

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARVAKROLÜN İN VİTRO VE İN VİVO DENEYSEL
MODELLERDE ALZHEİMER HASTALIĞI ÜZERİNE OLASI
KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

KÜBRA ÇELİK TOPKARA

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

KASIM 2019
BOLU

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



KARVAKROLÜN İN VİTRO VE İN VİVO DENEYSEL
MODELLERDE ALZHEİMER HASTALIĞI ÜZERİNE OLASI
KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

KÜBRA ÇELİK TOPKARA

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Erkan KILINÇ

ORTAK TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Şerif DEMİR

Kasım 2019

BOLU

***AİBÜ ve Düzce Üniversitesi Fizyoloji Ortak Doktora Programı**

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Fizyoloji Anabilim Dalında
Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

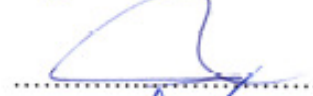
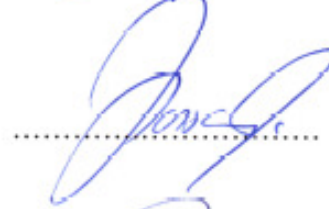
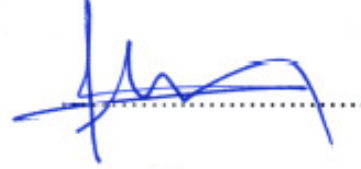
Prof. Dr. Fatma TÖRE*
(Fizyoloji, Biruni Üniversitesi)

Doç. Dr. Erkan KILINÇ**
(Fizyoloji, BAİBÜ)

Doç. Dr. Orhan Tansel KORKMAZ
(Fizyoloji, Eskişehir Osmangazi Üniv.)

Doç. Dr. Şule AYDIN TÜRKOĞLU
(Nöroloji, BAİBÜ)

Dr. Öğr. Üyesi Ersin BEYAZÇİÇEK
(Fizyoloji, Düzce Üniversitesi)



22/11/2019

Bu tez ile Bolu AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Kübra
ÇELİK TOPKARA' nın Doktora derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Erol AYAZ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.
*Jüri Başkanı
**Tez Danışmanı



ÖZET

KARVAKROLÜN İN VİTRO VE İN VİVO DENEYSEL MODELLERDE ALZHEİMER HASTALIĞI ÜZERİNE OLASI KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Alzheimer hastalığı (AH), kortikal ve hipokampal nöron ve sinaps kayıplarıyla ortaya çıkan bilişsel fonksiyonlarda bozulma ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalığın patogenezinin çoğunlukla nöronal ekstrasellüler alanda amiloid beta peptidi birikiminin yol açtığı oksidatif stres ve hipokampal kolinerjik kayıp sorumlu tutulmaktadır. Sunulan tez çalışmasında antioksidan ve asetilkolin esteraz inhibitör etkisi bilinen karvakrolün, *in vitro* nöron ve *in vivo* sıçan AH modellerinde hücre, doku ve sistemik düzeyde etkileri araştırılmıştır.

Deneyisel Alzheimer modelleri amiloid beta'nın *in vitro* gruplarda nöron besiyerine eklenmesi, *in vivo* gruplarda ise bilateral intrahipokampal enjeksiyonu ile oluşturuldu. Deneylerde hücre canlılığı, oksidan (malondialdehid ve hidrojen peroksit) ve antioksidan (süperoksit dismutaz ve katalaz) parametreler, A β 1-40, A β 1-42 ve Tau peptid düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü. Ayrıca *in vivo* gruba pasif sakınma testi uygulandı ve hipokampus histopatolojik olarak değerlendirildi. Veriler tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırıldı.

