bazı fenolik asitlerin konsantrasyonunu azaltabilir veya artırabilir (257). Biyoaktivlik sindirim, emilim ve metabolizma gibi birçok parametreye bağlıdır. İnsan diyetinde, polifenollerin biyoaktivlikleri üzerindeki etkisi basit ilişkilerle belirlenmez. Bu kompleks etkileşimlerde, çoğu polifenol ester formunda bulunur (258). Polifenoller genellikle bağırsaklarda tamamen emilmezler. Bu bileşikler, bağırsak enzimleri veya kolonik mikroflora tarafından hidrolize edildikten sonra emilirler. Farklı metabolik yollarla değiştirildikten sonra nihayet kana geçerler, ancak başlangıçtaki biyolojik formda bulunmazlar (258). Tamamlanmamış absorpsiyon nedeniyle polifenoller kolona ulaşabilir ve bağırsak mikrobiyotası tarafından metabolize edilerek çeşitli bakteriyel metabolitlere dönüşebilir. Bu süreç sonucunda, mikromolar miktarlarda flavonoidler ve monofenoller dışkıda bulunabilir (259). Polifenollerin biyoaktivlikleri, vücutta emilimleri, dolaşımları, dağılımları ve metabolizmaları gibi süreçleri içerir. Polifenollerin biyoyararlanılabilirliği, bir polifenolün vücutta ne kadar etkili bir şekilde kullanıldığını ve hedef dokulara ulaşabildiğini belirler.



Şekil 2.13 Polifenol metabolizması (260).

Polifenollerin biyoaktiflikleri bir dizi faktöre bağlıdır. Öncelikle polifenollerin kimyasal yapıları biyoyararlanılabilirliklerini etkiler. Örneğin polifenollerin moleküler boyutu, hidrofobisitesi, polarite ve çözünürlüğü gibi faktörler emilim sürecini etkileyebilir. Bazı polifenoller daha kolay emilirken bazıları ise daha az emilir. Ayrıca polifenollerin besin matrisine bağlı olarak biyoaktiflikleri de değişebilir. Polifenoller gıdaların diğer bileşenleriyle etkileşime girebilir ve emilimlerini etkileyebilir. Örneğin, bazı polifenoller diyet lifleri veya diğer besin bileşikleri ile etkileşime girerek emilimlerini azaltabilir veya artırabilir.

Bağırsak mikrobiyotası da polifenollerin biyoyararlanılabilirliğini etkileyen önemli bir faktördür. Bağırsak mikrobiyotası polifenollerin bağırsakta metabolize edilmesini veya değiştirilmesini sağlayabilir. Bu metabolizma süreçleri polifenollerin biyolojik etkilerini ve biyoaktifliklerini etkileyebilir. Son olarak polifenollerin biyoaktiflikleri metabolizma ve eliminasyon süreçleri tarafından da etkilenir. Polifenoller karaciğerde metabolize olur ve çeşitli metabolitlere dönüşebilir. Bu metabolitlerin biyolojik etkileri ve biyoyararlanılabilirlikleri polifenolün türüne ve metabolizma yoluna bağlı olarak değişebilir. Polifenollerin biyoaktiflikleri hala aktif bir araştırma alanıdır ve tam olarak anlaşılmamıştır. Ancak polifenollerin biyoyararlanılabilirliklerini ve biyolojik etkilerini değerlendirmek için in vitro ve

in vivo çalışmalar yapılır. Bu çalışmalar, polifenollerin sağlık üzerindeki potansiyel etkilerini daha iyi anlamamıza ve polifenollerin kullanımını optimize etmemize yardımcı olmaktadır.

### **2.8.2 Polifenollerin Oksidatif Stres Üzerindeki Etkileri**

#### **2.8.3 Polifenollerin Antioksidan Özellikleri**

Polifenoller antioksidan özelliklere sahip doğal bileşiklerdir. Aşırı serbest radikal üretimi dokusal hasara ve inflamatuvar süreçlere yol açabilir (261). Polifenollerin antioksidan aktivitesi fonksiyonel gruplarının yapısına bağlıdır. Hidroksil gruplarının sayısı, radikalleri temizleme ve metal iyonlarını şelatlama gibi birçok antioksidan aktivite mekanizmasını etkiler (262). Polifenollerin antioksidan aktiviteleri, geniş bir serbest radikal yelpazesini temizleme yetenekleriyle ilişkilidir. Bu polifenollerin antioksidan kapasitesine etki eden çeşitli mekanizmaları içerir. Bu mekanizmalar arasında radikallerin üretiminden kaynaklanan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunun baskılanması, ROS'un temizlenmesi veya antioksidan savunmanın artırılması veya korunması gibi süreçler bulunmaktadır (263).

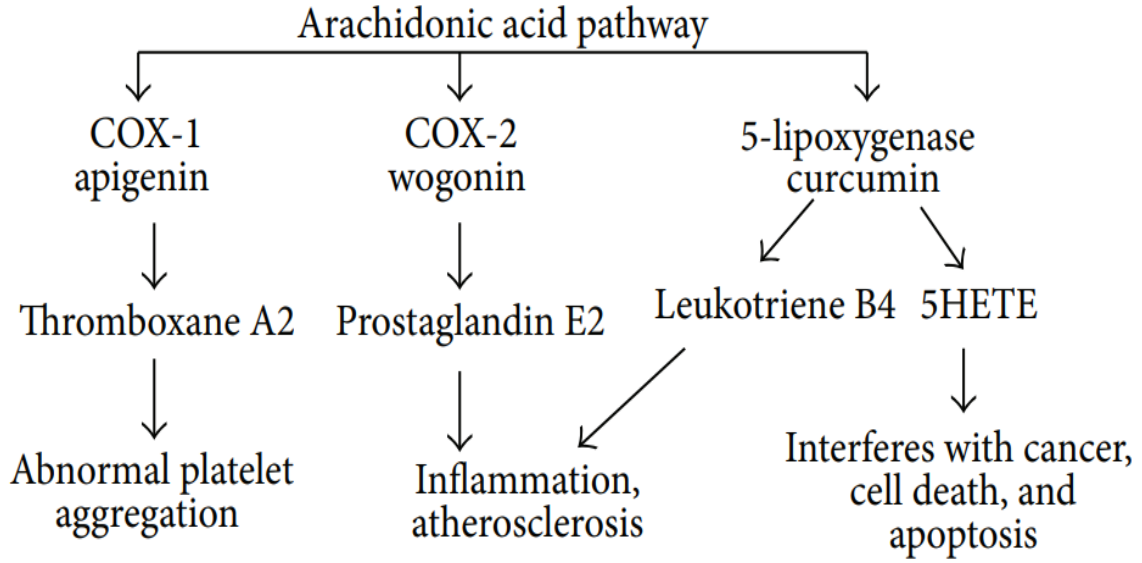
Polifenoller ROS oluşumuna katılan enzimlerin katalitik aktivitesini azaltabilir. Polifenoller çeşitli mekanizmalar aracılığıyla oksidatif hasara karşı koruma sağlayabilir (264). ROS oluşumu, hidrojen peroksit indirgeme yoluyla yüksek reaktif hidroksil radikali üretimiyle serbest metal iyonlarını artırabilir. Polifenollerin daha düşük redoks potansiyelleri, metal iyonlarını (Demir, Bakır) ve serbest radikalleri şelatlayabilme kapasiteleri nedeniyle, termodinamik olarak yüksek oksidatif serbest radikalleri indirgeyebilir (265).

#### **2.8.4 Serbest Radikallerin Polifenollerle Etkileşimi**

Polifenoller, hücre zarının hidrofobik iç tabakasında bulunan polar olmayan bileşiklerle plazma zarında tepkimeye girebilir. Bu değişiklikler, lipid veya proteinlerin oksidasyon hızını etkiler. Bazı flavonoidler, zarın hidrofobik çekirdeğinde oksidanların erişimini engelleyebilir ve zarın yapısını ve işlevini koruyarak hücre zarının bütünlüğünü sürdürebilir (266). Bu süreçler, hücresel etkileşim ve sinyal iletimi dahil olmak üzere polifenollerin temel etki mekanizmalarını anlamaya yardımcı olur. Polifenollerin nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesi ile etkileşimi NO üretimini modüle edebilir. Ksantin oksidaz (XO), serbest radikallerin ana kaynağı olarak kabul edilir. Quersetin, silibin ve luteolin gibi bazı flavonoidlerin bu aktiviteyi inhibe ettiği gösterilmiştir. Flavonoidler ayrıca peroksidaz aktivitesini azaltabilir, nötrofillerin serbest radikal salınımını ve bu hücrelerin alfa1-antitripsin tarafından aktive edilmesini inhibe edebilir (267).

### 2.8.5 Oksidasyona Dahil Olan Enzimlerin İnhibisyonu

Farklı polifenollerin siklooksijenaz (COX), lipooksijenaz (LOX) ve NOS gibi araşidonik asit metabolizan enzimlerinin aktivitesini modüle ettiğini gösteren çeşitli araştırmalar yapılmıştır (268). Bu enzimlerin inhibisyonu inflamasyonun temel aracı olan AA, prostaglandinler, lökotrienler ve NO üretimini azaltır. İnflamasyonun araşidonik asit yolunun mekanizması Şekil 2.14'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.14** İnflamatuvar hastalıklara yol açan araşidonik asit metabolizmasında yer alan metabolik yollar (268).

Bakteriyel endotoksinler ve inflamatuvar sitokinler makrofajları uyarabilir ve buna bağlı olarak artmış iNOS ekspresyonu ve NO üretimi ile oksidatif hasara neden olabilir. Polifenoller kültüre edilen makrofajlarda LPS'ye bağlı iNOS gen ekspresyonunu ve ilişkili aktivitesini inhibe edip oksidatif hasarı azaltabilir (269). COX ve LOX, araşidonik asidin oksijenlenmesi yoluyla prostaglandin ve lökotrien gibi inflamatuvar mediatörlerin sentezinden sorumlu enzimlerdir. Bu enzimler, inflamasyon süreçlerinde rol oynayan ve doku hasarına yol açabilen metabolitleri üretebilirler (270). Dokularda oksidatif hasar özellikle XO (ksantin oksidaz) yoluyla üretilen metabolitlerin etkisiyle daha da artabilir. İskemi durumlarında ksantin dehidrojenaz (XDH) aktivitesi XO aktivitesine dönüşebilir ve böylece reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışına neden olur. Polifenollerin, oksidatif hasarı azalttığı bildirilen bir mekanizma olarak XO aktivitesini düşürme yetenekleri bulunmaktadır (271).

Polifenoller antioksidan özellikleri sayesinde serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltmada etkin rol oynar. Bu bileşikler oksidatif stresi azaltarak hücrelerin korunmasına ve sağlıklarının

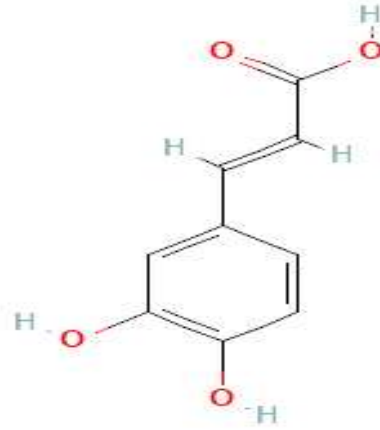
sürdürülmesine yardımcı olurlar. Polifenoller serbest radikalleri nötralize ederek oksidatif hasarı önler ve antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak antioksidan savunmayı destekler. Ayrıca polifenoller hücrelerde oksidatif stresle ilişkili enflamasyon süreçlerini modüle edebilir. Oksidatif stresin neden olduğu enflamasyon birçok hastalığın altında yatan mekanizmalardan biridir. Polifenoller anti-inflamatuar etkileriyle enflamasyonu azaltarak hücresel sağlığı ve dokuların korunmasını desteklemektedir.

Polifenollerin oksidatif stres üzerindeki etkileri birçok araştırma ile desteklenmektedir. Bu bileşiklerin antioksidan özellikleri, kanser, kalp hastalıkları, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar gibi oksidatif stresin rol oynadığı birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde potansiyel bir strateji olarak araştırılmaktadır. Kafeik asit hidroksisinamik asitler adı verilen bir grup polifenolün bir üyesidir. Hidroksisinamik asitler fenolik asitlerin bir alt grubunu temsil eder. Kafeik asit doğal olarak birçok bitkide bulunan ve özellikle kahve, çay, meyveler (elma ve armut), sebzeler (marul ve brokoli) ve tahıllarda bulunan bir bileşiktir.

Kafeik asit güçlü bir antioksidan olarak kabul edilir ve serbest radikallerle etkileşerek oksidatif stresin azaltılmasına yardımcı olur. Ayrıca anti-inflamatuar etkileri sayesinde iltihaplanma süreçlerini baskılayabilir. Kafeik asidin bazı araştırmalarda kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği ve anti-kanser etkileri olduğu gösterilmiştir. Hidroksisinamik asitler özellikle klorojenik asit antioksidan özellikleriyle bilinir. Klorojenik asit çeşitli besinlerde bulunan ve genellikle yüksek miktarda tüketilen bir polifenoldür. Antioksidan etkilerinin yanı sıra klorojenik asit anti-inflamatuar, antikanser ve kardiyoprotektif gibi diğer potansiyel sağlık faydaları da göstermektedir. Araştırmalar klorojenik asidin antioksidan etkilerinin yanı sıra kan basıncını düşürme, kan şekerini düzenleme, kolesterol seviyelerini kontrol etme ve kilo verme gibi olumlu etkileri olabileceğini göstermektedir.

## **2.9 Kafeik asit (3,4-dihidroksi-sinnamik asit)**

Hidroksisinamik asitler, genellikle gıdalarda klorojenik asit olarak adlandırılan bir kinik asit esteri şeklinde bulunan büyük bir kimyasal grup olan polifenollerin önemli bir temsilcisidir. Polifenoller, organik bileşiklerdir ve bu sınıfın bireysel üyeleri, çeşitli fenol yapısal birimlerin varlığıyla karakterize edilir. Bu büyük yapısal çeşitlilik, polifenollerin benzersiz fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini belirler ve aynı zamanda biyoyararlanımlarını etkileyen önemli bir faktördür (272). Polifenoller çoğunlukla güçlü antioksidan özellikleriyle bilinirler.



**Şekil 2.15** Kafeik asidin kimyasal yapısı (272)

Kafeik asidin antioksidan özellikleri kimyasal yapısındaki antioksidan özelliklere atfedilir. Aromatik halkasında bulunan iki hidroksil grubu kafeik asidin antioksidan etkisini sağlar (Şekil 2.15). Bu hidroksil grupları kafeik asidin hidrojen atomlarını bağışlamasına ve oluşan fenoksil radikallerini stabilize etmesine olanak tanır. Ayrıca karbon zincirindeki çift bağ (doymamış yan zincirde 2,3 çift bağı) fenoksil radikalının stabilitesini artırır. Kafeik asidin iki değerlikli metallerle şelat oluşturma yeteneği olduğu ileri sürülmüştür. Bu özelliği sayesinde kafeik asit oksidasyon reaksiyonlarında katalizör olarak veya reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna katkıda bulunan enzimlerin kofaktörleri olarak işlev görebilir. Ayrıca kafeik asidin antienflamatuar ve immün düzenleyici yanıtlarda gen ekspresyonunu modüle edebilen özellikleri vardır (273).

Kafeik asit molekülü ile ilişkili kimyasal faktörler, serbest radikallerin etkilerini azaltarak ROS oluşumunu engelleyebilir ve bu sayede insan vücudu üzerinde olumlu etkilere katkıda bulunabilir. Bu etkiler, çeşitli hastalık türlerinin önlenmesine yardımcı olabilir. Kafeik asit, Aβ proteinlerinin üretimini baskılayarak ve adenosin reseptör antagonizması yoluyla nöronları eksitotoksisiteden koruyarak oksidatif stresi azaltabilir. Ayrıca Parkinson hastalığında, striatal dopamin seviyelerinin ve dopamin taşıyıcı bağlanma bölgelerinin kaybını azaltma konusunda aktif bir rol oynayabilir.

### **2.9.1 Gıdalarda kafeik asit varlığı**

Kafeik asit doğal olarak çeşitli yiyeceklerde, içeceklerde, kuruyemişlerde, bitkilerde, sebzelerde, meyvelerde ve yağlarda bulunur. Bu bileşik bitkilerde doğal olarak sentezlenir ve

ayrıca kahvedeki klorojenik asitlerin veya üzümdeki kaftarik asidin metabolizasyonu sonucunda serbest kalır (274).

Kafeik Asit İçeren Bazı Yiyecekler: Kahve, Yeşil çay, Çay, Elma, Armut, Kiraz Vişne, Ahududu, Yaban mersini, Çilek Zeytin, Fındık, Badem, Yulaf, Kepekli tahıllar. Bu yiyecekler kafeik asit içermektedir, ancak miktarları yiyeceğin türüne, çeşidine ve işlenme yöntemine bağlı olarak değişebilir.

**Tablo 2.7** Kafeik asit içeren bazı yiyeceklerin örnekleri (275)

| <b>Food type</b>                 | <b>Mean content</b>  |
|----------------------------------|----------------------|
| <b>Fruits and fruit products</b> |                      |
| Plum, prune                      | 1.11 mg/100 g FW     |
| Date, dried                      | 2.52 mg/100 g FW     |
| American cranberry               | 2.31 mg/100 g FW     |
| Black chokeberry                 | 141.14 mg/100 g FW   |
| Cloudberry                       | 1.00 mg/100 g FW     |
| Lingonberry, raw                 | 6.34 mg/100 g FW     |
| Grapefruit                       | 2.00e-03 mg/100 g FW |
| Peach, peeled                    | 0.63 mg/100 g FW     |
| Date, fresh                      | 3.37 mg/100 g FW     |
| Apple (Dessert), whole, raw      | 0.33 mg/100 g FW     |
| Pear, peeled                     | 0.14 mg/100 g FW     |
| <b>Vegetables</b>                |                      |
| Cauliflower, raw                 | 1.00e-02 mg/100 g FW |
| Eggplant (Purple), whole, raw    | 0.38 mg/100 g FW     |
| Olive (Black), raw               | 2.10 mg/100 g FW     |
| Olive (Green), raw               | 1.33 mg/100 g FW     |
| Tomato, whole, raw               | 0.45 mg/100 g FW     |
| Carrot, raw                      | 0.02 mg/100 g FW     |
| Potato, raw                      | 1.62 mg/100 g FW     |
| <b>Alcoholic beverages</b>       |                      |
| Beer (Alcohol free)              | 0.01 mg/100 ml       |
| Beer (Dark)                      | 0.03 mg/100 ml       |
| Beer (Regular)                   | 0.03 mg/100 ml       |
| Wine (Red)                       | 1.88 mg/100 ml       |
| Wine (Rosé)                      | 0.33 mg/100 ml       |
| Wine (White)                     | 0.24 mg/100 ml       |
| <b>Non-alcoholic beverages</b>   |                      |
| Coffee beverage (Filter)         | 0.03 mg/100 ml       |

|                                    |                      |
|------------------------------------|----------------------|
| Olive, oil, virgin                 | 0.02 mg/100 g FW     |
| Soy, oil                           | 8.00e-04 mg/100 g FW |
| <b>Seeds and Nuts</b>              |                      |
| Walnut, dehulled                   | 0.24 mg/100 g FW     |
| Sunflower seed, meal               | 8.17 mg/100 g FW     |
| <b>Cereals and cereal products</b> |                      |
| Bread, rye, whole grain flour      | 0.77 mg/100 g FW     |
| Common wheat, whole grain flour    | 0.04 mg/100 g FW     |
| Maize, refined flour               | 0.04 mg/100 g FW     |
| Oat, refined flour                 | 0.04 mg/100 g FW     |
| Oat, whole grain flour             | 0.16 mg/100 g FW     |
| Rice, parboiled                    | 0.34 mg/100 g FW     |
| Rice, whole grain                  | 0.05 mg/100 g FW     |
| Rye, whole grain flour             | 0.20 mg/100 g FW     |
| <b>Seasonings (herbs, spices)</b>  |                      |
| Common sage, dried                 | 26.40 mg/100 g FW    |
| Common sage, fresh                 | 7.42 mg/100 g FW     |
| Common thyme, dried                | 21.28 mg/100 g FW    |
| Common thyme, fresh                | 11.70 mg/100 g FW    |
| Italian oregano, fresh             | 10.40 mg/100 g FW    |
| Marjoram, dried                    | 1.90 mg/100 g FW     |
| Oregano, dried (wild marjoram)     | 10.70 mg/100 g FW    |
| Rosemary, dried                    | 9.67 mg/100 g FW     |
| Rosemary, fresh                    | 2.08 mg/100 g FW     |
| Spearmint, dried                   | 25.00 mg/100 g FW    |
| Welsh onion, fresh                 | 0.02 mg/100 g FW     |
| Vinegar                            | 0.28 mg/100 ml       |
| Caraway                            | 16.40 mg/100 g FW    |
| Ceylan cinnamon                    | 24.20 mg/100 g FW    |
| Cumin                              | 16.60 mg/100 g FW    |
| Ginger, dried                      | 15.50 mg/100 g FW    |
| Nutmeg                             | 16.30 mg/100 g FW    |
| Star anise                         | 20.20 mg/100 g FW    |

Kafeik asidin uygun dozu konusunda kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Ancak, bazı bilim insanları insanlar için toplam sinamat miktarının neredeyse sıfır ila 1 gram arasında yeterli olduğu konusunda hemfikirdir (275).

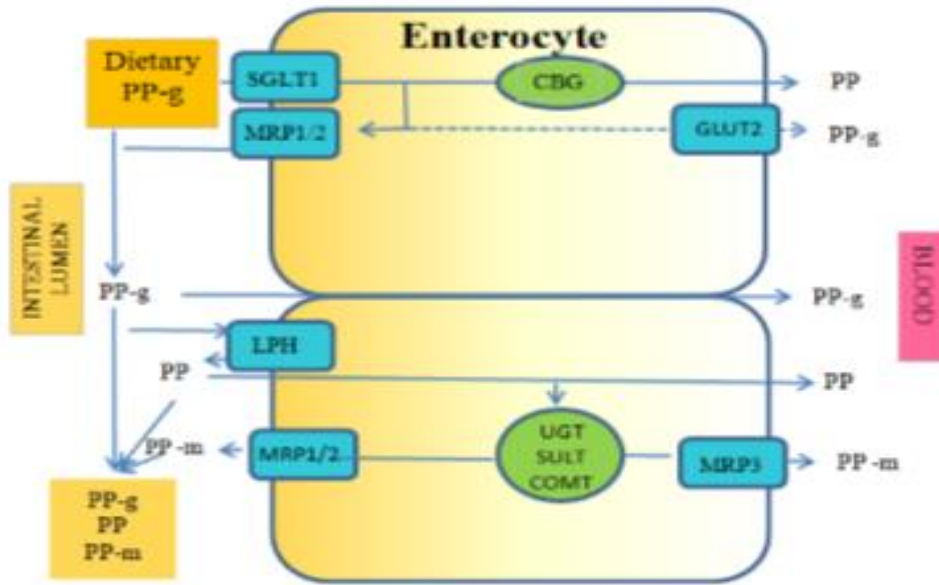
## 2.9.2 Kafeik asidin metabolizması

Klorojenik asidin hidrolizi, bağırsakta bulunan esteraz enzimleri tarafından kafeik asit üretimini gerçekleştiren önemli bir metabolik aşamadır. Klorojenik asidin hidrolizi, bağırsak mukozası tarafından emilip metabolize edilen kafeik asidin oluşumuna neden olur. Kafeik asit emilimi genellikle gıdalarda ester formunda bulunan ve emilimi zor olan bir bileşik olduğundan bu formda bulunur. Kafeik asidin emilimi  $95 \pm 4$  oranında gerçekleşir. İnsan metabolizmasında kafeik asidin emilimi mideye geçtiği anda pasif olarak başlar. Kolon bölgesindeki mikrobiyal esteraz enzimlerinin etkisiyle kafeik asit serbest formda parçalanır ve bağırsak mukozası

tarafından emilir. Aktif taşıma yoluyla monokarboksilik asit taşıyıcılarının etkisiyle kafeik asit bağırsak hücrelerinin zarlarından taşınır.

Besin alımından bir saat sonra kafeik asidin plazma konsantrasyonu hızla düşer. Kafeik asit, absorpsiyondan hemen sonra metilasyon, sülfasyon ve glukuronidasyon gibi detoksifikasyon işlemleriyle daha hidrofilik bir hale getirilir. Bu süreç, kafeik asidin toksisitesini azaltır ve atılımını kolaylaştırır. İnce bağırsağın salgıladığı feruloilkinik asitlerin hidrolizi sonucu kafeik asit ve ferulik asidin metabolizması gerçekleşir. Kafeik asitin 3- ve 4-O-sülfatlarına metabolizması izoferulik asit ve bunun ardından 3-O-sülfasyon ve glukuronidasyon reaksiyonlarıyla gerçekleşir. Kolon bölgesi, muhtemelen kafeik asidin dihidro-izoferulik aside metabolize olduğu yerdir. Kafeik asit genellikle idrar yoluyla atılır ve idrarla atılım miktarı %5,9 ile 27 arasında değişir (253,276).

**Şekil 2.16** Fenolik bileşiklerin emilim ve metabolizasyonun varsayılan mekanizması (253,276).



**Şekil 2.16** PP- polifenol aglikon, PP-g polifenol glikozit, PP-m polifenol sülfat/glukuronid/metil metabolitleri, SGLT1 sodyuma bağlı glikoz taşıyıcı 1, GLUT2- glikoz taşıyıcı 2, LPH- laktaz florizin hidrolaz, MRP1-2-3- çoklu ilaca dirençli proteinler, CBG- sitozolik  $\beta$ -glukosidaz, COMT- katekol-O-metil transferaz, SULT- sülfotransferaz, UGT- üridin-5'- difosfat glukuronosiltransferaz.

### 2.9.3 Kafeik asidin biyoaktivitesi

Kafeik asidin iddia edilen birçok sağlık faydası arasında antiinflamatuvar, antikanser ve antiviral özellikler bulunmaktadır. Ayrıca, kafeik asit vücutta serbest radikallerin neden olduğu oksidatif

stresi azaltabilen bir antioksidandır. Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi ile antioksidan savunma arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır. Bu dengesizlik genellikle kanser, ateroskleroz, kardiyovasküler hastalıklar, majör depresyon, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı ve diğer insan hastalıklarının gelişimine veya ilerlemesine katkıda bulunabilir (277).

Kafeik asidin, düşük yoğunluklu lipoproteinlerdeki (LDL) alfa-tokoferol üzerinde koruyucu etkisinin daha önce gösterildiği bildirilmiştir (278). Ayrıca, kafeik asidin klorojenik asit ve kaftarik asit gibi diğer bileşiklerle kombinasyonunun, in vitro ve in vivo olarak çeşitli sistemlerde daha güçlü antioksidan aktivite sergilediği ve klorojenik asidin iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (279,280). Kafeik asitler, cilt bakım ürünlerinde antioksidan aktiviteleri nedeniyle kullanılmış ve aynı zamanda umut verici fotokoruyucu ajanlar olarak değerlendirilmiştir. Ancak, literatürde hidroksisinnamik asitlerin cildi foto-oksidatif hasardan korumada ne kadar etkili olduğuna dair sınırlı kanıtlar bulunmaktadır.

Kafeik asit içeren gıdaların tüketiminin, antioksidan ve pro-oksidan özelliklerinden dolayı kanserojeneze karşı koruma sağladığı gösterilmiştir. Kafeik asit, oksidatif DNA hasarı ile ilişkilendirilen kanser hücrelerinde pro-oksidatif özellikler sergileyerek apoptozis (programlanmış hücre ölümü) ile kanser hücrelerinin ölümünü indükler. Bu antikanser etki Kanimozhi ve Prasad tarafından yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Kafeik asit kullanımının HeLa ve ME-180 kanser hücre hatlarında lipid peroksidasyonu (hücre zarının oksidatif hasar görmesi) belirteçlerini artırdığı, kafeik asit ile tedavi edilen kanser hücre hatlarında artan apoptotik (programlanmış) morfolojik değişikliklerin gözlemlendiği bildirilmiştir. Ayrıca yüksek düzeyde reaktif oksijen türleri ve değiştirilmiş mitokondriyal membran potansiyeli tespit edilmiştir (281).

Kabała-Dzik ve arkadaşları yürüttüğü bir çalışmada, üçlü negatif MDA-MB-231 meme adenokarsinom hücre hattında kafeik asit ve kafeik asit fenetil esterinin (50 ve 100  $\mu$ M dozlarda) sitotoksik aktivite ve migrasyon hızı inhibisyonunu karşılaştırmıştır. Çalışmaları, her iki bileşiğin göğüs kanseri MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyon hızını azalttığını ve kafeik asit fenetil esterinin tedavisinin daha iyi sonuçlar verdiğini doğrulamıştır (282). Kafeik asit fenetil esterinin meme kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği doğrudan rapor edilmiştir. Ayrıca, kafeik asidin oral karsinom SCC-25 hücreleri ve baş-boyun skuamöz karsinom hücrelerinin canlılığını ve göç sürecini inhibe ettiği gösterilmiştir (283,284).

Rosendahl ve arkadaşlarının çalışmalarına göre, kafeik asit ve kafein özellikle MCF-7, T47D ve MDA-MB-231 göğüs kanseri hücrelerinde test edilmiştir. Yapılan çalışmalar, kafeik asidin meme kanseri hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve hücre döngüsü ilerlemesini etkilediğini göstermiştir. Kafeik asidin en güçlü etkisinin östrojen-pozitif MCF-7 hücrelerinde (MCF-7 hücreleri) gözlemlendiği belirtilmiştir (285). Kafeik asidin hepatokarsinoma karşı pozitif etkisi yapılan çalışmalarda gözlenmiştir. Bu bileşiğin aşırı reaktif oksijen türleri oluşumunu önlediği, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) kaynaklı vaskülarizasyonu azaltarak ve matris metaloproteinaz 2 (MMP-2) ve MMP-9'u baskılayarak tümör hücrelerinin DNA oksidasyonu ve anjiyogenez yoluyla ölümünü desteklediği belirtilmiştir (286). Takeda ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, Kafeik asidin 4 mg/kg dozunda kullanıldığında antidepresan etkileri tespit edilmiştir (287). Lee ve arkadaşları aynı şekilde propolisin ana bileşeni olan kafeik asit fenetil esterinin antidepresan etkilerini rapor etmişlerdir (288).

Kafeik asit, diğer antioksidanlar gibi cilt elastikiyetini iyileştirerek yaşlanmayı etkileyebilir ve kırışıklıklara karşı olumlu bir etki sağlayabilir. Ayrıca, kafeik asidin güçlü antioksidan aktivitesi, kollajen üretimini artırarak erken yaşlanmayı önlemesine ek olarak antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu da göstermektedir. Bu özellikleri, cilt hastalıklarının tedavisinde umut verici bir madde haline getirmesini sağlamaktadır (289). Ayrıca, kafeik asidin kırışıklık önleyici aktiviteye sahip olduğu in vivo olarak gösterilmiştir. (290).

Bastianini ve arkadaşları yaptığı çalışmada, kafeik asidin kozmetik uygulamalar için umut verici bir hammadde olduğunu bildirmişlerdir. Kafeik asidin, daha yüksek biyoyararlanımı ve uzun süreli antioksidan aktivitesi nedeniyle anyonik kil içinde başarılı bir şekilde taşındığı belirtilmiştir (291). Chao ve arkadaşları, kafeik asit ve ellagik asidin antienflamatuar özelliklerini incelemişlerdir. Çalışmalarında, bu bileşiklerin diyabetik farelerde dislipidemi, hiperpıhtılaşma, oksidatif stres ve iltihaplanmaya karşı kalp koruyucu etkileri olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, kafeik asit ve ellagik asidin diyabetik farelerde lipid metabolizmasını ve glisemik kontrolü iyileştirdiği gözlemlenmiştir (292).

Hsu ve arkadaşları, kafeik asidin antihiperglisemik etkisini incelemişlerdir. Streptozotosin kaynaklı ve insüline dirençli iki sıçan modelinde yapılan çalışmalarda, kafeik asidin plazma glukoz seviyelerinde doza bağımlı bir düşüşe neden olduğu ve insüline dirençli sıçanlarda plazma glukoz artışını azalttığı gösterilmiştir. Kafeik asidin glukoz kullanımını artırarak plazma glukoz düzeylerinin düşmesine katkıda bulunduğunu göstermişlerdir (293).

Doğal olarak oluşan bileşiklerin tüketimi veya takviye edilmesinin, birçok hastalığın önlenmesine yardımcı olabileceği gösterilmiştir. Kafeik asit gibi biyoaktif bileşiklere olan ilgi, pozitif antioksidan özelliklerinin kanser, inflamasyon, diyabet ve Alzheimer hastalığı gibi hastalıkların tedavisinde veya önlenmesinde rol oynayabileceği nedeniyle artmaktadır. Ayrıca, kafeik asidin kırılganlıkları önleme özelliklerine sahip olduğundan, yeni kozmetik ürünlerinin üretiminde de faydalı olabilir. Ancak bu maddenin insanlardaki etkinliğini tam olarak anlamak için daha fazla çalışma gerekmektedir. Ayrıca, kafeik asidin uygun uygulama şekli ve dozunu belirlemek için yapılan çalışmaların önemi büyüktür. Bu tür çalışmalar, kafeik asidin sağlık üzerindeki etkilerini daha iyi anlamamıza ve potansiyel kullanım alanlarını belirlememize yardımcı olacaktır.



### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışma kapsamında kullanılan başlıca cihazlar ve sarf malzemeler ilgili tablolarda listelenmiştir (Tablo 3. 1 ve Tablo 3. 2).

**Tablo 3.1** Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları.

| Adı/Modeli                                                             | Çalışmada Kullanım Amacı                                                         |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Güvenlik Kabini<br>(Biosafety Cabinet Class II Güvenlik Kabini)        | Hücre kültürü çalışmalarında steril ortamın sağlanması                           |
| Etüv (MMM Medcenter Einrichtungen GmbH Ecocell)                        | Gereken tüm malzemelerin istenen sıcaklığa getirilmesi                           |
| İnkübatör (Thermo Scientific Heracell 150i CO <sub>2</sub> )           | Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin inkübasyonu için kullanıldı              |
| Floresan Invert Mikroskop<br>(Axio Vert.A1 Mikroskop (ZEISS))          | Hücrelerin kontrolü için kullanıldı                                              |
| Plak Okuyucu (Thermo Scientific Multiskan FC)                          | 96 kuyulu plakların absorbanlarının okunması, MTT sonuçlarının değerlendirilmesi |
| Mikro Plak Yıkayıcı (Thermo Scientific Wellwash)                       | Biyokimyasal analizlerin çalışılmasında kullanıldı                               |
| EVE Otomatik Hücre Sayacı(Nanoentek),                                  | Hücre sayımı                                                                     |
| Santrifüj (Hettich Universal 320r)                                     | Çöktürmenin gerekli olduğu tüm denemelerde                                       |
| Olympus CX31 Upright Mikroskop                                         | Hücrelerin kontrolü için kullanıldı                                              |
| Olympus CX41 Upright Mikroskop                                         | Hücrelerin kontrolü için kullanıldı                                              |
| Pipet Pompası (Brand Accu-Jet® Pro)                                    | Çözelti hazırlanması                                                             |
| Pipetler (0,5-2 Ml, 0,5-100 Ml, 50-200 Ml, 200-1000 Ml, 1-5 Ml Gilson) | Çözeltilerin hazırlanması                                                        |
| Hassas Terazi (AND HR-250AZ Marka (0,0001 G'a Duyarlı))                | Çözeltilerin hazırlanması için gerekli tartımın alınması                         |
| Vorteks (Velp Scientifica Classic Vortex Mixer)                        | Çözeltilerin homojen karışımlarının hazırlanması                                 |

|                                                  |                                        |
|--------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Manyetik Isıtıcı Karıştırıcı (Velp Scientifica)  | Çözünme işlemini hızlandırmak          |
| Buzdolabı (±4°C Arçelik)                         | Kimyasalların ve örneklerin saklanması |
| Derin Dondurucu (-20°C Arçelik)                  | Hücrelerin kısa süre saklanması        |
| Derin Dondurucu (-80°C New Brunswick Scientific) | Hücrelerin uzun süre saklanması        |

**Tablo 3.2** Kullanılan sarf malzemeler ve kullanım amaçları

|                                                         |                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kafeik Asit                                             | Hücrelerde etkisi araştırılan molekül                                                               |
| Memantin                                                | Hücrelerde etkisi araştırılan molekül                                                               |
| Glioblastoma U-118 MG                                   | Tüm denemelerde kullanılan Glioblastoma (U-118 MG) hücre serisi                                     |
| Dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck)                        | Hücrelerin dondurma ortamının hazırlanması, çözeltilerin hazırlanmasında çözücü olarak kullanılması |
| Dulbecco modified Eagle Medium (DMEM-Gibco)             | U-118 MG hücrelerin büyüme ortamı                                                                   |
| Tripsin (Merck)                                         | Pasaj ve ekimlerde hücrelerinin büyüme ortamı                                                       |
| Penisilin/Streptomisin (Gibco)                          | Hücrelerin büyüme ortamı bileşeni                                                                   |
| L-Glutamin (Hyclone)                                    | Hücrelerin büyüme ortamı bileşeni                                                                   |
| Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco)                        | Hücrelerin büyüme ortamı bileşeni                                                                   |
| Etanol (Delta)                                          | Yıkama işlemlerinde                                                                                 |
| Tripan Mavisi (%0,5) (Biological Industries)            | Hücre sayımında, Canlı ve ölü hücrelerin ayırt edilebilmesi                                         |
| Hidrojen Peroksit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Merck) | Hücrelerde toksisite oluşturmak                                                                     |
| Cell Proliferation kit (XTT) (Sartorius)                | Hücre canlılığı aktivitesini değerlendirmek                                                         |

### 3.1.2 Hücre Kültürü Uygulamaları

Hücre kültürü çalışmaları denemelerinde kullanılmak üzere Glioblastoma (U-118 MG) hücreleri kullanılmıştır. Hücre kültürü uygulamaları U-118 MG hücrelerinin çoğaltılmasını, dondurulmasını, çözülmesini ve sayılarak istenen flask ya da platelere ekilmesini kapsamaktadır.