Karvakrol *in vitro* deneylerde amiloid beta ile indüklenen oksidatif stres parametrelerini azaltırken antioksidan parametreleri ve nöronal sağ kalımı artırdı. *In vivo* deneylerde karvakrol, oksidatif stres parametrelerini ve hipokampal nöronal hasarı azalttı ve pasif sakınma testinde karanlık bölmeye geçme süresini kısalttı ancak ne amiloid beta uygulaması ne de karvakrol plazma A β 1-40, A β 1-42 ve Tau peptidleri ile hipokampal Tau peptid düzeylerini değiştirmede.

Bulgularımız karvakrolün *in vitro* ve *in vivo* AH modellerinde A β ile indüklenen oksidatif hasar, hipokampal nöronal dejenerasyon ve bunlara bağlı öğrenmedeki bozulma üzerine iyileştirici etkileri olduğunu göstermiştir. Böylece karvakrol AH tedavisinde bir seçenek olmaya aday olabilir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, Karvakrol, Amiloid beta, Oksidatif stres, Nöroprotektif etki

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE POTENTIAL PROTECTIVE EFFECTS OF CARVACROL ON ALZHEIMER'S DISEASE IN IN VITRO AND IN VIVO EXPERIMENTAL MODELS

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by impaired cognitive functions which appear as a result of loss of cortical and hippocampal neurons and synapses. Oxidative stress and hippocampal cholinergic loss caused by neuronal extracellular accumulation of amyloid-beta peptide (A β) are mostly held responsible for the pathogenesis of disease. In this study, we investigated therapeutic effects of carvacrol which has antioxidant and acetylcholinesterase inhibitor activities on AD at the cellular, tissue and systemic levels in-vitro neuron and in-vivo models of AD.

Experimental AD models were established by adding A β to neuronal medium in-vitro groups and through bilateral intrahippocampal injection of A β to rats in-vivo groups. Cell viability, oxidant (malondialdehyde and hydrogen peroxide) and antioxidant (superoxide dismutase and catalase) parameters, A β 1-40, A β 1-42 and Tau peptide levels were measured by ELISA. Passive avoidance test was performed to in-vivo groups and the hippocampus was evaluated histopathologically. Data were compared by one-way ANOVA.

Carvacrol decreased A β -induced oxidative stress parameters and increased antioxidant parameters and neuronal survival *in vitro* experiments. In *in vivo* experiments, carvacrol reduced A β -induced oxidative stress parameters and hippocampal neuronal damage, and also it shortened the time to pass into the dark compartment in the passive avoidance test. However, neither A β nor carvacrol changed plasma A β 1-40, A β 1-42 and Tau peptide, and hippocampal Tau peptide levels.

Our findings demonstrated that carvacrol exhibits the ameliorating effects on A β -induced oxidative damage, hippocampal neuronal degeneration, and consequently the learning disruption *in vitro*, and *in vivo* AD models. Thus carvacrol may be a candidate to be choice in the treatment of AD.

Keywords: Alzheimer's disease, Carvacrol, Amyloid beta, Oxidative stress, Neuroprotective effect

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın tüm aşamalarında desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Erkan KILINÇ'a, ortak tez danışmanı hocam Sayın Prof. Dr. Şerif DEMİR'e, Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Aydın HİM'e, Dr. Öğr. Üyesi Ayhan ÇETİNKAYA, Doç. Dr. Şule AYDIN TÜRKOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Ersin BEYAZÇİCEK ve Dr. Öğr. Üyesi Aslıhan ŞAYLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarımda yardım ve desteğini gördüğüm arkadaşlarım Öğr. Gör. Şeyda KARABÖRK, Araş. Gör. İbrahim Ethem TORUN ve Ayşegül YILDIZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmalarımın yapılmasında maddi destek sağlayan Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne çok teşekkür ederim.

Her zaman olduğu gibi her türlü maddi ve manevi desteğiyle her koşulda yanımda olan değerli ailem; maddi ve manevi fedakarlıkları ile bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan özellikle sevgi, azim ve motivasyon kaynağım canım annem Zeynep ÇELİK'e, eğitim hayatım boyunca her konuda destek olan sevgili babam Yunus ÇELİK'e ve yaşamım boyunca her anlamda beni destekleyen ve yanımda olan sevgili kardeşlerim Esra, Büşra ve Muhammed ÇELİK'e sonsuz sevgi, minnet ve şükranlarımla teşekkürlerimi sunarım. Bugünlere gelmemde emeği büyük olan sevgisi, ilgisi ve anlayışı ile her zaman yanımda olan güzel insan canım anneannem merhume Fikriye CANDAN'a sonsuz sevgi ve minnettarlığımı sunarım.

Tanıştığım andan itibaren sevgisi, ilgisi, anlayışı, sabrı ve hoşgörüsü ile desteğini esirgemeyen can yoldaşım sevgili eşim Yusuf TOPKARA'ya sonsuz sevgi ve şükranlarımla teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, bu tezi Sevgili aileme ve Canım eşime ithaf ediyorum.

Kübra ÇELİK TOPKARA

Kasım, 2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ONAY SAYFASI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Demans	5
2.2. Alzheimer Hastalığı	5
2.3. Alzheimer Hastalığının Nöropatolojisi.....	7
2.3.1. Amiloid Plak	7
2.3.2. Nörofibriler Yumak.....	12
2.3.3. Oksidatif Stres	14
2.4. Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılan Terapötik Yaklaşımlar.....	16
2.5. Karvakrol	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	30
3.2. Kullanılan Laboratuvar Gereçleri ve Cihazları.....	31
3.3. İn vitro Çalışmalar	31
3.3.1. Hücre Kültürü.....	31
3.3.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaştırılması.....	32
3.3.3. Amiloid Beta Peptidi (A β 1-42) İle Oluşturulan İn Vitro AH Modeli ve Deney Grupları.....	32
3.4. İn vivo Çalışmalar.....	34
3.4.1. Deney Hayvanları.....	34

3.4.2. Amiloid beta peptidi (A β 1-42) ile oluşturulan AH modeli ve deney grupları.....	35
3.4.3. Pasif Sakınma Testi.....	38
3.4.4. Histokimyasal Boyama	39
3.5. Biyokimyasal Analizler	39
3.5.1. Hücre Canlılığı Testleri.....	39
3.5.1.1. MTT Testi.....	39
3.5.1.2. LDH Testi.....	40
3.5.2. Antioksidan Parametreler	40
3.5.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	40
3.5.2.2. Katalaz (CAT)	41
3.5.3. Oksidan Parametreler	41
3.5.3.1. Malondialdehid (MDA).....	41
3.5.3.2. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂).....	41
3.5.4. Amiloid beta Peptidlerinin Ölçümü	42
3.5.5. Tau Protein Tespiti	42
3.6. İstatistiksel Analizler	43
4. BULGULAR	44
4.1. İn vitro Nöronal AH Modelinde Karvakrol Maruziyeti Sonrasında Elde Edilen Bulgular	44
4.1.1. Retinoik Asit Uygulanan SH-SY5Y Hücrelerini Normal Nöron Hücrelerine Dönüştürülmesi	44
4.1.2. Farklı Konsantrasyonlardaki Amiloid Beta Uygulamasına Karşı MTT Analiz Sonuçları.....	45
4.1.3. Hücre Canlılığı Analiz Sonuçları	46
4.1.4. Antioksidan Analiz Sonuçları	48
4.1.5. Oksidan Parametre Sonuçları	50
4.1.6. Tau Bulguları	52
4.2. İn vivo Koşullarda Oluşturulan AH Modelinde Karvakrolün Etkinliği.....	52
4.2.1. Antioksidan Analiz Sonuçları	53
4.2.2. Oksidan Parametre Sonuçları	57
4.2.3. Amiloid beta Bulguları.....	61

4.2.4. Tau Bulguları	63
4.2.5. Pasif Sakınma Testi Sonuçları	65
4.2.6. Histopatolojik Bulgular	66
5. TARTIŞMA	70
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	78
7. KAYNAKLAR.....	79
8. ÖZGEÇMİŞ	95
9. ORJİNALLİK RAPORU.....	96