## 3.2 Metot

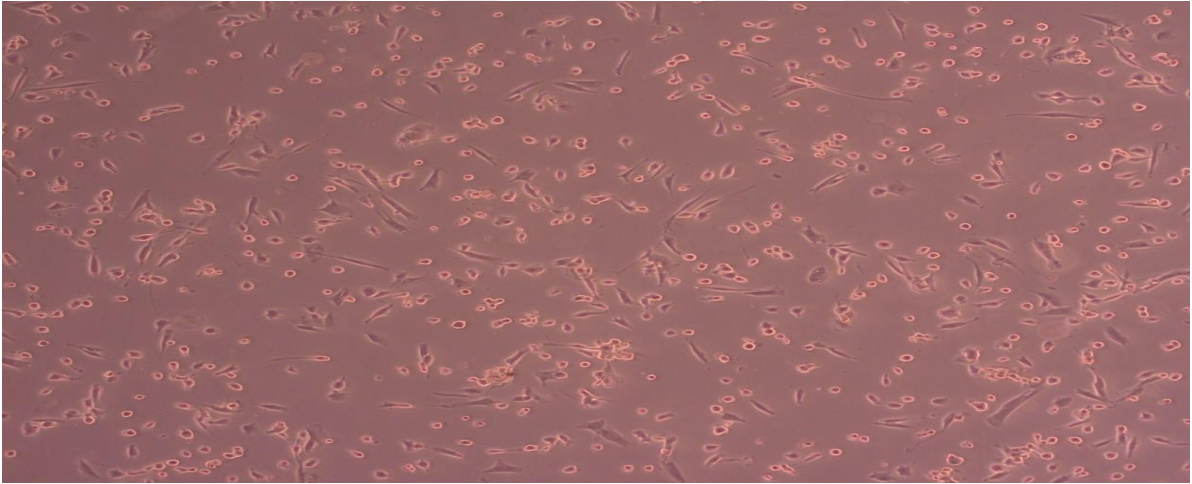
### 3.2.1 Glioblastoma hücre serisi

Biz çalışmamızda memantin ve kafeik asidin ayrı ayrı ve birlikte nöroprotektif aktivitesini incelemek için U-118 MG hücrelerini kullandık. Çalışmamızda U-118 MG hücre hattını seçmemizin birkaç nedeni vardır. Çalışmamızda deneysel seri sayısının fazla olması nedeniyle çok sayıda hücreye ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak oksidatif stres gibi hücre ölümünün yüksek olduğu modellerde birincil nöron hücrelerinin sayısı yeterli değildir. Bu nedenle, çok sayıda

hücreye ihtiyaç duyulduğundan, oksidatif stres içeren çalışmalarda gliablastoma hücre hatları kullanılmaktadır ve bu hücreleri kullanan literatürde çalışmalar mevcuttur (294,295,296).

Kaynağı: U-118 MG hücre hattı (50 yaşında Kafkaslı bir erkek beyni), J. Ponten ve arkadaşları tarafından 1966'dan 1969'a kadar malign gliomalardan türetilen bir dizi hücre serisinden üretilmiştir.

Özellikleri: Dondurularak -80 derecelik dondurucuda saklanmış U-118MG hücre serisi yüksek glikozlu Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle Medium (DMEM) ortamında (DMEM-Gibco) %5 CO<sub>2</sub>'lik nemli bir atmosferde %1 L-glutamin ve %10 Fetal Bovine Serum (FBS-Gibco) ve %1 penicillin-streptomycin (pen-strep) ile desteklenerek 37°C'de tutulmuştur (297). Hücreler her gün inverted mikroskop ile kontrol edildi ve yaklaşık %70-75 yoğunluğa ulaştıklarında seyreltilerek pasajlar yapıldı.



**Fotoğraf 3.1.** U-118 MG Hücre hattı invert mikroskop görüntüsü.

### 3.2.2 Hücrelerin Pasajlanması

- İlk kez çözülen hücreler 25cm<sup>2</sup> flasklara 8 mL DMEM besi ortamı içerisine ekildi.
- Hücreler %80-85 yoğunluğa (confluent) ulaştıktan sonra 75cm<sup>2</sup> flasklara 15 mL büyüme ortamı içerisinde pasajlandı ve bu flasklarda çoğaltıldı.
- Hücrelerin medyumları iki günde bir yeni medyum ile değiştirildi.
- Deneysel aşamaların tamamı 96 kuyucuklu platelerde gerçekleştirildi.
- Hücreler %80-85 yoğunluğa ulaştıklarında 1:2 ya da 1:4 oranında seyreltilerek pasajlandı.

### 3.2.3 Hücrelerin Toplanması ve Dondurulması

- Flasklardaki büyüme ortamı uzaklaştırıldı.

- Flasklar PBS ile yıkandı.
- Flasklara 25 cm<sup>2</sup> flask için 1-2 mL, 75cm<sup>2</sup> flask için 3-5 mL önceden 37 °C ye ısıtılmış tripsin/ EDTA ilave edildi.
- Flasklar 4-5 dakika 37°C sıcaklıkta inkübatöre bırakıldı.
- Flask yüzeyinden ayrılan hücreler 15 mLlik tüplere toplandı.
- Tüplere 5'er mL büyüme ortamı olarak medyum ilave edildi.
- Pellet istenen miktarda, önceden 37°C de inkübe edilmiş büyüme ortamı içerisine eklendi.
- Hücre süspansiyonu sayıldı, seyreltilerek flasklara ya da plaklara pasajlanabilir duruma getirildi.
- Dondurulacak hücre süspansiyonuna 1:1 oranında soğuk %95 FBS %5 DMSO ilave edildi.
- Bu şekilde tüpteki son konsantrasyonlar: %40 FBS, %10 DMSO ve %50 büyüme ortamı bulunmaktadır.
- Elde edilen süspansiyon cryo tüplere paylaştırılarak aşamalı olarak donduruldu ve -20°C'ye kaldırıldı.
- -20°C'de bir saat bekletildikten sonra cryo tüpler 3-4 hafta içerisinde çözülecekse -80°C'ye, uzun süre saklanacaksa sıvı nitrojene kaldırılır.

### 3.2.4 Hücrelerin Çözülmesi

- Sıvı nitrojende muhafaza edilen hücreler gerektiğinde çözülerek kullanıldı.
- Sıvı nitrojen ya da -80°C'den alınan cryo tüpler hızla 37°C'de çözüldü.
- 4°C'nin üzerindeki DMSO hücrelere toksik etki gösterdiğinden dolayı 37°C'de hücreleri çözdürürken hızlı bir şekilde çalışıldı.
- Tüp içerisindeki süspansiyon 15 mL'lik tüplere aktarıldı ve üzerine 10 mL önceden 37°C'de inkübe edilen büyüme ortamı ilave edildi.
- Tüp 1500 rpm de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant kısım atıldı.
- Pelet 7 mL büyüme ortamında süspanse edildi ve 2 adet 25cm<sup>2</sup> flasklara paylaştırıldı.
- Flasklar, 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren etüve alınarak inkübasyona bırakıldı.

### 3.2.5 Hücrelerin Sayılması

Yapılacak tüm denemelerde belirli sayıda hücrenin flasklara ekilmesi için hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Yöntemin prensibi, membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin Tripan mavisi boyasını hücre içine almaları

ve ölü hücre olarak değerlendirilmeleri veya membran bütünlüğünü koruyan hücrelerin ise membrandan boya geçişine izin vermemelerine dayanmaktadır (298).

Canlı hücreler mitokondri organelinde enerji üretimi yapabildiklerinden dolayı hücre membranından giren boya maddesini aktif taşımayla hücre dışına çıkartarak, renksiz görülür ve ölü hücreler mitokondri organelinde metabolik enerji ihtiyacını yerine getirememekte hücre membranından geçen boya maddesini absorblar, hücre dışına çıkartamaz aktif taşıma için enerji ihtiyaçlarını karşılayamadıklarından ve mavi renkte görülür.

➤ U-118 MG hücre süspansiyonundan 50 µl alınarak 1,5 Ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı ve üzerine 50 µl %0,5 tripan mavisi boyası ilave edilerek iyice karışması sağlandı.

➤ U-118 MG hücre serisinde hücre canlılığı tespit edildi. Tripan mavisi ile boyanan hücre süspansiyonundan 10'ar µl örnek alınarak, özel EVE™ Lamin her iki kuyucuğuna sayım için yüklendi (Fotoğraf 3.2).

➤ EVE otomatik hücre sayacı ile hücre sayımı gerçekleştirildi.

➤ Tripan mavisi boyasını içine alıp mavi renkte görünen hücreler ölü, boyayı metabolize edip parlak görünen hücreler ise canlı olarak değerlendirildi.

➤ Hücre sayısı /ml= Ortalama sayım değeri x seyreltme faktörü x  $10^4$  Formülünden bir hücre süspansiyonunun bir mililitresindeki hücre sayısı belirlendi.

➤ 96'lık plate 100 µl ekildiğinde kuyucuk başına  $1,1 \times 10^4$  hücre gelecek şekilde ekildi.

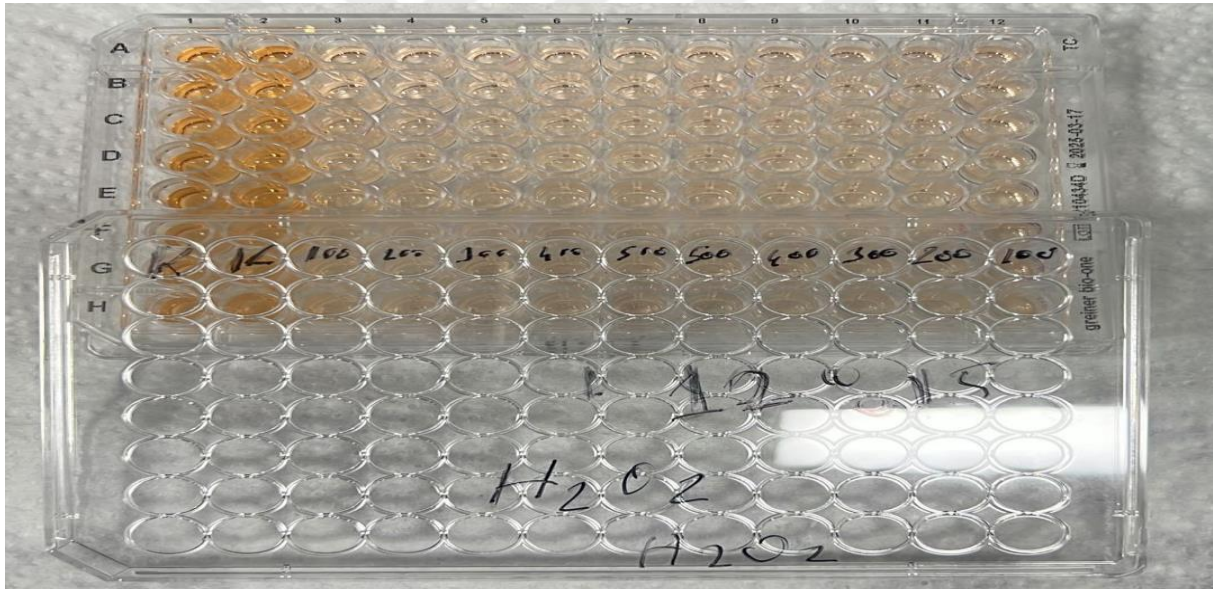


**Fotoğraf 3.2.** EVE otomatik hücre sayacı ile hücre sayımı

### 3.2.6 Hücre hatlarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oksidatif stres oluşturulması

Glioblastoma U-118 MG hücre serisi üzerinde hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Merck KgaA 64270 Darmstadt) oksidatif stres kaynağı olarak uygulandı. U-118 MG hücre ekimi 96'lık platelere her kuyucuğa yaklaşık 10.000/100µl gelecek şekilde hücre ekimi yapıldı. U-118 MG hücrelerinin uygun hücre serisi oluşturuldu.

Çalışmada hücreler seri dilüsyonlar halinde hazırlanan (100-500µM) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi seriler halinde gruplara bölünen hücre serisine ilave edildi. 51 µl %35'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üzerine 10 ml DMEM eklenerek 10<sup>-1</sup> M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan ana stok çözeltiden seyreltilerek 100, 200, 300, 400 ve 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nin farklı konsantrasyonları hazırlandı. U-118 MG hücreleri H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nin farklı konsantrasyonları ile 20 saat inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sürelerinin ardından XTT (2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid tuzu) analiz yöntemi ile hücre canlılığı (sitotoksikite durumu) değerlendirildi (299).



**Fotoğraf 3.3** U-118 MG hücre hattı üzerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması

### 3.2.7 Memantin ve kafeik asit stok çözeltilerinin hazırlanması

Memantin stok çözeltisi: Memantinden (Cayman chemical company) 2,2 mg tartılarak 1000µl etanol (%96) içinde çözüldükten sonra oluşturulan 10<sup>-3</sup> M'lık stok çözelti DMEM ile seyreltilerek 10 µM konsantrasyonda memantin çözeltisi hazırlandı.

Kafeik asit stok çözeltisi: Kafeik asit (Sigma) 1,8 mg tartılarak 100µl etanol (%96) içinde çözüldükten sonra oluşturulan 10<sup>-2</sup> M'lık stok çözelti, DMEM ile seyreltilerek kafeik asidinin 0,1,1 ve 10 µM farklı konsantrasyonlardaki çözeltisi hazırlandı.

Çözücü olarak kullanılan etanol %0,1, %0.01 ve %0.001 olmak üzere 3 farklı oranda Glioblastoma hücre hattında denenmiştir, hücre canlılığın da azaltıcı veya arttırıcı etkisi görülmemiştir.

### **3.2.8 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile memantin ve kafeik asit stok çözeltilerinin hazırlanması**

Memantinden 2,2 mg tartılarak 1000 µl etanol içinde çözüldükten sonra oluşturulan 10<sup>-3</sup> M'lık stok çözelti DMEM ile seyreltilerek 10 µM'lık konsantrasyonda çözeltisi hazırlandı. Kafeik asitten 1,8 mg tartılarak 100 µl etanol içinde çözüldükten sonra oluşturulan 10<sup>-2</sup> M'lık stok çözelti DMEM ile seyreltilerek 0.1,1 ve 10 µM'lık 3 farklı konsantrasyonlarda çözeltisi hazırlandı.

### **3.2.9 U-118 MG hücrelerinde memantin ve kafeik asidinin etkilerinin ayrı ayrı değerlendirilmesi**

U-118 MG hücre ekimi: 96'lık platelerde uygun hücre serisi oluşturuldu. İlk uygulamada besiyerleri değişimi yapılarak %5 CO<sub>2</sub> ve %95 hava içeren etüv içerisinde 37°C 'de 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

Oluşturulan U-118 MG hücre serisi platelerindeki besiyeri aspire edilerek yerine memantin etkisi için 10 µM'lık konsantrasyondan 100µl ilave edilerek 20 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sürelerinin ardından XTT (2,3-bis [2-metoksi-4-nitro-5- sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid tuzu) analiz yöntemi ile hücre canlılığı değerlendirildi.

Kafeik asidinin etksi için oluşturulan U-118 MG hücre serisi platelerindeki besiyeri aspire edilerek yerine 0.1,1 ve 10 µM kafeik asitten 100'er µl ilave edilerek 20 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürelerinin ardından XTT (2,3-bis [2-metoksi-4-nitro-5- sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid tuzu) analiz yöntemi ile hücre canlılığı değerlendirildi.

### **3.2.10 U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi Memantin ve Kafeik asit etkisinin değerlendirilmesi**

Memantin hasar öncesi etkinliğinin belirlenmesi için 96 kuyucuklu plate eşit sayıda hücreler bırakıldı. Ardından hücre kontrol, besiyeri kontrol ve memantin 10 µM'lık dozundan 100µl eklenerek hücreler 4 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyon süresinin sonunda ortamdaki çözelti aspire edilerek yerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile hazırlanan memantin 10 µM'lık dozundan 100µl uygulanarak hücreler 20 saat süre ile inkübe edildi. Daha sonra 50 µM XTT solüsyonu 4 saat inkübe edilerek hücre canlılığı 450 nm dalga boyunda değerlendirildi.

Kafeik asit önce uygulamasının etkinliğinin belirlenmesi amacıyla 96 kuyucuklu plate eşit sayıda hücreler ekildi. Ardından hücre kontrol, besiyeri kontrol kafeik asidinin 0.1,1 ve 10  $\mu\text{M}$ 'lık dozlarından 100'er  $\mu\text{l}$  uygulanarak, hücreler 4saat süre inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyon sonunda ortamdaki çözelti aspire edilerek yerine  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile kafeik asidinin 0.1,1 ve 10  $\mu\text{M}$ 'lık 3 farklı dozundan 100'er  $\mu\text{l}$  20 saat süre ile inkübe edildi. 50  $\mu\text{M}$  XTT solüsyonu 4 saat inkübe edilerek hücre canlılığı 450 nm dalga boyunda değerlendirildi.

### **3.2.11 U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu sonrası memantin ve kafeik asidinin etkisinin değerlendirilmesi**

$\text{H}_2\text{O}_2$ ' nun ilk uygulamasında 96'lık platelerde U-118 MG hücrelerinin uygun hücre serisi oluşturuldu. 200  $\mu\text{M}$ 'lık  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisinden 100 $\mu\text{l}$  uygulanarak 4 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyon sonunda ortamdaki çözelti aspire edilerek yerine  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile hazırlanan memantin 10 $\mu\text{M}$ 'lık dozundan 100 $\mu\text{l}$  konularak 20 saat süre ile inkübasyon yapıldı. Daha sonra 50  $\mu\text{M}$  XTT solüsyonunda 4 saat inkübe edilerek hücre canlılığı 450 nm dalga boyunda değerlendirildi.

Kafeik asidinin değerlendirilmesi için  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nun ilk uygulanmasında 96'lık platelere U- 118 MG hücrelerinin uygun hücre serisi oluşturuldu. 200  $\mu\text{M}$  'lık  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisinden 100 $\mu\text{l}$  uygulanarak 4 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyon sonunda ortamdaki çözelti aspire edilerek yerine  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile hazırlanan kafeik asidinin 0.1,1 ve 10  $\mu\text{M}$  3 farklı dozundan 100'er  $\mu\text{l}$  ilave edilerek 20 saat süre ile inkübasyon yapıldı. Daha sonra 50  $\mu\text{M}$  XTT solüsyonunda 4 saat inkübe edilerek hücre canlılığı 450 nm dalga boyunda değerlendirildi.