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. APP proteolizisi ile Amiloidojenik yolak ve Amiloidojenik olmayan yolakların gösterimi.....	9
Şekil 2.2. Nörofibriler Yumak oluşumu	13
Şekil 3.1. <i>İn vitro</i> deney gruplarının şematik gösterimi	34
Şekil 3.2. <i>İn vivo</i> deney gruplarının şematik gösterimi	37
Şekil 3.3. <i>İn vivo</i> AH modeli oluşturma ve deney sonunda hipokampüsün çıkarılma aşamaları	38
Şekil 4.1. Farklılaşmamış ve farklılaşmış SH-SY5Y hücre kültürlerinin morfolojik görüntüleri	44
Şekil 4.2. SH-SY5Y hücrelerinde 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanan Amiloid- β maruziyetinin hücre canlılığı üzerine etkisi.....	45
Şekil 4.3. <i>İn vitro</i> koşullarda oluşturulan AH modelinde SH-SY5Y hücrelerinde gözlenen hücre canlılığı	46
Şekil 4.4. <i>İn vitro</i> koşullarda oluşturulan AH modelinde SH-SY5Y hücrelerinde gözlenen LDH Aktivitesi	47
Şekil 4.5. <i>In vitro</i> koşullarda oluşturulan AH modelinde SH-SY5Y hücrelerinde süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi değerleri	48
Şekil 4.6. <i>In vitro</i> koşullarda oluşturulan AH modelinde SH-SY5Y hücrelerinde katalaz (CAT) aktiviteleri.....	49
Şekil 4.7. <i>In vitro</i> koşullarda oluşturulan AH modelinde SH-SY5Y hücrelerinde malondialdehid (MDA) aktivitesi değerleri	50
Şekil 4.8. <i>In vitro</i> koşullarda oluşturulan AH modelinde SH-SY5Y hücrelerinde hidrojen peroksit (H_2O_2) değerleri	51
Şekil 4.9. <i>İn vitro</i> koşullarda oluşturulan AH modelinde SH-SY5Y hücrelerinde gözlenen Tau proteini seviyesi.....	52
Şekil 4.10. <i>In vivo</i> deney grubu hayvanlarının serum süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi değerleri	53
Şekil 4.11. <i>In vivo</i> deney grubu hayvanlarının hipokampus süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi değerleri	54

Şekil 4.12. <i>In vivo</i> deney grubu hayvanlarının serum katalaz (CAT) aktiviteleri	55
Şekil 4.13. <i>In vivo</i> deney grubu hayvanlarının hipokampus dokusu Katalaz (CAT) düzeyleri	56
Şekil 4.14. <i>In vivo</i> deney grubu hayvanlarının serum malondialdehid (MDA) düzeyleri	57
Şekil 4.15. <i>In vivo</i> deney grubu hayvanlarının hipokampus malondialdehid (MDA) düzeyleri	58
Şekil 4.16. <i>In vivo</i> deney grubu hayvanlarının serum hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) düzeyleri	59
Şekil 4.17 <i>In vivo</i> deney grubu hayvanlarının hipokampus hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) düzeyleri	60
Şekil 4.18. <i>In vivo</i> deney grubu hayvanlarının serum A β 1-42 peptid seviyeleri	61
Şekil 4.19. <i>In vivo</i> deney grubu hayvanlarının serum A β 1-40 peptid seviyeleri	62
Şekil 4.20. <i>In vivo</i> deney grubu hayvanlarının serum Tau protein seviyeleri	63
Şekil 4.21. <i>In vivo</i> deney grubu hayvanlarının hipokampus dokusu Tau protein düzeyleri	64
Şekil 4.22. Pasif Sakınma testi sonuçları	65
Şekil 4.23. Kontrol grubu hematoxilen-eozin boyaması ile rat hipokampusu	67
Şekil 4.24. Karvakrol grubunda intrahipokampal enjeksiyon alanı	68
Şekil 4.25. Deney gruplarında hipokampal moleküler tabakada nöronal hücre görüntüleri	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Araştırmada Kullanılan Kimyasal ve Kitlerin Listesi30

Çizelge 3.2. Araştırmada Kullanılan Malzeme ve Cihazların Listesi.....31



KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

Simgeler

%	Yüzde konsantrasyon
μ l	Mikrolitre
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
L	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
μ g	Mikrogram
μ m	Mikrometre
μ M	Mikromolar

Kısaltmalar

ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolin esterase
AH	Alzheimer hastalığı
AICD	APP intraseluler bölgesi
APP	Amiloid prekürsör protein
A β	Amiloid beta
BDNF	Beyin türevli nörotrofik faktör
BOS	Beyin omirilik sıvısı
Ca ⁺²	Kalsiyum
CAT	Katalaz
CTF- α	C-terminal fragmanı- α
CTF- β	C terminal fragman- β
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
EGCG	Epigallocatechin gallate
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Cemiyeti

GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
GSK-3	Glikojen sentaz kinaz-3
GSK-3 β	Glikojen sentaz kinaz-3 β
GSSG	Glutasyon disülfid
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
LDH	Laktat Dehidrogenaz
MDA	Malondialdehid
MSS	Merkezi sinir sistemi
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NFY	Nörofibriler Yumaklar
NMDA	N-metil-D-aspartat
NO	Nitrik oksit
PBS	Fosfat tamponlu salin
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
RA	Retinoik asit
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROM	Reaktif oksijen metabolitleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
sAPP α	Çözülebilir APP α
sAPP β	Çözünebilir APP β
SH-SY5Y	İnsan nöroblastoma hücreleri
SOD	Süperoksit dismutaz

1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH), merkezi sinir sisteminde kortikal ve hipokampal nöron ve sinaps kayıplarıyla ortaya çıkan, davranış bozukluğu, hafıza kaybı, öğrenme ve konuşma işlevlerinde ilerleyici bozulma ile karakterize olan nörodejeneratif bir hastalıktır (1). AH'da nörodejenerasyon ileri boyutta olup beyin ağırlığının yaklaşık %20'si kadar nöron kaybı olmaktadır (2).

Yapılan araştırmalar, dünya genelindeki tüm demans vakalarının %60-80'ini Alzheimer hastalarının oluşturduğunu bildirilmiştir (3). Ayrıca, hastanın kendisini etkilemesi dışında AH' nin hasta yakınlarının yaşamını da olumsuz etkilemesi ve hastalığın ülke ekonomisine vermiş olduğu zarar da dikkate alındığında AH için etkili bir tedavi yöntemi ve önleyici terapi uygulamalarının geliştirilmesi büyük bir önem taşımaktadır.

AH' nin patofizyolojisinden her ne kadar genetik mutasyonlar, sinaps kayıpları, yaşlanma ve demir, bakır ve çinko gibi biyometallerin birikimi gibi faktörlerin sorumlu olabileceğine dair çalışma sonuçları olsa da (3, 4) kabul edilen en yaygın görüş oksidatif stres ile birlikte beynin ekstrasellüler alanında amiloid plakların ve nöronlar içinde ise Nörofibriler Yumakların oluşumunu temel alan klasik teoridir (5-7).

AH'yi tetikleyen bu faktörlerin yanısıra hipokampus gibi öğrenme ve hafıza ile ilgili spesifik beyin bölgelerindeki asetilkolin (ACh) eksikliği ve kolinerjik nöronların kaybının da AH'nin gelişimine ve ilerlemesine önemli derecede katkıda bulunduğu bildirilmiştir (1, 8).