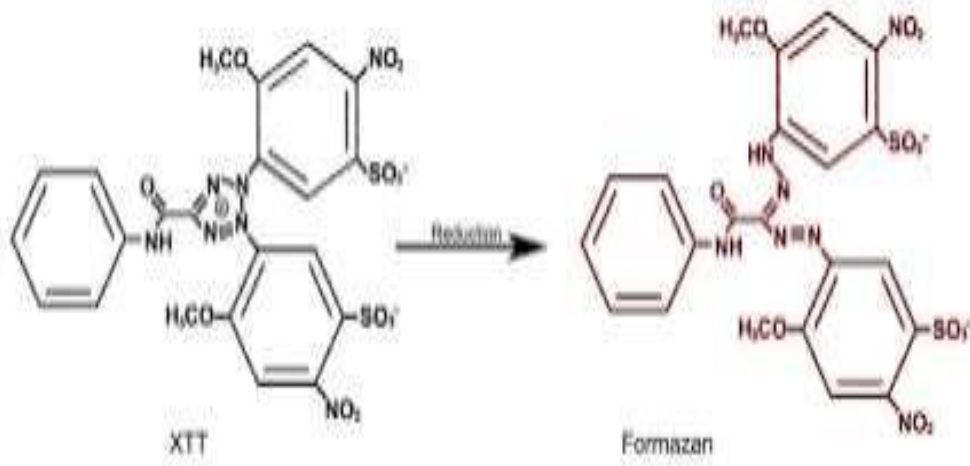
### **3.2.12 Hücre Proliferasyon Canlılık Testi II (XTT)**

Canlılık testi farklı konsantrasyonlardaki memantin ve kafeik asidinin U-118 MG hüce hattı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Bu çalışmada günümüzde en yaygın olarak kullanılan XTT (Biological Industries) yöntemi tercih edilmiştir.

XTT (2,3-bis [2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid tuzu) testi canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından bir tetrazolyum tuzunun bir formazan ürününe çevrilmesi (Şekil 3.1), ortaya çıkan bu ürün miktarının spektrofotometrede kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanan hızlı ve güvenilir bir yöntemdir (Riss et al 2016). Bu amaçla hücreler 96-kuyucuklu platelere her bir kuyucukta  $1 \times 10^4$  hücre olacak şekilde DMEM besiyeri ortamına ekilir ve kültüre edilir. 24 saat sonra platelerin içindeki besiyeri uzaklaştırılarak ve kuyucuklara etkisi memantin ve kafeik asit fenol kırmızısı içermeyen

DMEM içerisinde dilüye edilerek hücrelere 24 saat boyunca uygulanır. Kültür süresinin dolmasıyla hücrelere XTT çözeltisinden 50 µM eklenip 4 saat bekletilir ve süre sonunda 450nm dalga boyundaki absorbans değerleri mikropalak okuyucu ile saptanır. Memantin ve kafeik asidinin içeren kuyucuklardan (kontrol hücreleri) okunan absorbans değeri %100 kabul edilir ve diğer örneklerin absorbanslarından canlılık değeri buna göre hesaplanır.

$$\text{Yüzde Canlılık} = [\text{Örnek ABS ortalama} / \text{Kontrol ABS ortalama}] \times 100$$



**Şekil 3.1** XTT ‘in formazan kristaline dönüşüm reaksiyonu

### 3.2.13 İstatistiksel analiz

Verilerin değerlendirilmesinde değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro- Wilk testi ile incelendi. Hücre canlılığının gruplar arasındaki farklılığının incelenmesinde One-Way Anova (tek yönlü varyans analizi) yöntemi uygulandı. Çoklu karşılaştırmalar için Tukey HSD, Tamhane T2 ve Dunnett testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık  $p < 0,05$  olarak kabul edildi. İstatistik parametreleri Mean±SD ile ifade edildi. Verilerin değerlendirmesinde IBM SPSS versiyon 22 (IBM SPSS for Windows version 22, IBM Corporation, Armonk, New York, United States) paket programından yararlanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Hücre Kültürü Uygulamaları

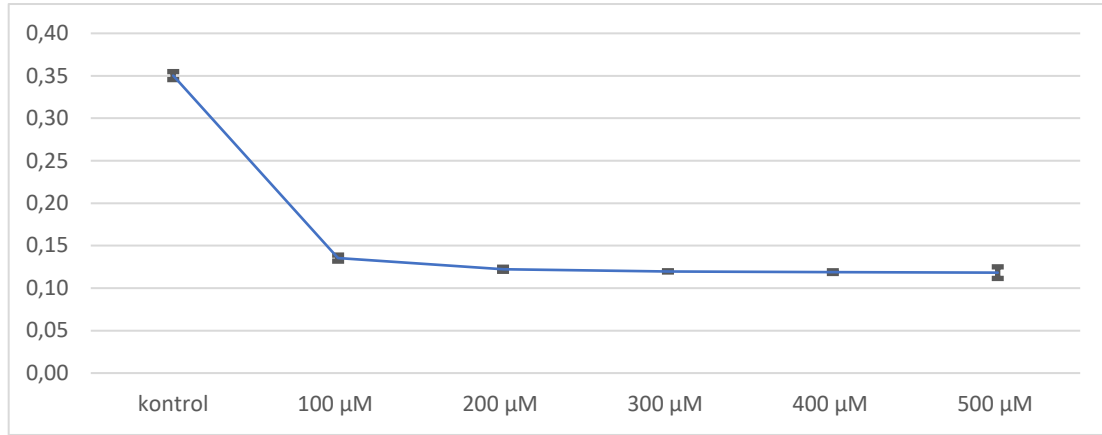
#### 4.1.1. Hücre hatlarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oksidatif stres oluşturulması

U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasarın oluşturulması için kullanılan hidrojen peroksit 100, 200, 300, 400 ve 500 µM konsantrasyonları, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı bir şekilde hücre canlılığında azalmaya sebep olmuştur (Tablo 4.1, p<0.001). 100, 200, 300, 400 ve 500 µM konsantrasyonundaki hidrojen peroksit grupları arasında anlamlı bir fark bulunmazken, yaklaşık %65 hücre ölümü oluşturan hidrojen peroksit konsantrasyonu (200 µM) bundan sonraki deneylerde hücre hasar modeli oluşturulması için kullanıldı (Şekil 4.1).

**Tablo 4.1** U-118 MG hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oluşturulan hasar modelinde istatistiksel sonuçlar

| Tek Başına H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Uygulaması |          |       |        |
|-----------------------------------------------------|----------|-------|--------|
| Grup                                                | Ortalama | SS    | p      |
| Kontrol                                             | 0.350    | 0.005 | <0,001 |
| 100 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                | 0.135    | 0.004 |        |
| 200 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                | 0.122    | 0.002 |        |
| 300 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                | 0.120    | 0.001 |        |
| 400 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                | 0.119    | 0.002 |        |
| 500 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                | 0.118    | 0.007 |        |

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmektedir (p<0.001). \*Gruplar arasındaki anlamlı farklılık p: olasılık değeri.



**Şekil 4.1** U-118 MG hücrelerinde hidrojen peroksitin hücre canlılığı üzerine etkisi

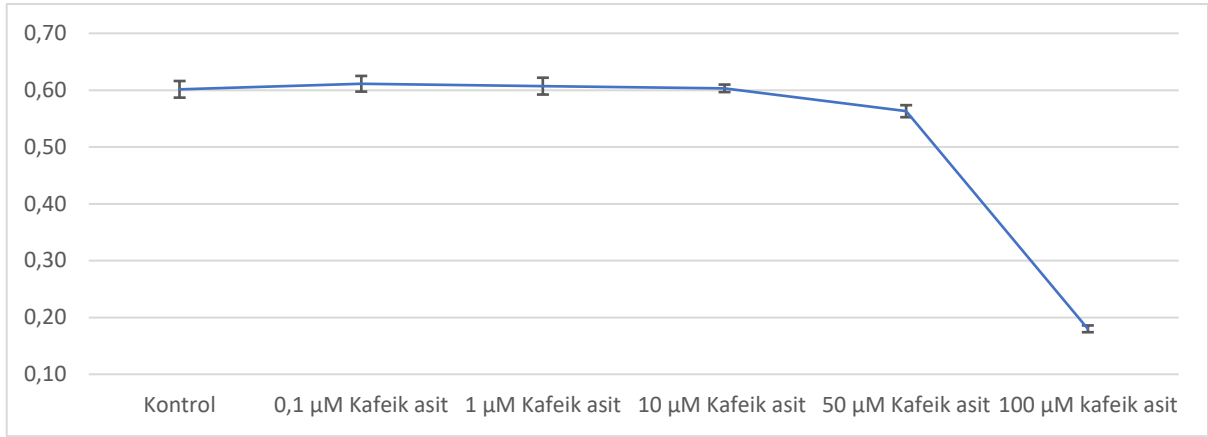
#### 4.1.2. U-118 MG Hücrelerinde kafeik asidin etkisinin değerlendirilmesi

Nöroprotektif ajan olarak kullanılması planlanan kafeik asit, U-118 MG hücrelerinde 0,1, 1 ve 10 µM konsantrasyonları istatistiksel olarak kontrol grubu ile benzer etki göstererek herhangi bir hücresel hasara neden olmamıştır. Tek başına kafeik asit uygulamasında, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı bir şekilde hücre canlılığında azalmaya sebep olmuştur (Tablo 4.2 ve Şekil 4.2).

**Tablo 4.2** U-118 MG Hücre hattında kafeik asit uygulaması

| Tek Başına Kafeik asit Uygulaması |          |       |        |
|-----------------------------------|----------|-------|--------|
| Grup                              | Ortalama | SS    | p      |
| Kontrol                           | 0.602    | 0.015 | <0,001 |
| 0,1 µM Kafeik asit                | 0.611    | 0.014 |        |
| 1 µM Kafeik asit                  | 0.607    | 0.015 |        |
| 10 µM Kafeik asit                 | 0.603    | 0.007 |        |
| 50 µM Kafeik asit                 | 0.563    | 0.011 |        |
| 100 µM kafeik asit                | 0.180    | 0.006 |        |

50 ve 100 µM kafeik asit grubu ile kontrol ( $p < 0.001$ ) arasında anlamlı farklılık gösterirken, diğer kafeik asit grupları ile kontrol grubu arasında benzerlik görülmektedir. \*Gruplar arasındaki anlamlı farklılık p: olasılık değeri.



**Şekil 4.2** U-118 MG hücrelerinde kafeik asidin hücre canlılığına etkisi

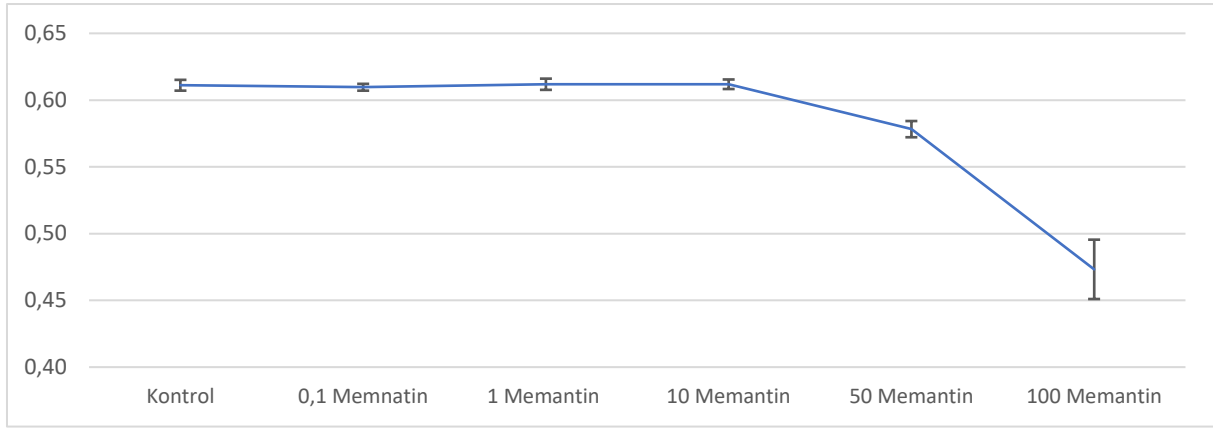
#### 4.1.3. U-118 MG hücrelerinde Memantin uygulamasının değerlendirilmesi

NMDA reseptör antagonisti olarak kullanılması planlanan memantin, U-118 MG hücrelerinde memnatinin 0,1, 1 ve 10 µM konsantrasyonları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemektedir (Tablo 4.3). Bu konsantrasyonlarda memantin hücresel bir hasara sebep olmamıştır. Memnatinin 50 ve 100 µM konsantrasyonları ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde hücre canlılığında azalmaya sebep olmuştur (Şekil 4.3).

**Tablo 4.3** U-118 MG Hücre hattında memantin uygulamasının istatistiksel sonuçları

| Tek Başına Memantin Uygulaması |          |       |        |
|--------------------------------|----------|-------|--------|
| Grup                           | Ortalama | SS    | p      |
| Kontrol                        | 0.611    | 0.004 | <0,001 |
| 0,1 µM Memnatin                | 0.610    | 0.003 |        |
| 1 µM Memantin                  | 0.612    | 0.004 |        |
| 10 µM Memantin                 | 0.612    | 0.004 |        |
| 50 µM Memantin                 | 0.578    | 0.006 |        |
| 100 µM Memantin                | 0.473    | 0.022 |        |

50 ve 100 µM memantin grubu ile kontrol ( $p < 0.001$ ) arasında anlamlı farklılık gösterirken, diğer memantin grupları ile kontrol grubu arasında benzerlik görülmektedir. \*Gruplar arasındaki anlamlı farklılık p: olasılık değeri.



**Şekil 4.3** U-118 MG hücrelerinde memantinin hücre canlılığına etkisi

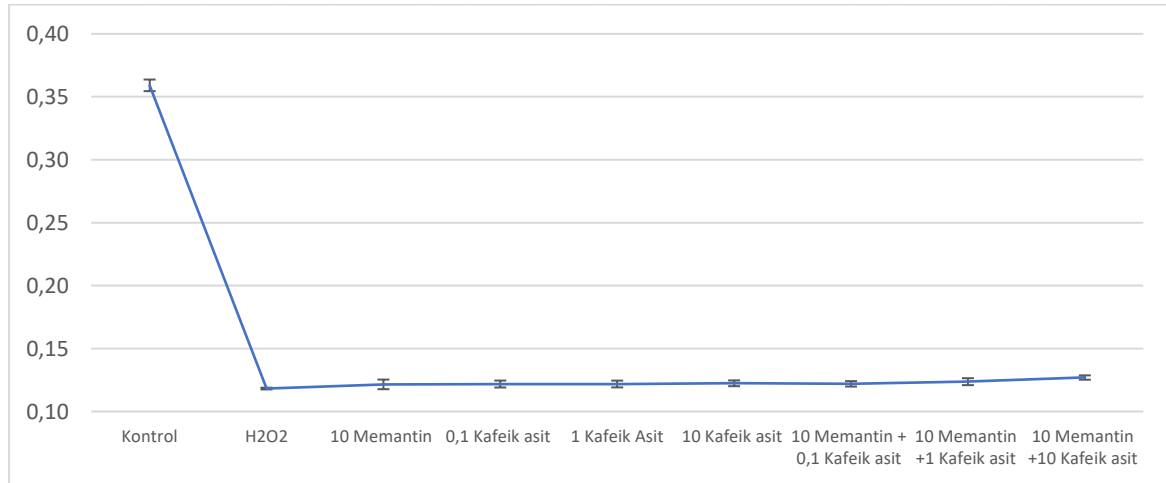
#### **4.1.4. U- 118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi memantin ile kafeik asidin birlikte uygulamasının koruyucu etkisinin değerlendirilmesi**

Hidrojen peroksit uygulamasından 4 saat önce memantin, kafeik asit ve memantin ile birlikte kafeik asit U-118 MG hücrelerinde uygulandı. İlaç gurpları, hidrojen peroksit grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamasına karşın kafeik asidin 10µM konsantrasyonda %3,38 ve kombine gruplarda 0,1 µM, 1 µM ve 10µM konsantrasyonlarında %3,38, %5,08 ve %5,93 kadar hidrojen peroksit ile oluşturulan hasara karşı koruyucu etki görülmektedir (Tablo 4.4, Şekil 4.4).

**Tablo 4.4** Oksidatif hasar oluşum öncesi memantin ile kafeik asidin birlikte uygulanmasının hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değerlendirmesi

| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Uygulamasından 4 Saat Önce Memantin ile Kafeik Asidin Birlikte Uygulaması</b> |                 |           |          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------|----------|
| <b>Grup</b>                                                                                                 | <b>Ortalama</b> | <b>SS</b> | <b>p</b> |
| Kontrol                                                                                                     | 0.359           | 0.005     | <0,001   |
| 200 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                                        | 0.118           | 0.001     |          |
| 10 µM Memantin                                                                                              | 0.122           | 0.004     |          |
| 0,1 µM Kafeik asit                                                                                          | 0.122           | 0.003     |          |
| 1 µM Kafeik Asit                                                                                            | 0.122           | 0.003     |          |
| 10 µM Kafeik asit                                                                                           | 0.122           | 0.002     |          |
| 10 µM Memantin + 0,1 µM Kafeik asit                                                                         | 0.122           | 0.002     |          |
| 10 µM Memantin +1 µM Kafeik asit                                                                            | 0.124           | 0.003     |          |
| 10 µM Memantin +10 µM Kafeik asit                                                                           | 0.127           | 0.002     |          |

Kontrol ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmektedir. (P<0.001). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grupları ile memantin, kafeik asit ve memantin ile birlikte kafeik asit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (p>0.05). \*Gruplar arasındaki anlamlı farklılık p: olasılık değeri.



**Şekil 4.4** U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi memantin ile kafeik asidin birlikte uygulanmasının hücre canlılığına koruyucu etkisi

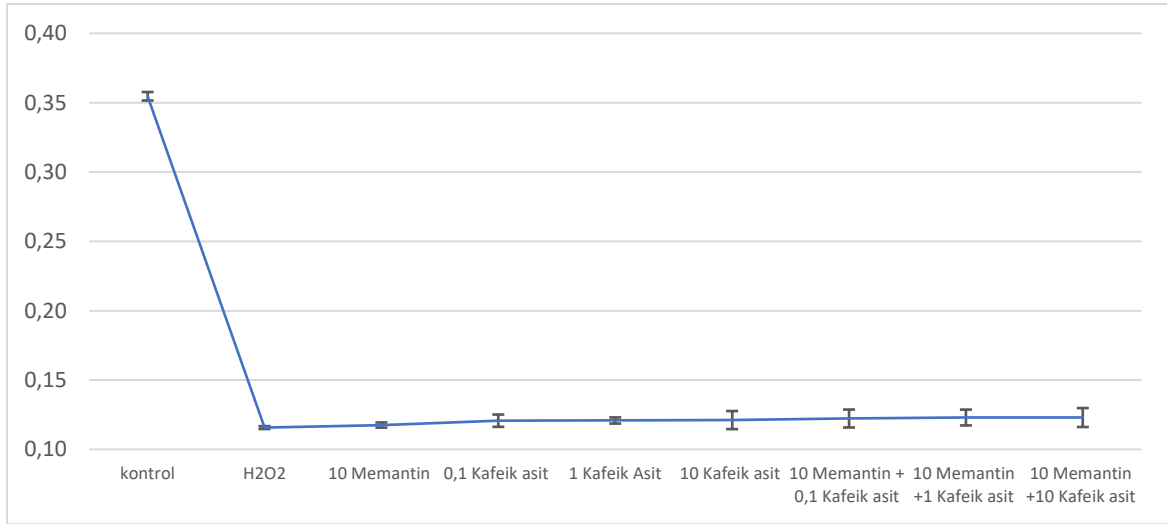
#### 4.1.5. U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum sonrası memantin ile kafeik asidin birlikte tedavi edici etkisinin değerlendirilmesi

Hidrojen peroksit uygulamasından 4 saat sonra memantin, kafeik asit ve memantin ile birlikte kafeik asit U-118 MG hücrelerinde uygulandı. İlaç gurpları, hidrojen peroksit grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamasına karşın kafeik asidin 10µM konsantrasyonunda %4.31 ve kombine gruplarda 0.1 µM, 1 µM ve 10µM konsantrasyonlarında %5.17, %6.03 ve %6.03 kadar hidrojen peroksit ile oluşturulan hücresel hasara karşı koruyucu etki görülmektedir (Tablo 4.5, Şekil 4.5).