Alzheimer'a yol açan ana etken olarak gösterilen amiloid plaklar, nöron ve mitokondri membranında bulunan amiloid prekürsör proteinin (APP) β -sekretaz ve γ -sekretaz enzimleri ile parçalanması sonucu oluşan amiloid- β (A β) isimli peptitlerin hücre dışı alanda bir araya gelmesiyle oluşmuş yapılardır (9, 10).

Sekretaz enzimlerinin APP'yi farklı bölgelerden kesmesi sonucunda farklı sayılarda aminoasit içeren A β türleri meydana gelmektedir. Bu farklı A β türlerinden en toksik olanı daha kolay agrege olabilen 42 aminoasit uzunluğundaki A β (A β 1-42)'dir. Diğer taraftan bu A β 'nin monomerik, oligomerik ve protofibril gibi farklı formları nöronlarda, AH gelişiminde önemli rol oynayan oksidatif strese neden olmaktadır (5, 11, 12).

A β , reaktif oksijen/nitrojen ürünlerinde artışa yol açması ile birlikte, mitokondriyal işlev kaybına, ATP üretiminde azalmaya, hücre içi kalsiyum homeostazisinde bozulmaya, nöron kaybına ve sinaps, dendrit ve akson dejenerasyonuna yol açarak nörotoksik etkiler göstermektedir (13, 14).

A β , sağlıklı kişilerde beyinde ve beyin omurilik sıvısında çözünebilir ve agrege olmuş halde membrana bağlı şekilde bulunabilirken özellikle beyin hipokampus ve serebral korteks bölümlerinde rastlanmaktadır. Aynı zamanda in vitro koşullarda A β hücre kültürü besi ortamına da salınmaktadır. APP' den sekretazlar tarafından farklı sayılarda aminoasit içeren A β üretilir. Toplam A β miktarı bireyden bireye değişebilmektedir. Bundan dolayı, beyin omurilik sıvısı (BOS)'ndaki A β 42 düzeyi ve hiperfosforile Tau seviyesi, plazmada ise A β 42/A β 40 oranı Alzheimer için bir belirteç olarak kullanılmaktadır (15). Fizyolojik şartlarda A β 42/A β 40 oranı 0.05-0.1 arasındadır (15, 16).

Normal bir birey ile karşılaştırıldığında Alzheimer hastalarının beyinde A β 'nin artan üretimi beyin dokusunda histolojik olarak gösterilebilen amiloid plakların oluşumuna yol açmaktadır (17-19).

Yapılan çalışmalar Alzheimer hastalarının Beyin Omurilik Sıvısı (BOS)'nda A β 40 düzeyinin sabit kaldığını, A β 42 düzeyinin azaldığını, ancak beyin dokusunda ise A β 42 düzeyinin arttığını bildirmiştir (16, 19). Bununla birlikte Alzheimer hastalarının BOS'unda hiperfosforile Tau seviyesinin ve plazmasında ise A β 42/A β 40 oranının yüksek olduğu gösterilmiştir (12; 18-19).

Alzheimer'ın diğer patolojik bulgusu olan Nörofibriler Yumaklar ise hücre iskelet yapısının korunmasında önemli rol oynayan Tau proteinlerinin

hiperfosforilasyonu ile oluşan toksik karakterdeki çözünemeyen filamentlerden meydana gelmektedir. Bu yapılar AH'de nörotransmitter iletimini ve hücre yapısını değiştirerek nöron ölümüne ve kognitif bozulmaya yol açmaktadır (5, 20).

Alzheimer hastalığının bilinen histopatolojik bulgularının henüz daha ortaya çıkmadığı hastalığın erken dönemlerinde oksidatif stresin, hastalığın ilerleyici seyrine ve diğer bulguların ortaya çıkmasına yol açtığı yapılan çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar, oksidatif stresin Alzheimer hastalarının beyinlerinde serbest radikal oluşumunu uyarmasıyla beraber lipid peroksidasyonu, protein ve DNA oksidasyonunun artmasına, Nörofibriler Yumaklarda ve amiloid plaklarda ileri glikozilasyon son ürünlerine, peroksinitrit, hemoksijenaz-I ve süperoksit dismutaz-I oluşumuna yol açtığını bildirmiştir (6, 21). Transgenik hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar oksidatif stresin, A β 'nin hem üretimine hemde birikimine yol açtığını göstermiştir (22). Ayrıca yaşlanmayla birlikte beyinde yüksek oranlarda bakır, çinko ve demir gibi metallerin birikmesinin oksidatif hasara yol açacağı, bunun da beraberinde A β agregasyonuna ve nörofibriler yumak oluşumuna neden olabileceği bildirilmiştir (23).

AH'de kolinerjik nöronlardaki azalmanın ve kortikal alanlardaki plak yoğunluğunun demans değerlendirme ölçeği sonuçları ile paralellik göstermesinden dolayı hastalığın tedavisinde kolinerjik ajanlar kullanılmaktadır. Ayrıca AH'de kolinerjik eksiklik sonucu anormal amiloid yapısının oluştuğu (24) ve kolinerjik yıkımın önlenmesi ile hastalığın büyük oranda kontrol altına alınabileceği kabul edilmektedir. Bu sebeple hastalığa yatkın bireylerde profilaktik, hastalığın ortaya çıktığı bireylerde semptomatik tedavide veya hastalığın ilerlemesinin durdurulmasında kolinerjik kaybın önlenmesine yönelik farmakolojik ajanların geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Karvakrol, kekik olarak bilinen *Origanum* ve *Thymus* gibi bitkilerin uçucu yağlarında bulunan fenolik bir monoterpendir (25). Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda karvakrolün antioksidan ve anti-inflamatuvar etkilerinin yanı sıra (26, 27) asetilkolin esterase inhibitörü aktivitesine sahip olduğu da bildirilmiştir (28-30).

Bu bilgiler doğrultusunda AH'nin patogenizi ve seyri göz önüne alındığında, asetilkolin esteraz inhibisyon aktivitesi kanıtlanmış olan karvakrolün, kolinerjik nöronlardan salınan ACh' nin yıkımından sorumlu olan asetilkolin esteraz enzimini inhibe ederek kolinerjik kaybı azaltabileceği ve bunun sonucu olarak anormal amiloid oluşumunu önleyerek hastalığın yıkıcı etkilerinin oluşumunun önüne geçebilecek bir terapötik potansiyele sahip olabileceği hipotezimizin temelini oluşturmaktadır.

Bu hipotez doğrultusunda, sunulan çalışmada, *in vitro* ortamda nöroblastoma hücrelerine retinoik asit ve devamında amiloid beta uygulanarak oluşturulan Alzheimer nöron modeli ve amiloid betanın bilateral intrahipokampal enjeksiyonu ile oluşturulan *in vivo* Alzheimer sıçan modeli kullanılarak karvakrolün, Alzheimer hastalığı üzerine olası tedavi edici etkilerinin hücre, doku ve sistemik düzeyde araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Demans

Demans; erişkin merkezi sinir sisteminin (MSS) hasarı sonucu gelişen, birden fazla kognitif alanların bozulmasına bağlı olarak ortaya çıkan ve hafıza zayıflığı, dil bozuklukları, psikolojik ve psikiyatrik değişiklikler ile bireyin günlük yaşam aktivitelerini eskisi gibi yeterli düzeyde yerine getirememesine neden olan kalıcı ve ilerleyici bir klinik sendromdur (31, 32).

Demansın en sık görülen formu Alzheimer Hastalığı olup dünya genelindeki tüm demans vakalarının % 60-80'ini oluşturur (3).