**Tablo 4.5** Oksidatif hasar oluşum sonrası memantin ile kafeik asidin birlikte uygulamasının hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değerlendirmesi

| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Uygulamasından 4 Saat Sonra Memantin ile Kafeik Asidin Birlikte Uygulanması</b> |                 |           |          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------|----------|
| <b>Grup</b>                                                                                                   | <b>Ortalama</b> | <b>SS</b> | <b>p</b> |
| Kontrol                                                                                                       | 0.355           | 0.003     | <0,001   |
| 200 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                                          | 0.116           | 0.001     |          |
| 10 µM Memantin                                                                                                | 0.118           | 0.002     |          |
| 0,1 µM Kafeik asit                                                                                            | 0.121           | 0.004     |          |
| 1 µM Kafeik Asit                                                                                              | 0.121           | 0.002     |          |
| 10 µM Kafeik asit                                                                                             | 0.121           | 0.007     |          |
| 10 µM Memantin + 0,1 µM Kafeik asit                                                                           | 0.122           | 0.006     |          |
| 10 µM Memantin +1 µM Kafeik asit                                                                              | 0.123           | 0.006     |          |
| 10 µM Memantin +10 µM Kafeik asit                                                                             | 0.123           | 0.007     |          |

Kontrol ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmektedir. (P<0.001). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grupları ile memantin, kafeik asit ve memantin ile birlikte kafeik asit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (p>0.05). \*Gruplar arasındaki anlamlı farklılık p: olasılık değeri.



**Şekil 4.5** U-118 MG hücrelerinde oksidatif hasar oluşum sonrası memantin ile kafeik asidin birlikte uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki tedavi edici etkisi

## 5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında N-methyl-D-aspartate (NMDA) reseptör antagonisti memantinin, U-118 MG glioblastoma hücre hattında oksidatif hasar oluşturulmadan ve oluşturduktan sonra tek başına ve nöroprotektif özelliği olan kafeik asit ile birlikte kullanılmasının hücre canlılığı üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Memantin, orta ve ileri aşamadaki Alzheimer hastalığında plaseboya göre kognisyon ve fonksiyonu geliştirdiği gösterilen bir NMDA reseptör antagonistidir. Genellikle demansta kognitif ve fonksiyonel performansı iyileştiren ajanların davranışsal etkileri vardır. Winblad-Poritis ve diğer araştırmacılar tarafından yürütülen iki randomize plasebo kontrollü çalışmada, memantinin Alzheimer hastalığının ilerlemesini yavaşlatmada orta derecede etkili olduğu gösterilmiştir (287). Memantin, çeşitli in vitro (hücre kültürü) ve in vivo (canlı organizma) model sistemlerinde nörokoruyucu etkiler sergilemektedir. Bu bağlamda, memantin NMDA ve glutamat tarafından tetiklenen hücre ölümünü, kültüre edilmiş sıçan retinal gangliyon, serebellar, kortikal, mezensefalik ve hipokampal nöronlarda başarıyla engellemiştir (289,290, 291). Ancak kâinat veya alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksozol asetonitril (AMPA) reseptör aktivasyonu tarafından tetiklenen hücre hasarına karşı koruyucu etkisi gözlenmemiştir (292). Doku kültürü deneylerinde ise memantin, tau proteini hiperfosforilasyonunu azaltmış ve amiloid öncü protein işleme sürecini amiloidojenik olmayan bir yol aracılığıyla artırmıştır (293,294). Tariot-Farlow ve diğer araştırmacılar tarafından yapılan bir çalışmada, orta ila şiddetli Alzheimer hastalığına sahip bireylerde memantin ve donepezil kombinasyonunun değerlendirildiği ve bu kombinasyon tedavisinin hem bilişsel hem de davranışsal etkinlik önlemlerinde daha fazla semptomatik iyileşmeye yol açtığı bildirilmiştir (288). Miguel-Hidalgo ve arkadaşları Alzheimer hastalığının in vivo modellerinde yapılan çalışmalarda, memantin sıçanların hipokampusuna 40 amino asitlik  $\beta$ -amiloid peptidi enjekte edilmesi sonucu oluşan nöron hücre kaybını azaltmış ve yaşa bağlı hızlandırılmış amiloid birikimi ve hafıza bozukluğu gösteren transgenik farelerde Morris su labirenti performansını iyileştirdiğini göstermiştir (295,296). Fischer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, memantin TG2576 transgenik fare hipokampuslarında A $\beta$  plak yığınlarını azalttığı ve sinaptik yoğunluğu artırdığına dair raporlar mevcuttur (297). Bu tez çalışmamızda elde ettiğimiz, Memantinin U-118 MG hücrelerinde hidrojen peroksit ile oksidatif hasar öncesi ve hasar sonrası 10  $\mu$ M konsantrasyonda uygulandığında hücre canlılığı üzerine olumlu etki oluşturması yukardaki çalışmalarla uyumlu görünmemektedir. Çalışmamızda memantinin düşük nöroprotektif etki oluşturması kullandığımız in-vitro hücre modeli ve seçtiğimiz konsantrasyonla ilişkili olabilir.

Kafeik asit ayrıca vücutta serbest radikallerin etkisiyle oluşan oksidatif stresi azaltabilen bir antioksidandır. Kafeik asidin nöronları in vitro ve in vivo koşullarda oksidatif strese ve  $\beta$ -amiloid birikmesine karşı koruduğu deneysel olarak gösterilmiştir (298). Tesfahuneygn ve ark. yaptıkları çalışmada, kafeik asidin A $\beta$  proteinlerinin üretimini baskılayarak ve adenoazin reseptör antagonisti olarak nöronları eksitotoksisteden koruyarak oksidatif stresi azalttığını ve ayrıca Parkinson hastalığında striatal dopamin seviyelerinin ve dopamin taşıyıcı bağlanma bölgelerinin kaybını azaltıcı aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Mehrotra ve ark. yaptıkları çalışmada, kafeik asidin farelerde ve sıçanlarda miyeloperoksidaz, malondialdehit ve nitrit oluşumunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir (299). Taram ve ark. tarafından FeSO<sub>4</sub> ve sodyum nitroprussid (SNP) ile yaptıkları çalışmada, kafeik asidin, glutamat/glicin tarafından neden olunan nörotoksisteye karşı belirgin koruma sağladığı bildirilmiştir. Ayrıca bu sonuçlar kafeik asidin nöronlarda glutamatın neden olduğu intrasellüler Ca<sup>2+</sup> girişinin inhibisyonu ve buna bağlı olarak ROS oluşumunun azalması ile eşlik ettiğini göstermektedir (300). Kafeik asit, glutamat tarafından indüklenen kaspaz aktivasyonunu baskılayarak anti-apoptotik özellikler sergilemektedir. Ayrıca, Colín-González ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, PC12 hücrelerinde NMDA tarafından indüklenen erken ve gecikmiş yaralanmaları inhibe ederek (5-LOX aktivasyonunu inhibe ederek) sıçan beyin homojenlerindeki kinolik asidin neden olduğu oksidatif stresi ve sıçan striatal dilimlerindeki kinolik asidin neden olduğu oksidatif stresi iyileştirdiği gösterilmiştir (301,302). Omar ve ekibinin yaptığı çalışmada, kafeik asidin PC12 hücrelerinde A $\beta$  tarafından neden olunan nörotoksisteyi iyileştirdiği gösterilmiştir (303). Bu etki kalsiyum girişinin inhibisyonu ve tau fosforilasyonunun azaltılması ile birlikte ortaya çıkmıştır (304). Deshmukh ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Kafeik asidin streptozotosin ile indüklenen nörokognitif bozuklukları iyileştirdiği bildirilmiştir. Nesnel tanıma görevinde mekansal olmayan bellek performansını iyileştirip ve Morris su labirenti testinde mekansal bellek performansını artırmıştır. Ayrıca, streptozotosin ile indüklenen oksidatif stresi hafifletip ve AChE aktivitesinde doza bağlı bir azalma sağlamıştır (305). Aynı zamanda A $\beta$ 1-40 ile indüklenen nörotoksistede beyin AChE aktivitesinin azaldığı gözlemlenmiştir. İlginç bir şekilde kafeik asit ile yapılan 30 günlük bir tedavi deneyimli olmayan sıçanlarda öğrenme ve bellek yeteneklerini iyileştirdiği ve serebral korteks ve striatumdaki AChE aktivitesini önemli ölçüde inhibe etmiştir. Ancak hipokampus, hipotalamus ve ponsdaki AChE aktivitesini artırmıştır. Bununla birlikte kafeik asidin muhtemel anti-AChE aktivitesi üzerine yapılan in vitro çalışmalardan elde edilen veriler tutarsız olmuştur (306). Kafeik asidin, Kaspaz 3 immünoaktivitesini azalttığını, NF- $\kappa$ Bp65 aşırı ekspresyonunu düşürdüğünü, beyin MDA düzeyini azalttığını ve SOD aktivitesini artırdığını belirtmek

önemlidir. Bu bulgular, kafeik asidin inflamasyonu ve oksidatif stresi hafifletebileceğini göstermektedir (307). Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, kafeik asidin Alzheimer hastalığının in vivo modelinde A $\beta$ 1-40 tarafından neden olan öğrenme ve bellek bozukluklarını hafiflettiği ve sıçanlarda beyin hasarını azalttığı gözlemlenmiştir. Bu etkinin AChE aktivitesinin inhibe edilmesi ve oksidatif stresin azaltılması ile ilişkili olabileceğini söylemişlerdir (308). Çalışmamızda, kafeik asidin oksidatif stres hasar öncesi veya sonrası uygulandığında gösterdiği hücre canlılığı üzerine olan olumlu etkileri yukardaki çalışma sonuçları ile benzer gözükmemektedir.

Sonuç olarak memantin ve kafeik asit ile birlikte uygulandığında, konsantrasyona bağımlı olmadan sınırlı düzeyde olsa da nöroprotektif etki oluşturmuştur. Bu elde edilen in-vitro sonuçlar memantin ve kafeik asit kombinasyonunun nörodejeneratif hayvan modellerinde denenmesi için yeterli olacağını düşünmekteyiz.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bulgularımıza göre in-vitro şartlar altında memantin, kafeik asit ile birlikte kullanılmasının oksidatif stresin neden olduğu hücrel hasara karşı koruyucu olduğu, memantin klinik olarak tek başına kullanılmasının yararına göre kafeik asit ile birlikte kullanılmasının Alzheimer gibi nörodejenaratif hastalıklarda daha etkili sonuçları olabileceği kanatine varılmıştır.

Çalışmamızdan çıkarılabilecek sonuçlar;

- ❖ Kafeik asit diyet takviyesi olarak kullanıldığı için kafeik asidinin nörodejenaratif hastalıkların önlenmesi ve ilerlemesine karşı bir potansiyeli olduğunu düşünmekteyiz. Yaptığımız bu tez çalışması, kafeik asidinin moleküler ve farmakolojik özelliklerini geliştirmek için daha fazla klinik öncesi çalışmaların yapılmasına ışık tutabilir.
- ❖ Memantin, kafeik asit ile birlikte deneysel kullanılması, oksidatif stres kaynaklı hücrel hasara karşı az da olsa nöroprotektif etki göstermesine neden olmuştur. Elde edilen in-vitro sonuçlar memantin ve kafeik asit kombinasyonun nörodejenaratif hayvan modellerinde denenmesi için yeterli olabilir.

## 7. KAYNAKLAR

Bu tez çalışmasında Vancouver atıf sistemi kullanılmıştır.

1. Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS et al., “Prevalence of Alzheimer’s disease in a community population of older persons: higher than previously reported”, JAMA (1989);262: pp. 2551–2556.
2. Hebert LE, Scherr PA, Beckett LA et al., “Age-specific incidence of Alzheimer’s disease in a community population”, JAMA (1995);273: pp. 1354–1359.
3. Türkiye Alzheimer Derneği’nin 2015 yılına ait sunmuş olduğu Alzheimer’lı hasta raporu. <http://www.alzheimerderneği.org.tr/adan-zye-alzheimer/> (TAD- 2016)
4. Hao W, Friedman A. Mathematical model on Alzheimer’s disease. BMC Syst Biol. 2016 Nov 18;10(1):108. PubMed PMID: 27863488; PubMed Central PMCID: PMC5116206.
5. Nida Demirçak, YL Tezi. PC12 nöronal hücre hattında amiloid beta ile oluşturulan alzheimer modelinde saponinlerin oksidatif makromolekül hasarı üzerine etkisinin incelenmesi, Dokuz Eylül Üniv. Moleküler Tıp A.D, 2012.
6. Barlas, GÜ., Onan, N. 2008. Alzheimer hastası ve aileleri ile iletişim. Atatürk Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi, 11(4):105-111.
7. Rossor MN, Iversen LL, Reynolds GP et al., “Neurochemical characteristics of early and late onset types of Alzheimer’s disease”, BMJ (1984);288: pp. 961–964.
8. Arai H, Ichimiya Y, Kosaka K et al., “Neurotransmitter changes in early- and late-onset Alzheimer type dementia”, Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry (1992);16: pp. 883–890.
9. Lanctot KL, Herrmann N, Yau KK et al., “Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in Alzheimer’s disease: a metaanalysis”, CMAJ (2003);169: pp. 557–564.
10. Nordberg A, Svensson AL, “Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer’s disease: a comparison of tolerability and pharmacology”, Drug Safety (1998);19: pp. 465–480.
11. Pitkala KH, Raivio MM, Laakkonen ML, Tilvis RS, Kautiainen H and Strandberg TE: Exercise rehabilitation on home-dwelling patients with Alzheimer’s disease- a randomized, controlled trial. Study protocol. Trials 11: 92, 2010.
12. Spires-Jones TL, Mielke ML, Rozkalne A, Meyer-Luehmann M, de Calignon A, Bacskai BJ, Schenk D and Hyman BT: Passive immunotherapy rapidly increases structural plasticity in a mouse model of Alzheimer disease. Neurobiol Dis 33: 213-220, 2009.
13. Wang WY, Tan MS, Yu JT and Tan L: Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer’s disease. Ann Transl Med 3: 136, 2015.
14. Pittalà V, Salerno L, Romeo G, Siracusa MA, Modica MN, Romano GL, Salomone S, Drago F and Bucolo C: Effects of novel hybrids of caffeic acid phenethyl ester and NSAIDs on experimental ocular inflammation. Eur J Pharmacol 752: 78-83, 2015.
15. Tanida I, Shirasago Y, Suzuki R, Abe R, Wakita T, Hanada K and Fukasawa M: Inhibitory effects of caffeic acid, a coffee-related organic acid, on the propagation of hepatitis C virus. Jpn J Infect Dis 68: 268-275, 2015.
16. Paracatu LC, Faria CM, Quinello C, Rennó C, Palmeira P, Zeraik ML da Fonseca LM and Ximenes VF: Caffeic Acid phenethyl ester: consequences of its hydrophobicity in the oxidative functions and cytokine release by leukocytes. Evid Based Complement Alternat Med 2014: 793629, 2014.

17. Bailly F and Cotelle P: Anti-HIV activities of natural antioxidant caffeic acid derivatives: toward an antiviral supplementation diet. *Curr Med Chem* 12: 1811-1818, 2005.
18. Yang Y, Li Y, Wang K, Wang Y, Yin W and Li L: P38/NF- $\kappa$ B/snail pathway is involved in caffeic acid-induced inhibition of cancer stem cells-like properties and migratory capacity in malignant human keratinocyte. *PLoS One* 8: e58915, 2013.
19. De-Paula, V.J.; Radanovic, M.; Diniz, B.S.; Forlenza, O.V. Alzheimer's disease. *Sub-Cell. Biochem.* 2012, 65, 329–352.
20. Cipriani, G.; Dolciotti, C.; Picchi, L.; Bonuccelli, U. Alzheimer and his disease: A brief history. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 2011, 32, 275–279.
21. Blass, J.P. Alzheimer's disease. *Dis. A Mon. Dm* 1985, 31, 1–69. [CrossRef]
22. Terry, R.D.; Davies, P. Dementia of the Alzheimer type. *Annu. Rev. Neurosci.* 1980, 3, 77–95.
23. Rathmann, K.L.; Conner, C.S. Alzheimer's disease: Clinical features, pathogenesis, and treatment. *Drug Intell. Clin. Pharm.* 1984, 18, 684–691.
24. Mendez MF. What is the Relationship of Traumatic Brain Injury to Dementia? *J Alzheimers Dis.* 2017 Mar 2. doi: 10.3233/JAD-161002. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28269777.
25. Texel SJ, Zhang J, Camandola S, Unger EL, Taub DD, Koehler RC, Harris ZL, Mattson MP. Ceruloplasmin deficiency reduces levels of iron and BDNF in the cortex and striatum of young mice and increases their vulnerability to stroke. *PLoS One.* 2011;6(9): e25077. Doi: 10.1371/journal.pone.0025077. PubMed PMID: 21949858; PubMed Central PMCID: PMC3174999.
26. Solomon A, Mangialasche F, Richard E, Andrieu S, Bennett DA, Breteler M, Fratiglioni L, Hooshmand B, Khachaturian AS, Schneider LS, Skoog I, Kivipelto M. Advances in the prevention of Alzheimer's disease and dementia. *J Intern Med.* 2014 Mar;275(3):229-50. doi: 10.1111/joim.12178. PubMed PMID: 24605807; PubMed Central PMCID: PMC4390027.
27. Guerreiro R, Hardy J. Genetics of Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics.* 2014 Oct;11(4):732-7. doi: 10.1007/s13311-014-0295-9. Review. PubMed PMID: 25113539; PubMed Central PMCID: PMC4362699.
28. Yalug I, Selekler M, Erdogan A, Kutlu A, Dundar G, Ankarali H, Aker T. Correlations between alexithymia and pain severity, depression, and anxiety among patients with chronic and episodic migraine. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2010 Jun;64(3):231-8. doi: 10.1111/j.1440-1819.2010.02093.x. PubMed PMID: 20602723.
29. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Kamu Hastaneleri Kurumu İstatistik, Analiz ve Raporlama Daire Bşk. 18.09.2015 tarih 11 sayı numaralı Rapor Bülteni
30. Cankurtaran M, Yavuz BB, Cankurtaran ES, Halil M, Ulger Z, Ariogul S. Risk factors and type of dementia: vascular or Alzheimer? *Arch Gerontol Geriatr.* 2008 Jul-Aug;47(1):25-34. PubMed PMID: 17692938.
31. Tüba Gül YAZICI, Hüseyin A. ŞAHİN, On Dokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, Samsun, Alzheimer Hastalığı, Derleme, 2008
32. Berchtold NC, Cotman CW. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-roman period to the 1960s. *Neurobiol Aging.* 1998; 19(3): 173-189
33. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2011 Mar 19;377(9770):1019-31. doi: 10.1016/S0140-6736(10) 61349-9. Review. PubMed PMID: 21371747.
34. Pievani M, de Haan W, Wu T, Seeley WW, Frisoni GB. Functional network disruption in the degenerative dementias. *Lancet Neurology.* 2011, 10: 829-843.

35. Petersen RC, Wiste HJ, Weigand SD, Rocca WA, Roberts RO, Mielke MM, Lowe VJ, Knopman DS, Pankratz VS, Machulda MM, Geda YE, Jack CR Jr. Association of Elevated Amyloid Levels With Cognition and Biomarkers in Cognitively Normal People From the Community. *JAMA Neurol.* 2016 Jan;73(1):85-92. doi:10.1001/jamaneurol.2015.3098. Erratum in: *JAMA Neurol.* 2016 Apr;73(4):481. PubMed PMID: 26595683; PubMed Central PMCID: PMC4710552.
36. Klementieva O, Willén K, Martinsson I, Israelsson B, Engdahl A, Cladera J, Uvdal P, Gouras GK. Pre-plaque conformational changes in Alzheimer's disease- linked A $\beta$  and APP. *Nat Commun.* 2017 Mar 13; 8:14726. Doi: 10.1038/ncomms14726. PubMed PMID: 28287086.
37. Edip Tosun, YL Tezi. Büt-2-endoik asit bis-(benzil-fenil-amit) türevi bileşiklerin sentezi asetilkolinesteraz ve butilkolinesteraz enzimlerinekarşı aktivitelerinin araştırılması, Erzurum Atatürk Üniv. Farmasötik Kimya A. D.2014. YÖK Tez No: 379330.
38. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011 Sep;1(1): a006189. Doi:10.1101/cshperspect. A006189. Review. PubMed PMID: 22229116; PubMed Central PMCID: PMC3234452.
39. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82(4):239-59. Review. PubMed PMID: 1759558.
40. Sperling R. Potential of functional MRI as a biomarker in early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2011 Dec;32 Suppl 1: S37-43. doi:10.1016/ j. neurobiolaging.2011.09.009. Review. PubMed PMID: 22078171; PubMed Central PMCID: PMC3233699.
41. Jack, C.R., Jr., et al., Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol*, 2010. 9(1): p. 119-28.
42. Schachter, A.S.; Davis, K.L. Alzheimer's disease. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2000, 2, 91–100.
43. Jatoi, S.; Hafeez, A.; Riaz, S.U.; Ali, A.; Ghauri, M.I.; Zehra, M. Low Vitamin B12 levels: An underestimated cause of minimal cognitive impairment and dementia. *Cureus* 2020, 12, e6976.
44. Cho, H.S.; Huang, L.K.; Lee, Y.T.; Chan, L.; Hong, C.T. Suboptimal baseline serum Vitamin B12 is associated with cognitive decline in people with Alzheimer's disease undergoing cholinesterase inhibitor treatment. *Front. Neurol.* 2018, 9, 325.
45. McKhann, G.; Drachman, D.; Folstein, M.; Katzman, R.; Price, D.; Stadlan, E.M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984, 34, 939–944.
46. Neugroschl, J.; Wang, S. Alzheimer's disease: Diagnosis and treatment across the spectrum of disease severity. *Mt. Sinai J. Med. N. Y.* 2011, 78, 596–612.
47. McKhann, G.M.; Knopman, D.S.; Chertkow, H.; Hyman, B.T.; Jack, C.R., Jr.; Kawas, C.H.; Klunk, W.E.; Koroshetz, W.J.; Manly, J.J.; Mayeux, R.; et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement. J. Alzheimer's Assoc.* 2011, 7, 263–269.
48. Yaari, R.; Fleisher, A.S.; Tariot, P.N. Updates to diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Prim. Care Companion Cns Disord.* 2011, 13, 11f01262.
49. Serrano-Pozo, A.; Frosch, M.P.; Masliah, E.; Hyman, B.T. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2011, 1, a006189.
50. Singh, S.K.; Srivastav, S.; Yadav, A.K.; Srikrishna, S.; Perry, G. Overview of Alzheimer's disease and some therapeutic approaches targeting abeta by using several synthetic and herbal compounds. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2016, 2016, 7361613.

51. Cras, P.; Kawai, M.; Lowery, D.; Gonzalez-DeWhitt, P.; Greenberg, B.; Perry, G. Senile plaque neurites in Alzheimer disease accumulate amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 7552–7556.
52. Armstrong, R.A. The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.* 2009, 47, 289–299.
53. Tabaton, M.; Piccini, A. Role of water-soluble amyloid-beta in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Int. J. Exp. Pathol.* 2005, 86, 139–145.
54. Brion, J.P. Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease. *Eur. Neurol.* 1998, 40, 130–140.
55. Metaxas, A.; Kempf, S.J. Neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease: Elucidation of the molecular mechanism by immunohistochemistry and tau protein phospho-proteomics. *Neural Regen. Res.* 2016, 11, 1579–1581.
56. Overk, C.R.; Masliah, E. Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease. *Biochem Pharm.* 2014, 88, 508–516.
57. Lleo, A.; Nunez-Llaves, R.; Alcolea, D.; Chiva, C.; Balateu-Panos, D.; Colom-Cadena, M.; Gomez-Giro, G.; Munoz, L.; Querol-Vilaseca, M.; Pegueroles, J.; et al. Changes in synaptic proteins precede neurodegeneration markers in preclinical Alzheimer's disease cerebrospinal fluid. *Mol. Cell. Proteom. MCP* 2019, 18, 546–560.
58. Tarawneh, R.; D'Angelo, G.; Crimmins, D.; Herries, E.; Griest, T.; Fagan, A.M.; Zipfel, G.J.; Ladenson, J.H.; Morris, J.C.; Holtzman, D.M. Diagnostic and prognostic utility of the synaptic marker neurogranin in Alzheimer Disease. *JAMA Neurol.* 2016, 73, 561–571.
59. Dubois, B.; Hampel, H.; Feldman, H.H.; Scheltens, P.; Aisen, P.; Andrieu, S.; Bakardjian, H.; Benali, H.; Bertram, L.; Blennow, K.; et al. Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimer's Dement. J. Alzheimer's Assoc.* 2016, 12, 292–323.
60. Kumar, A.; Sidhu, J.; Goyal, A. Alzheimer Disease. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2020. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499922/> (accessed on 8 December 2020).
61. Wattmo, C.; Minthon, L.; Wallin, A.K. Mild versus moderate stages of Alzheimer's disease: Three-year outcomes in a routine clinical setting of cholinesterase inhibitor therapy. *Alzheimer Dis.* 2013;5:44.
62. Apostolova, L.G. Alzheimer disease. *Continuum* 2016, 22, 419–434.
63. Carr, D. B., Gray, S., Baty, J., & Morris, J. C. (2000). The value of informant versus individual's complaints of memory impairment in early dementia. *Neurology*, 55(11), 1724–1727.
64. Weintraub, S., A.H. Wicklund, and D.P. Salmon, The neuropsychological profile of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. 2(4): p. a006171.
65. Charles V, Mufson EJ, Friden PM., Bartus RT, Kordower JH. (1996). Atrophy of cholinergic basal forebrain neurons following excitotoxic cortical lesions is reversed by intravenous administration of an NGF conjugate. *Brain Res*, 728: 193–203.
66. Engelhardt E, Gomes M da M (2015) Alzheimer's 100th anniversary of death and his contribution to a better understanding of Senile dementia. *Arq. Neuropsiquiatr.*
67. Armstrong, R.A. Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.* 2019, 57, 87–105.
68. Anand, P.; Singh, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Arch. Pharmacol. Res.* 2013, 36, 375–399.
69. Selekler, K. 2009. Alois Alzheimer. *Nörolojide Yeni Ufuklar. Alzheimer ve Diğer Demanslar içinde*. Ed: K Selekler. Güneş Tıp Kitabevleri Yayınları, 1-3.
70. Babic, T. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: A review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1999, 67, 558.

71. Monczor, M. Diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem. Cent. Nerv. Syst. Agents* 2005, 5, 5–13.
72. Hampel, H.; Mesulam, M.M.; Cuello, A.C.; Farlow, M.R.; Giacobini, E.; Grossberg, G.T.; Khachaturian, A.S.; Vergallo, A.; Cavado, E.; Snyder, P.J.; et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain A J. Neurol.* 2018, 141, 1917–1933.
73. Paroni, G.; Bisceglia, P.; Seripa, D. Understanding the amyloid hypothesis in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis. Jad* 2019, 68, 493–510.
74. Ricciarelli, R.; Fedele, E. The amyloid cascade hypothesis in Alzheimer's disease: It's time to change our mind. *Curr. Neuropharmacol.* 2017, 15, 926–935.
75. Guerreiro, R.; Bras, J. The age factor in Alzheimer's disease. *Genome Med.* 2015, 7, 106.
76. Riedel, B.C.; Thompson, P.M.; Brinton, R.D. Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2016, 160, 134–147.
77. Hou, Y.; Dan, X.; Babbar, M.; Wei, Y.; Hasselbalch, S.G.; Croteau, D.L.; Bohr, V.A. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol.* 2019, 15, 565–581. [CrossRef] [PubMed]
78. Bekris, L.M.; Yu, C.E.; Bird, T.D.; Tsuang, D.W. Genetics of Alzheimer disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 2010, 23, 213–227.
79. Van Cauwenberghe, C.; Van Broeckhoven, C.; Sleegers, K. The genetic landscape of Alzheimer disease: Clinical implications and perspectives. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med Genet.* 2016, 18, 421–430.
80. Khanahmadi, M.; Farhud, D.D.; Malmir, M. Genetic of Alzheimer's disease: A narrative review article. *Iran. J. Public Health* 2015, 44, 892–901.
81. Li, N.M.; Liu, K.F.; Qiu, Y.J.; Zhang, H.H.; Nakanishi, H.; Qing, H. Mutations of beta-amyloid precursor protein alter the consequence of Alzheimer's disease pathogenesis. *Neural Regen. Res.* 2019, 14, 658–665.
82. Tcw, J.; Goate, A.M. Genetics of beta-Amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2017, 7, a024539.
83. Bi, C.; Bi, S.; Li, B. Processing of mutant beta-amyloid precursor protein and the clinicopathological features of familial Alzheimer's disease. *Aging Dis.* 2019, 10, 383–403. [CrossRef]
84. Dai, M.H.; Zheng, H.; Zeng, L.D.; Zhang, Y. The genes associated with early-onset Alzheimer's disease. *Oncotarget* 2018, 9, 15132–15143.
85. Zhao, J.; Liu, X.; Xia, W.; Zhang, Y.; Wang, C. Targeting amyloidogenic processing of APP in Alzheimer's disease. *Front. Mol. Neurosci.* 2020, 13, 137.
86. Cai, Y.; An, S.S.; Kim, S. Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders. *Clin. Interv. Aging* 2015, 10, 1163–1172.
87. Lanoiselee, H.M.; Nicolas, G.; Wallon, D.; Rovelet-Lecrux, A.; Lacour, M.; Rousseau, S.; Richard, A.C.; Pasquier, F.; Rollin-Sillaire, A.; Martinaud, O.; et al. APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Med.* 2017, 14, e1002270.
88. De Strooper, B. Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. *Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. Embo Rep.* 2007, 8, 141–146.
89. Kelleher, R.J., 3rd; Shen, J. Presenilin-1 mutations and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2017, 114, 629–631.

90. Walker, E.S.; Martinez, M.; Brunkan, A.L.; Goate, A. Presenilin 2 familial Alzheimer's disease mutations result in partial loss of function and dramatic changes in Abeta 42/40 ratios. *J. Neurochem.* 2005, 92, 294–301.
91. Kim, J.; Basak, J.M.; Holtzman, D.M. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 2009, 63, 287–303.
92. Liu, C.C.; Liu, C.C.; Kanekiyo, T.; Xu, H.; Bu, G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: Risk, mechanisms and therapy. *Nat. Rev. Neurol.* 2013, 9, 106–118.
93. Giau, V.V.; Bagyinszky, E.; An, S.S.; Kim, S.Y. Role of apolipoprotein E in neurodegenerative diseases. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2015, 11, 1723–1737.
94. Koldamova, R.; Fitz, N.F.; Lefterov, I. ATP-binding cassette transporter A1: From metabolism to neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* 2014, 72 Pt A, 13–21.
95. Nordestgaard, L.T.; Tybjaerg-Hansen, A.; Nordestgaard, B.G.; Frikke-Schmidt, R. Loss-of-function mutation in ABCA1 and risk of Alzheimer's disease and cerebrovascular disease. *Alzheimer's Dement. J. Alzheimer's Assoc.* 2015, 11, 1430–1438.
96. Foster, E.M.; Dangla-Valls, A.; Lovestone, S.; Ribe, E.M.; Buckley, N.J. Clusterin in Alzheimer's disease: Mechanisms, genetics, and lessons from other pathologies. *Front. Neurosci.* 2019, 13, 164.
97. Holler, C.J.; Davis, P.R.; Beckett, T.L.; Platt, T.L.; Webb, R.L.; Head, E.; Murphy, M.P. Bridging integrator 1 (BIN1) protein expression increases in the Alzheimer's disease brain and correlates with neurofibrillary tangle pathology. *J. Alzheimer's Dis. JAD* 2014, 42, 1221–1227.
98. Andrew, R.J.; De Rossi, P.; Nguyen, P.; Kowalski, H.R.; Recupero, A.J.; Guerbette, T.; Krause, S.V.; Rice, R.C.; Laury-Kleintop, L.; Wagner, S.L.; et al. Reduction of the expression of the late-onset Alzheimer's disease (AD) risk-factor BIN1 does not affect amyloid pathology in an AD mouse model. *J. Biol. Chem.* 2019, 294, 4477–4487.
99. Soler-Lopez, M.; Badiola, N.; Zanzoni, A.; Aloy, P. Towards Alzheimer's root cause: ECSIT as an integrating hub between oxidative stress, inflammation and mitochondrial dysfunction. Hypothetical role of the adapter protein ECSIT in familial and sporadic Alzheimer's disease pathogenesis. *Bioessays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 2012, 34, 532–541.
100. Soler-Lopez, M.; Zanzoni, A.; Lluís, R.; Stelzl, U.; Aloy, P. Interactome mapping suggests new mechanistic details underlying Alzheimer's disease. *Genome Res.* 2011, 21, 364–376.
101. Zhao, L.; Woody, S.K.; Chhibber, A. Estrogen receptor beta in Alzheimer's disease: From mechanisms to therapeutics. *Ageing Res. Rev.* 2015, 24, 178–190.
102. Sundermann, E.E.; Maki, P.M.; Bishop, J.R. A review of estrogen receptor alpha gene (ESR1) polymorphisms, mood, and cognition. *Menopause* 2010, 17, 874–886.
103. Goumidi, L.; Dahlman-Wright, K.; Tapia-Paez, I.; Matsson, H.; Pasquier, F.; Amouyel, P.; Kere, J.; Lambert, J.C.; Meirhaeghe, A. Study of estrogen receptor-alpha and receptor-beta gene polymorphisms on Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis. JAD* 2011, 26, 431–439.
104. Wainaina, M.N.; Chen, Z.; Zhong, C. Environmental factors in the development and progression of late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci. Bull.* 2014, 30, 253–270.
105. Grant, W.B.; Campbell, A.; Itzhaki, R.F.; Savory, J. The significance of environmental factors in the etiology of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis. JAD* 2002, 4, 179–189.
106. Moulton, P.V.; Yang, W. Air pollution, oxidative stress, and Alzheimer's disease. *J. Environ. Public Health* 2012, 2012, 472751.
107. Croze, M.L.; Zimmer, L. Ozone atmospheric pollution and Alzheimer's disease: From epidemiological facts to molecular mechanisms. *J. Alzheimer's Dis. JAD* 2018, 62, 503–522.

108. Hu, N.; Yu, J.T.; Tan, L.; Wang, Y.L.; Sun, L.; Tan, L. Nutrition and the risk of Alzheimer's disease. *Biomed. Res. Int.* 2013, 2013, 524820.
109. Abate, G.; Marziano, M.; Rungratanawanich, W.; Memo, M.; Uberti, D. Nutrition and AGE-ing: Focusing on Alzheimer's disease. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2017, 2017, 7039816.
110. Koyama, A.; Hashimoto, M.; Tanaka, H.; Fujise, N.; Matsushita, M.; Miyagawa, Y.; Hatada, Y.; Fukuhara, R.; Hasegawa, N.; Todani, S.; et al. Malnutrition in Alzheimer's disease, dementia with lewy bodies, and frontotemporal lobar degeneration: Comparison using serum albumin, total protein, and hemoglobin level. *PLoS ONE* 2016, 11, e0157053.
111. Adlard, P.A.; Bush, A.I. Metals and Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis. Jad* 2006, 10, 145–163.
112. Colomina, M.T.; Peris-Sampedro, F. Aluminum and Alzheimer's disease. *Adv. Neurobiol.* 2017, 18, 183–197.
113. Huat, T.J.; Camats-Perna, J.; Newcombe, E.A.; Valmas, N.; Kitazawa, M.; Medeiros, R. Metal toxicity links to Alzheimer's disease and neuroinflammation. *J. Mol. Biol.* 2019, 431, 1843–1868.
114. Sochocka, M.; Zwolinska, K.; Leszek, J. The infectious etiology of Alzheimer's disease. *Curr. Neuropharmacol.* 2017, 15, 996–1009.
115. Fulop, T.; Itzhaki, R.F.; Balin, B.J.; Miklossy, J.; Barron, A.E. Role of microbes in the development of Alzheimer's disease: State of the art—An international symposium presented at the 2017 IAGG congress in San Francisco. *Front. Genet.* 2018, 9, 362.
116. Stampfer, M.J. Cardiovascular disease and Alzheimer's disease: Common links. *J. Intern. Med.* 2006, 260, 211–223.
117. Santos, C.Y.; Snyder, P.J.; Wu, W.C.; Zhang, M.; Echeverria, A.; Alber, J. Pathophysiologic relationship between Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, and cardiovascular risk: A review and synthesis. *Alzheimer's Dement.* 2017, 7, 69–87.
118. De Bruijn, R.F.; Ikram, M.A. Cardiovascular risk factors and future risk of Alzheimer's disease. *BMC Med.* 2014, 12, 130.
119. Alford, S.; Patel, D.; Perakakis, N.; Mantzoros, C.S. Obesity as a risk factor for Alzheimer's disease: Weighing the evidence. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* 2018, 19, 269–280.
120. Pegueroles, J.; Jimenez, A.; Vilaplana, E.; Montal, V.; Carmona-Iragui, M.; Pane, A.; Alcolea, D.; Videla, L.; Casajoana, A.; Clarimon, J.; et al. Obesity and Alzheimer's disease, does the obesity paradox really exist? A magnetic resonance imaging study. *Oncotarget* 2018, 9, 34691–34698.
121. Lee, H.J.; Seo, H.I.; Cha, H.Y.; Yang, Y.J.; Kwon, S.H.; Yang, S.J. Diabetes and Alzheimer's disease: Mechanisms and nutritional aspects. *Clin. Nutr. Res.* 2018, 7, 229–240.
122. Singh, R.; Sadiq, N.M. Cholinesterase Inhibitors. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2020; Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544336/> (accessed on 8 December 2020).
123. Eldufani, J.; Blaise, G. The role of acetylcholinesterase inhibitors such as neostigmine and rivastigmine on chronic pain and cognitive function in aging: A review of recent clinical applications. *Alzheimers Dement* 2019, 5, 175–183.
124. Wang, R.; Reddy, P.H. Role of glutamate and NMDA receptors in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis. Jad* 2017, 57, 1041–1048.
125. Kuns, B.; Rosani, A.; Varghese, D. Memantine. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2020. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500025/> (accessed on 8 December 2020).

126. Kumar, A.; Sharma, S. Donepezil. In StatPearls; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2020. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513257/> (accessed on 8 December 2020).
127. Briggs, R.; Kennelly, S.P.; O'Neill, D. Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clin. Med.* 2016, 16, 247–253.
128. Crous-Bou, M.; Minguillon, C.; Gramunt, N.; Molinuevo, J.L. Alzheimer's disease prevention: From risk factors to early intervention. *Alzheimer's Res. Ther.* 2017, 9, 71.
129. Anand, P.; Singh, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Arch. Pharmacol. Res.* 2013, 36, 375–399.
130. Sharma, K. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Mol. Med. Rep.* 2019, 20, 1479–1487.
131. Crismon, M.L. Tacrine: First drug approved for Alzheimer's disease. *Ann. Pharmacother.* 1994, 28, 744–751.
132. Qizilbash, N.; Birks, J.; Lopez Arrieta, J.; Lewington, S.; Szeto, S. Tacrine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2000, CD000202.
133. Ferreira-Vieira, T.H.; Guimaraes, I.M.; Silva, F.R.; Ribeiro, F.M. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr. Neuropharmacol.* 2016, 14, 101–115.
134. Schumacher M, Camp S, Maulet Y, Newton M, MacPhee-Quigley K, Taylor SS, Friedmann T, Taylor P, *Nature* 319 (1986) 407-9.
135. Guo L, Theses, Dissertations, Professional Papers (2008) 421.
136. Jeger RV, *European Heart Journal* 34 (2013) 2580-2581
137. Cacabelos, R. Donepezil in Alzheimer's disease: From conventional trials to pharmacogenetics. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2007, 3, 303–333.
138. Kumar, A.; Sharma, S. Donepezil. In StatPearls; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2020. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513257/> (accessed on 8 December 2020).
139. Annicchiarico, R.; Federici, A.; Pettenati, C.; Caltagirone, C. Rivastigmine in Alzheimer's disease: Cognitive function and quality of life. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2007, 3, 1113–1123.
140. Khoury, R.; Rajamanickam, J.; Grossberg, G.T. An update on the safety of current therapies for Alzheimer's disease: Focus on rivastigmine. *Ther. Adv. Drug Saf.* 2018, 9, 171–178.
141. Birks, J.; Grimley Evans, J.; Iakovidou, V.; Tzolaki, M.; Holt, F.E. Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2009, CD001191.
142. Scott, L.J.; Goa, K.L. Galantamine: A review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs* 2000, 60, 1095–1122.
143. Kim, J.K.; Park, S.U. Pharmacological aspects of galantamine for the treatment of Alzheimer's disease. *Excli J.* 2017, 16, 35–39.
144. Wahba, S.M.; Darwish, A.S.; Kamal, S.M. Ceria-containing uncoated and coated hydroxyapatite-based galantamine nanocomposites for formidable treatment of Alzheimer's disease in ovariectomized albino-rat model. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2016, 65, 151–163.
145. Liu, J.; Chang, L.; Song, Y.; Li, H.; Wu, Y. The role of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.* 2019, 13, 43.

146. Huang, Y.J.; Lin, C.H.; Lane, H.Y.; Tsai, G.E. NMDA Neurotransmission dysfunction in behavioral and psychological symptoms of Alzheimer's disease. *Curr. Neuropharmacol.* 2012, 10, 272–285.
147. Companys-Aleman, J.; Turcu, A.L.; Bellver-Sanchis, A.; Loza, M.I.; Brea, J.M.; Canudas, A.M.; Leiva, R.; Vazquez, S.; Pallas, M.; Grinan-Ferre, C. A novel NMDA receptor antagonist protects against cognitive decline presented by senescent mice. *Pharmaceutics* 2020, 12, 284.
148. Parsons CG, Danysz W, Quack G. Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist: review of preclinical data. *Neuropharmacol.* 1999; 38: 735.
149. Sontag, E., Hladik, C., Montgomery, L., Luangpirom, A., Mudrak, I., Ogris, E. and White III, C.L. (2004) Downregulation of protein phosphatase 2A carboxyl methylation and methyltransferase may contribute to Alzheimer disease pathogenesis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 1080–1091.
150. Mobius H. Pharmacological Rationale for Memantine in Chronic Cerebral Hypoperfusion, Especially Vascular Dementia. *Alzheimer Disease and Associated Disorders* 1999;13: 172-8.
151. McShane R., Areosa S., Minakaran N. Memantine for Dementia. *The Cochrane Library* 2009; 1: 1-43.
152. Zhao, W.Q., Feng, C. and Alkon, D.L. (2003) Impairment of phosphatase 2A contributes to the prolonged MAP kinase phosphorylation in Alzheimer's disease fibroblasts. *Neurobiol. Dis.* 14, 458–469.
153. Lee, J. and Stock, J. (1993) Protein phosphatase 2A catalytic subunit is methyl-esterified at its carboxyl terminus by a novel methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 268, 19192–19195.
154. Tolstykh, T., Lee, J., Vafai, S. and Stock, J.B. (2000) Carboxyl methylation regulates phosphoprotein phosphatase 2A by controlling the association of regulatory B subunits. *EMBO J.* 19, 5682–5691.
155. Santacruz, K., Lewis, J., Spies, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., Guimaraes, A., DeTure, M., Ramsden, M., McGowan, E., Forster, C., Yue, M., Orne, J., Janus, C., Mariash, A., Kuskowski, M., Hyman, B., Hutton, M. and Ashe, K.H. (2005) Tau suppression in a neurodegenerative Mouse model improves memory function. *Science* 309, 476–481.
156. Deardorff WJ, Grossberg GT. A fixed-dose combination of memantine extended-release and donepezil in the treatment of moderate-to-severe Alzheimer's disease. *Drug Des Devel Ther.* 2016 Oct 3; 10:3267-3279. Review. PubMed PMID: 27757016; PubMed Central PMCID: PMC5055113.
157. Birnbaum JH, Bali J, Rajendran L, Nitsch RM, Tackenberg C. Calcium flux-independent NMDA receptor activity is required for Aβ oligomer-induced synaptic loss. *Cell Death Dis.* 2015 Jun 18;6: e1791. Doi: 10.1038/cddis.2015.160. PubMed PMID: 26086964; PubMed Central PMCID: PMC4669839.
158. Demirdaş A, Nazıroğlu M, Övey İS. Duloxetine Reduces Oxidative Stress, Apoptosis, and Ca (2+) Entry Through Modulation of TRPM2 and TRPV1 Channels in the Hippocampus and Dorsal Root Ganglion of Rats. *Mol Neurobiol.* 2016 Jul 21. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27443158.
159. Charkhkar H, Meyyappan S, Matveeva E, Moll JR, McHail DG, Peixoto N, Cliff RO, Pancrazio JJ. Amyloid beta modulation of neuronal network activity in vitro. *Brain Res.* 2015 Dec 10; 1629:1-9. doi: 10.1016/j.brainres.2015.09.036. PubMed PMID: 26453830.
160. Prentice H, Modi JP, Wu JY. Mechanisms of Neuronal Protection against Excitotoxicity, Endoplasmic Reticulum Stress, and Mitochondrial Dysfunction in Stroke and Neurodegenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 2015:964518. Doi: 10.1155/2015/964518. Review. PubMed PMID: 26576229; PubMed Central PMCID: PMC4630664.
161. Jarvis B, Figgitt DP. Memantine, *Drugs & Aging*, 2003; 20: 465-76.
162. Palmer GC: Neuroprotection by NMDA receptor antagonists in a variety of neuropathologies. *Current Drug Targets* 2001; 2: 241-271.

163. Kashiwagi K, Masuko T, Nguyen CD, Kuno T, Tanaka I, Igarashi K, Williams K: Channel blockers acting at N-methyl-D-aspartate receptors: differential effects of mutations in the vestibule and ion channel pore. *Molecular pharmacology* 2002;61: 533-45.
164. Blanpied TA, Boeckman FA, Aizenman E, Johnson JW: Trapping channel block of NMDA-activated responses by amantadine and memantine. *Journal of neurophysiology* 1997;77: 309-23.
165. Tremblay R, Chakravarthy B, Hewitt K, et al. Transient NMDA receptor inactivation provides long-term protection to cultured cortical neurons from a variety of death signals. *J Neurosci.* 2000; 20:7183–92.
166. Gold M, Koczulla AR, Mengel D, Koepke J, Dodel R, Dontcheva G, Habib P, Bach JP. Reduction of glutamate-induced excitotoxicity in murine primary neurons involving calpain inhibition. *J Neurol Sci.* 2015 Dec 15;359(1-2):356- 62. doi: 10.1016/j.jns.2015.11.016. PubMed PMID: 26671142.
167. Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol.* 2013 Jan 5;698(1-3):6-18. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.10.032. Review. PubMed PMID: 23123057.
168. Reisberg B, Doody R, Stofler A et al., “Memantine in moderate-to-severe Alzheimer’s disease”, *N Engl J Med* (2003);348: pp. 1333–1341.
169. Winblad B, Jones RW, Wirth Y, et al. Memantine in moderate to severe Alzheimer’s disease: a meta-analysis of randomised clinical trials. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2007; 24:20–7.
170. Floden AMS, Li S, Combs CK. B-amyloid-stimulated microglia induce neuron death via synergistic stimulation of tumor necrosis factor  $\alpha$  and NMDA receptors. *J Neurosci.* 2005; 25:2566–75.
171. Rimante M., Pradeep B., Heikki T.; Memantin Improves Spatial Learning in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2004; 311: 677-82.
172. Culmsee C., Junker V., Kremers W., Thal S., Kriegstein P&J.; Combination Therapy in Ischemic Stroke: Synergistic Neuroprotective Effects of Memantine and Clenbuterol. *Stroke-Journal of American Heart Association* 2004;35: 1197-202.
173. Berrino L., Oliva P., Massimo F., Aurilio C., Maione S., Grella A., Antinociceptive effect in mice of intraperitoneal N-methyl-D-aspartate Receptor Antagonists in the Formalin Test. *European Journal of Pain* 2003; 7:131-7.
174. Lipton SA: Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRx the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2004; 1: 101-10.
175. Kilpatrick GJ, Tilbrook GS: Memantine. *Merz. Current Opinion Investigation Drugs* 2002; 3: 798-806.
176. Yiannopoulou, K.G.; Papageorgiou, S.G. Current and future treatments in Alzheimer disease: An update. *J. Cent. Nerv. Syst. Dis.* 2020, 12.
177. Huang, L.K.; Chao, S.P.; Hu, C.J. Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease. *J. Biomed. Sci.* 2020, 27, 18.
178. Tolar, M.; Abushakra, S.; Hey, J.A.; Porsteinsson, A.; Sabbagh, M. Aducanumab, gantenerumab, BAN2401, and ALZ-801-the first wave of amyloid-targeting drugs for Alzheimer’s disease with potential for near term approval. *Alzheimer’s Res. Ther.* 2020, 12, 95.
179. Mayeux, R.; Stern, Y. Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012, 2, a006239.

180. Galimberti, D.; Scarpini, E. Disease-modifying treatments for Alzheimer's disease. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 2011, 4, 203–216.
181. Ghezzi, L.; Scarpini, E.; Galimberti, D. Disease-modifying drugs in Alzheimer's disease. *Drug Des. Dev. Ther.* 2013, 7, 1471–1478.
182. Medina, M. An Overview on the clinical development of tau-based therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 1160.
183. Davidowitz, E.J.; Krishnamurthy, P.K.; Lopez, P.; Jimenez, H.; Adrien, L.; Davies, P.; Moe, J.G. In vivo validation of a small molecule inhibitor of tau self-association in htau mice. *J. Alzheimer's Dis. Jad* 2020, 73, 147–161.
184. Repalli, J.; Meruelo, D. Screening strategies to identify HSP70 modulators to treat Alzheimer's disease. *Drug Des. Dev. Ther.* 2015, 9, 321–331.
185. Li, X.; Shao, H.; Taylor, I.R.; Gestwicki, J.E. Targeting allosteric control mechanisms in heat shock protein 70 (Hsp70). *Curr. Top. Med. Chem.* 2016, 16, 2729–2740.
186. Abisambra, J.; Jinwal, U.K.; Miyata, Y.; Rogers, J.; Blair, L.; Li, X.; Seguin, S.P.; Wang, L.; Jin, Y.; Bacon, J.; et al. Allosteric heat shock protein 70 inhibitors rapidly rescue synaptic plasticity deficits by reducing aberrant tau. *Biol. Psychiatry* 2013, 74, 367–374.
187. Campanella, C.; Pace, A.; Caruso Bavisotto, C.; Marzullo, P.; Marino Gammazza, A.; Buscemi, S.; Palumbo Piccionello, A. Heat shock proteins in Alzheimer's disease: Role and targeting. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 2603.
188. Bohush, A.; Bieganski, P.; Filipek, A. Hsp90 and its co-chaperones in neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 4976.
189. Wang, B.; Liu, Y.; Huang, L.; Chen, J.; Li, J.J.; Wang, R.; Kim, E.; Chen, Y.; Justicia, C.; Sakata, K.; et al. A CNS-permeable Hsp90 inhibitor rescues synaptic dysfunction and memory loss in APP-overexpressing Alzheimer's mouse model via an HSF1-mediated mechanism. *Mol. Psychiatry* 2017, 22, 990–1001.
190. Li, J.G.; Chiu, J.; Ramanjulu, M.; Blass, B.E.; Pratico, D. A pharmacological chaperone improves memory by reducing Aβ and tau neuropathology in a mouse model with plaques and tangles. *Mol. Neurodegener.* 2020, 15, 1.
191. Vagnozzi, A.N.; Li, J.G.; Chiu, J.; Razmpour, R.; Warfield, R.; Ramirez, S.H.; Pratico, D. VPS35 regulates tau phosphorylation and neuropathology in tauopathy. *Mol. Psychiatry* 2019.
192. Mecozzi, V.J.; Berman, D.E.; Simoes, S.; Vetanovetz, C.; Awal, M.R.; Patel, V.M.; Schneider, R.T.; Petsko, G.A.; Ringe, D.; Small, S.A. Pharmacological chaperones stabilize retromer to limit APP processing. *Nat. Chem. Biol.* 2014, 10, 443–449.
193. Knight, E.M.; Williams, H.N.; Stevens, A.C.; Kim, S.H.; Kottwitz, J.C.; Morant, A.D.; Steele, J.W.; Klein, W.L.; Yanagisawa, K.; Boyd, R.E.; et al. Evidence that small molecule enhancement of beta-hexosaminidase activity corrects the behavioral phenotype in Dutch APP(E693Q) mice through reduction of ganglioside-bound Aβ. *Mol. Psychiatry* 2015, 20, 109–117.
194. Andrade, S.; Ramalho, M.J.; Loureiro, J.A.; Pereira, M.D.C. Natural compounds for Alzheimer's disease therapy: A systematic review of preclinical and clinical studies. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 2313.
195. Ma, Y.; Yang, M.W.; Li, X.W.; Yue, J.W.; Chen, J.Z.; Yang, M.W.; Huang, X.; Zhu, L.L.; Hong, F.F.; Yang, S.L. Therapeutic effects of natural drugs on Alzheimer's disease. *Front. Pharmacol.* 2019, 10, 1355.
196. Li J, Wuliji O, Li W, Jiang ZG, Ghanbari HA. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *International Journal of Molecular Sciences.* 2013; 14(12): 24438–24475.

197. Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, et al. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Molecular Neurobiology*. 2016; 53(6): 4094–4125.
198. Zhang DX, Gutterman DD. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2007; 292(5): H2023–H203.
199. Babior BM. NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology*. 2004; 16(1): 42–47.
200. Ushio-Fukai M. VEGF signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2007; 9(6): 731–739.
201. Li X. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Hematol Oncol*. 2013;6.
202. Gutteridge JMC. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem. Biol. Interact*. 1994; 91: 133-140.
203. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*. 2004; 266(1-2): 37-56.
204. Lloyd RV, Hanna PM, Mason RP. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997; 22(5): 885–888.
205. Young IS, Woodside J V. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*. 2001; 54: 176-186.
206. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*. 1993; 49: 479-93.
207. Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012; 428010: 11.
208. Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR. Elevated thiobarbituric acidreactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology*. 1995; 45(8): 1594–1601.
209. Morales-González JA. Oxidative Stress and Diseases. In *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases- A Role for Antioxidants*; 2013. p. 364-365.
210. Butterfield DA, Kanski J. Methionine residue 35 is critical for the oxidative stress and neurotoxic properties of Alzheimer's amyloid beta peptide 1-42. *Peptides* 2002; 23 (7): 1299–1309.
211. Misiti F, Clementi ME, Giardina B. Oxidation of methionine 35 reduces toxicity of the amyloid beta-peptide (1-42) in neuroblastoma cells (imr-32) via enzyme methionine sulfoxide reductase a expression and function. *Neurochem Int* 2010; 56 (4): 597–602.
212. Varadarajan S, Kanski J, Aksenova M, Lauderback C, Butterfield DA. Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's a beta (1--42) and a beta (25--35). *J Am Chem Soc* 2001; 123 (24): 5625–5631.
213. Barnham KJ, Ciccotosto GD, Tickler AK et al. Neurotoxic, redox competent Alzheimer's beta-amyloid is released from lipid membrane by methionine oxidation. *J Biol Chem* 2003; 278 (44): 42959–42965.
214. Friedemann M, Helk E, Tiiman A, Zovo K, Palumaa P, Tougu V. Effect of methionine-35 oxidation on the aggregation of amyloid-beta peptide. *Biochem Biophys Rep* 2015; 3: 94–99.
215. Hurson M, Corish C. Evaluation of lifestyle, food consumption and nutrient intake patterns among Irish teenagers. *Ir J Med Sci* 1997; 166 (4): 225–230.

216. Klein JA, Ackerman SL. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest* 2003; 111 (6): 785–793.
217. Jasinka R, Rakowska M, Lenart J, Komanska I, Pikuta S. Non enzymatically evoked and cytochrome p450-dependent lipid peroxidation inhibits synthesis of phosphatidylethanolamine via the ethanolamine base exchange reaction in rat liver microsomes. *FEBS J* 1996; 386 (1): 33–38.
218. Dudka J, Burdan F, Korga A et al. Intensification of doxorubicin related oxidative stress in the heart by hypothyroidism is not related to the expression of cytochrome p450 nadph-reductase and inducible nitric oxide synthase, as well as activity of xanthine oxidase. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 2012: 139327.
219. Zigdon H, Kogot-Levin A, Park JW et al. Ablation of ceramide synthase 2 causes chronic oxidative stress due to disruption of the mitochondrial respiratory chain. *J Biol Chem* 2013; 288 (7): 4947–4956.
220. Yoshikawa S, Muramoto K, Shinzawa-Itoh K. The  $\alpha$  (2) reduction and proton pumping gate mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1807 (10): 1279–1286.
221. Cifuentes D, Poittevin M, Dere E et al. Hypertension accelerates the progression of Alzheimer-like pathology in a mouse model of the disease. *Hypertension* 2015; 65 (1): 218–224.
222. Choi DH, Lee J. A mini-review of the nadph oxidases in vascular dementia: Correlation with nox and risk factors for vad. *Int J Mol Sci* 2017; 18 (11).
223. Belarbi K, Cuvelier E, Destee A, Gressier B, Chartier-Harlin MC. Nadph oxidases in parkinson's disease: A systematic review. *Mol Neurodegener* 2017; 12 (1): 017–0225.
224. Austin SA, Katusic ZS. Loss of endothelial nitric oxide synthase promotes p25 generation and tau phosphorylation in a murine model of Alzheimer's disease. *Circ Res* 2016; 119 (10): 1128–1134.
225. Hwang AB, Jeong DE, Lee SJ. Mitochondria and organismal longevity. *Curr Genomics* 2012; 13 (7): 519–532.
226. Wang Y, Wu Y, Luo K et al. The protective effects of selenium on cadmium-induced oxidative stress and apoptosis via mitochondrial pathway in mice kidney. *Food Chem Toxicol* 2013; doi: 10.1016/j.fct.2013.04.013.
227. Nesi G, Sestito S, Digiacoio M, Rapposelli S. Oxidative stress, mitochondrial abnormalities and proteins deposition: Multitarget approaches in Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem* 2017; 17 (27): 3062–3079.
228. Area-Gomez E, Del Carmen Lara Castillo M, Tambini MD et al. Upregulated function of mitochondria-associated membranes in Alzheimer disease. *EMBO J* 2012; 32 (21): 4106–4123.
229. Schon EA, Area-Gomez E. Is Alzheimer's disease a disorder of mitochondria-associated membranes? *J Alzheimers Dis* 2010; 20 (Suppl2): S281–S292.
230. Gu XM, Huang HC, Jiang ZF. Mitochondrial dysfunction and cellular metabolic deficiency in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull* 2012; 28 (5): 631–640.
231. Hu Y, Li XC, Wang ZH et al. Tau accumulation impairs mitophagy via increasing mitochondrial membrane potential and reducing mitochondrial parkin. *Oncotarget* 2016; 7 (14): 17356–17368.
232. Gille JJ, Joenje H. Cell culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia. *Mutat Res*. 1992; 275: 405–414.
233. Halliwell B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Letters*. 2003; 540: 3–6.
234. Ricart KC, Fisman ML. Hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in cultured cortical cells grown in serum-free and serum-containing media. *Neurochem Res*. 2001; 26: 801808.

235. Lesuisse C, Mart'in LJ. Long-term culture of mouse cortical neurons as a model for neuronal development, aging, and death. *J Neurobiol.* 2002; 51: 9-23.
236. Hirrlinger J, Hamprecht B, Dringen R. Application and modulation of a permanent hydrogen peroxide-induced oxidative stress to cultured astroglial cells. *Brain Res Brain Res Protoc.* 1999; 4: 223-229.
237. Almeida A, Ciudad P, Bolanos JP. Nitric oxide accounts for an increased glycolytic rate in activated astrocytes through a glycogenolysis-independent mechanism. *Brain Res.* 2002; 945: 131-134.
238. Harris ME, Wang Y, Pedigo NW, Hensley K, Butterfield DA, Carney JM. Amyloid beta peptide (25-35) inhibits Na<sup>+</sup>-dependent glutamate uptake in rat hippocampal astrocyte cultures. *J Neurochem.* 1996; 67: 277-286.
239. Butterfield DA. Alzheimer's disease: A disorder of oxidative stress. *Alzheimer's Dis Rev.* 1996; 1: 68-70.
240. Butterfield DA, Yatin SM, Varadarajan S, Koppal T. Amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress, neurotoxicity, and Alzheimer's disease. *Methods Enzymol.* 1999; 309: 746-768.
241. Garcia M, Vanhoutte P, Pages C, Besson MJ, Brouillet E, Caboche J. The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces striatal neurodegeneration via a c-Jun N-terminal kinase/c-Jun module. *J Neurosci.* 2002; 22: 2174-2184.
242. Teunissen CE, Markerink-van Ittersum M, de Bruijn C, Steinbusch HW, de Vente J. Evaluation of 3-nitrotyrosine as a marker for 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in Lewis and Wistar rats and strain-specific whole brain spheroid cultures. *Brain Res.* 2002; 931: 5-20.
243. Carrasco E, Werner P. Selective destruction of dopaminergic neurons by low concentrations of 6-OHDA and MPP<sup>+</sup>: protection by acetylsalicylic acid aspirin. *Parkinsonism Relat Disord.* 2002; 8: 407-411.
244. Grunblatt E, Mandel S, Gassen M, Youdim MB. Potent neuroprotective and antioxidant activity of apomorphine in MPTP and 6-hydroxydopamine induced neurotoxicity. *J Neural Transm Suppl.* 1999; 55: 57-70.
245. Speciale SG. MPTP: insights into parkinsonian neurodegeneration. *Neurotoxicol Teratol.* 2002; 24: 607-620.
246. Erdoğan MA, Taşkiran D. Rotenon ile İndüklenen İn Vitro Parkinson Hastalığı Modelinde Glukagon Benzeri Peptid-1 Analogu Ekzenatidin Nöron Sağkalımına Etkisi. *SdÜ Sağlık Bilimleri Dergisi.* 2019; 10(4): 362-368.
247. Albayrak A. Glioblastoma hücresinde hidrojen peroksit ile oluşturulan oksidatif Streste quercetin ve donepezilin hücre canlılığı üzerindeki etkinliğinin araştırılması [doktora tezi]. Kahramanmaraş: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi; 2022.
248. Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers ArchivEuropean Journal of Physiology.* 2010; 459(6): 923-939.
249. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 1990; 280: 1-8.
250. Tsao, R.; Yang, R.; Young, J.C.; Zhu, H. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 6347-6353.
251. J. P. E. Spencer, M. M. Abd El Mohsen, A.-M. Minihaane, and J. C. Mathers, "Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research," *British Journal of Nutrition*, vol. 99, no. 1, pp. 12–22, 2008.

252. G. R. Beecher, "Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake," *Journal of Nutrition*, vol. 133, no. 10, pp. 3248S–3254S, 2003.
253. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L: Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004, 79:727–747.
254. K. B. Pandey and S. I. Rizvi, "Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2, no. 5, pp. 270–278, 2009.
255. S. Tanigawa, M. Fujii, and D.-X. Hou, "Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 42, no. 11, pp. 1690–1703, 2007.
256. L. F. M. F. Cardozo, L. M. Pedruzzi, P. Stenvinkel et al., "Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2," *Biochimie*, vol. 95, no. 8, pp. 1525–1533, 2013.
257. J. J. Macheix, A. Fleuriet, and J. Billot, *Fruit Phenolics*, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 1990.
258. M. D'Archivio, C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovannini, and R. Masella, "Polyphenols, dietary sources and bioavailability," *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita'*, vol. 43, no. 4, pp. 348–361, 2007.
259. S. Possemiers, S. Bolca, W. Verstraete, and A. Heyerick, "The intestinal microbiome: a separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals," *Fitoterapia*, vol. 82, no. 1, pp. 53–66, 2011.
260. Cardona F, Lacueva-Andres C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuno MI. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J Nutr Biochem*. 2013; 24:1415-22.
261. J. K. Willcox, S. L. Ash, and G. L. Catignani, "Antioxidants and prevention of chronic disease," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 44, no. 4, pp. 275–295, 2004.
262. K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, and D. J. Bobilya, "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 13, no. 10, pp. 572–584, 2002.
263. A. Mishra, S. Kumar, and A. K. Pandey, "Scientific validation of the medicinal efficacy of *Tinospora cordifolia*," *The Scientific World Journal*, vol. 2013, Article ID 292934, 8 pages, 2013.
264. S. Kumar, U. K. Sharma, A. K. Sharma, and A. K. Pandey, "Protective efficacy of *Solanum xanthocarpum* root extracts against free radical damage: phytochemical analysis and antioxidant effect," *Cellular and Molecular Biology*, vol. 58, no. 1, pp. 174–181, 2012.
265. A. Mishra, A. K. Sharma, S. Kumar, A. K. Saxena, and A. K. Pandey, "Bauhinia variegata leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities," *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 915436, 10 pages, 2013.
266. P. I. Oteiza, A. G. Erlejman, S. V. Verstraeten, C. L. Keen, and C. G. Fraga, "Flavonoid-membrane interactions: a protective role of flavonoids at the membrane surface?" *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 12, no. 1, pp. 19–25, 2005.
267. R. J. Nijveldt, E. van Nood, D. E. C. Van Hoorn, P. G. Boelens, K. van Norren, and P. A. M. van Leeuwen, "Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 74, no. 4, pp. 418–425, 2001.
268. B. S. Cheon, Y. H. Kim, K. S. Son, H. W. Chang, S. S. Kang, and H. P. Kim, "Effects of prenylated flavonoids and biflavonoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production from the mouse macrophage cell line RAW 264.7," *Planta Medica*, vol. 66, no. 7, pp. 596–600, 2000.

269. A. Sarkar and A. Bhaduri, "Black tea is a powerful chemopreventor of reactive oxygen and nitrogen species: comparison with its individual catechin constituents and green tea," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 284, no. 1, pp. 173–178, 2001.
270. J. Hong, T. J. Smith, C.-T. Ho, D. A. August, and C. S. Yang, "Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues," *Biochemical Pharmacology*, vol. 62, no. 9, pp. 1175–1183, 2001.
271. A. Nagao, M. Seki, and H. Kobayashi, "Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids," *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 63, no. 10, pp. 1787–1790, 1999.
272. Birkova A; Cizmarova B, Hubkova B; Marekova M: Polyphenols as neuroprotective agents which contribute to the reduction of anxiety and the management of depression. In *Functional Foods and Mental Health*. 1st edition. Edited by Martirosyan DM and Naidoo U. Dallas: Food Science Publisher 2019:176-200.
273. Teixeira J; Gaspar A, Garrido EM; Garrido J, Borges F: Hydroxycinnamic acid antioxidants, An electrochemical overview. *Bio Med Res In* 2013, 2013:1-11.
274. Del Rio D; Rodriguez-Mateos A; Spencer JP, Tognolini M; Borges G, Crozier A: Dietary (poly)phenolics in human health: structures; bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal* 2013, 18(14):1818- 1892.
275. Lindsay D, Clifford M: Chlorogenic acids and other cinnamates – nature; occurrence, dietary burden; absorption and metabolism. *J Sci Food Agric* 2000, 80(7):1033-1043.
276. Olthof MR, Hollman PC, Katan MB: Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr* 2001, 131(1):66-71.
277. Keshari AK, Verma AK, Kumar T, Srivastava R: Oxidative stress: a review. *Int J Sci Technol* 2015, 3(7):155-162.
278. Laranjinha J, Vierira O, Almeida L, Madeira V: Inhibition of metmyoglobin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- dependent low density lipoprotein lipid peroxidation by naturally occurring phenolic acids. *Biochem Pharmacol* 1996, 51:395–402.
279. Fukumoto LR, Mazza G: Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 2000, 48:3597–3604.
280. Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, Sugawara M et al.: In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int J Pharm* 2011, 403(1-2):136-138.
281. Kanimozhi G, Prasad NR: Anticancer Effect of Caffeic Acid on Human Cervical Cancer Cells. In: *Coffee in Health and Disease Prevention* 2015, 655-661.
282. Kabala-Dzik A, Rzepecka-Stojko A, Kubina R, Jastrzębska-Stojko Ż, Stojko R, Wojtyczka RD, Stojko J: Migration Rate Inhibition of Breast Cancer Cells Treated by Caffeic Acid and Caffeic Acid Phenethyl Ester: An In Vitro Comparison Study. *Nutrients* 2017, 9(10): E1144.
283. Dziedzic A, Kubina R, Kabala-Dzik A, Wojtyczka RD, Morawiec T, Buldak RJ: Caffeic acid reduces the viability and migration rate of oral carcinoma cells (SCC-25) exposed to low concentrations of ethanol. *Int J Mol Sci* 2014, 15:18725–18741.
284. Dziedzic A, Kubina R, Kabala-Dzik A, Tanasiewicz M: Induction of cell cycle arrest and apoptotic response of head and neck squamous carcinoma cells (Detroit 562) by caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester derivative. *Evid Based Complement Altern Med* 2017, 2017:6793456.
285. Rosendahl AH, Perks CM, Zeng L, Markkula A, Simonsson M, Rose C, Ingvar C et al. Caffeine and caffeic acid inhibit growth and modify estrogen receptor and insulin-like growth factor i receptor levels in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2015, 21:1877– 1887.

286. Espindola KMM, Ferreira RG, Narvaez LEM, Silva Rosario ACR da Silva AHM, Silva AGB, Vieira APO et al.: Chemical and Pharmacological Aspects of Caffeic Acid and Its Activity in Hepatocarcinoma. *Front Oncol* 2019, 9:541.
287. Winblad B, Poritis N, “Memantine in severe dementia: results of the 9M Best Study (benefit and efficacy in severely demented patients during treatment with memantine)”, *Int J Geriatr Psychiatry* (1999);14: pp. 135–146
288. Tariot PN, Farlow MR, Grossberg GT et al., “Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial”, *JAMA* (2004);291: pp. 317–324.
289. Chen H-SV, Pellegrini JW, Aggarwal SK, et al. Open-channel block of N-methyl-D-aspartate responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J Neurosci* 1992 Nov; 12 (11): 4427-36
290. Weller M, Finiels-Marlier F, Paul SM. NMDA receptor-mediated glutamate toxicity of cultured cerebellar, cortical and mesencephalic neurons: neuroprotective properties of amantadine and memantine. *Brain Res* 1993 Jun 4; 613 (1): 143-8
291. Pellegrini JW, Lipton SA. Delayed administration of memantine prevents N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity. © 2006 Adis Data Information BV. All rights reserved. *Drugs* 2006; 66 (11) ty. *Ann Neurol* 1993 Apr; 33 (4): 403-7
292. Erdős SL, Schäfer M. Memantine is highly potent in protecting cortical cultures against excitotoxic cell death evoked by glutamate and N-methyl-D-aspartate. *Eur J Pharmacol* 1991 Jun 6; 198 (2-3): 215-7
293. Li L, Sengupta A, Haque N, et al. Memantine inhibits and reverses the Alzheimer type abnormal hyperphosphorylation of tau and associated neurodegeneration. *FEBS Lett* 2004 May 21; 566 (1-3): 261-9
294. Rogawski MA, Wenk GL. The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer’s disease. *CNS Drug Rev* 2003 Fall; 9 (3): 275-308
295. Miguel-Hidalgo JJ, Alvarez XA, Cacabelos R, et al. Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by  $\beta$ -amyloid (1-40). *Brain Res* 2002 Dec 20; 958 (1): 210-21
296. Minkeviciene R, Banerjee P, Tanila H. Memantine improves spatial learning in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2004 Jun 10; 311 (2): 677-82
297. Fischer PA, Jacobi P, Schneider E, Schonberger B. Effects of intravenous administration of memantine in parkinsonian patients. *Arzneimittelforschung*. 1977;27(7):1487–1489.
298. Takeda H, Tsuji M, Inayu M, Egashira T, Matsumiya T: Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *Eur J Pharmacol* 2002, 449(3):261-267.
299. Mehrotra A, Shanbhag R, Chamallamudi MR, Singh VP and Mudgal J: Ameliorative effect of caffeic acid against inflammatory pain in rodents. *Eur J Pharmacol* 666: 80-86, 2011.
300. Taram, F.; Winter, A.N.; Linseman, D.A. Neuroprotection comparison of chlorogenic acid and its metabolites against mechanistically distinct cell death-inducing agents in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res*. 2016, 1648 Pt A, 69–80.
301. Colín-González, A.L.; Sánchez-Hernández, S.; De Lima, M.E.; Ali, S.F.; Chavarría, A.; Villeda, J.; Santamaría, A. Protective effects of caffeic acid on quinolinic acid-induced behavioral and oxidative alterations in rats. *J. Drug Alcohol Res*. 2015, 4, 1–5.
302. Izuta, H.; Shimazawa, M.; Tazawa, S.; Araki, Y.; Mishima, S.; Hara, H. Protective effects of Chinese propolis and its component, chrysin, against neuronal cell death via inhibition of mitochondrial apoptosis pathway in SH-SY5Y cells. *J. Agric. Food Chem*. 2008, 56, 8944–8953.

303. Omar, S.H.; Scott, C.J.; Hamlin, A.S.; Obied, H.K. Biophenols: Enzymes ( $\beta$ -secretase, Cholinesterases, histone deacetylase and tyrosinase) inhibitors from olive (*Olea europaea* L.). *Fitoterapia* 2018, 128, 118–129.
304. Sul, D.; Kim, H.S.; Lee, D.; Joo, S.S.; Hwang, K.W.; Park, S.Y. Protective effect of caffeic acid against beta-amyloid-induced neurotoxicity by the inhibition of calcium influx and tau phosphorylation. *Life Sci.* 2009, 84, 257–262.
305. Deshmukh, R.; Kaundal, M.; Bansal, V. Samardeep, Caffeic acid attenuates oxidative stress, learning and memory deficit in intra-cerebroventricular streptozotocin induced experimental dementia in rats. *Biomed. Pharmacother.* 2016, 81, 56–62.
306. Anwar, J.; Spanevello, R.M.; Thomé, G.; Stefanello, N.; Schmatz, R.; Gutierrez, J.; Vieira, J.; Baldissarelli, J.; Carvalho, F.B.; da Rosa, M.M.; et al. Effects of caffeic acid on behavioral parameters and on the activity of acetylcholinesterase in different tissues from adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2012, 103, 386–394.
307. Dos Santos Sales, Í.M.; do Nascimento, K.G.; Feitosa, C.M.; Saldanha, G.B.; Feng, D.; de Freitas, R.M. Caffeic acid effects on oxidative stress in rat hippocampus after pilocarpine-induced seizures. *Neurol. Sci.* 2011, 32, 375–380.
308. Wang, Y.; Wang, Y.; Li, J.; Hua, L.; Han, B.; Zhang, Y.; Yang, X.; Zeng, Z.; Bai, H.; Yin, H.; et al. Effects of caffeic acid on learning deficits in a model of Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Med.* 2016, 38, 869–875.