2018 yılında yayınlanan Dünya Alzheimer raporuna göre; dünya genelinde demans hastası 50 milyon kişi bulunmaktadır. Bu sayının 2030 yılına gelindiğinde 82 milyona ve 2050 yılına gelindiğinde ise 152 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (33). Demans hastalarının sayısındaki bu artış, önemli sosyal ve ekonomik sorunlara da yol açmaktadır (34). 2018 yılında dünya genelinde demans için yapılan harcamaların toplam maliyeti 1 trilyon dolara ulaşmıştır ve bu rakamın 2030 yılına kadar 2 trilyon dolara yükseleceği tahmin edilmektedir (33, 35).

2.2. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH), ilk olarak 1907 yılında psikiyatrist ve nöroanatomist olan Alois Alzheimer tarafından 51 yaşındaki bir hastanın beyinde yaptığı otopsi sonucunda hastalığın demans semptomları ile nöropatolojik bulgular arasındaki klinikopatolojik korelasyonu tanımlayan bir vaka raporu olarak sunulmuştur (36). AH; merkezi sinir sisteminde kortikal ve hipokampal nöron ve sinaps kayıplarıyla ortaya çıkan, davranış bozukluğu, hafıza kaybı, öğrenme ve konuşma işlevlerinde ilerleyici bozulma ile karakterize olan nörodejeneratif bir hastalıktır (1). AH'da nörodejenerasyon ileri boyutta olup beyin ağırlığının yaklaşık %20'si kadar nöron kaybı olmaktadır (2, 37).

Alzheimer hastalığının kesin tanısının hasta hayattayken konulabilmesinin mümkün olmayışından dolayı sadece hastanın muhtemel Alzheimer vakasına sahip olduğu şeklinde değerlendirilmesi yapılabilmekte iken kesin tanı ancak hastanın ölümünden sonra gerçekleştirilecek olan otopsi ve histopatolojik incelemeler sonucunda konulabilmektedir. Muhtemel Alzheimer tanısının konulabilmesi için klinik değerlendirilme ile belirlenebilmesi amacıyla Ulusal Nörolojik ve İletişimsel Hastalıkları Enstitüsü ve İnme-Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Hastalıklar Derneği (NINCDS-ADRDA) tarafından önerilen tanı kriterleri kullanılmaktadır. Bu kriterler gözlem, mental ve nöropsikolojik testlerle demansın olduğuna dair bulguların olması, hastalığın 40-90 yaşlar arasında başlaması ve ilerleyici nitelikte olması, bilişsel yeteneklerde zayıflığın tespiti ve hastanın herhangi bir beyin rahatsızlığına sahip olmamasıdır (18, 38). Ayrıca teşhise yönelik diğer yöntemler arasında bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans (MR), Pozitron emisyon tomografisi (PET), tek foton emisyon hesaplamalı tomografi (SPECT) ve fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme (fMRG) yer almaktadır (18, 39).

Klinik açıdan AH değerlendirildiğinde, hastalığın başlangıç evrelerinde bellek bozukluğu görülür. Bu ilk bilişsel bozukluk kısa süreli hafıza ile ilgili olup uzun süreli hafıza bozukluğu daha geç evrelerde meydana gelir. İlerleyen evrelerde ise yeni bilgilerin öğrenilmesinde güçlük (amnezi), konuşma sırasında sözcük seçimi ve objelerin isimlendirilmesi gibi lisan kabiliyetinde zorluklar, soyut düşünme ve problem çözme yeteneğinin azalması, uyku düzensizliği, zaman ve mekan algısında bozulmalar, konsantrasyon ve davranış bozuklukları ile motor becerilerinde zayıflık (apraksi) gözlenir. Hastalığın geç evrelerinde ise bellek kaybı ileri düzeyde olup anksiyete, majör depresyon ve halüsinasyonların görülmesi, büyük oranda konuşma yeteneklerinin azalması veya kaybı ve hareket yeteneğinin azalmasıyla beraber günlük yaşam aktivitelerinin yerine getirilmesinde bir başkasının yardımına gereksinim duyma durumu söz konusudur. Hastalığın başlangıç evresinden geç evresine geçiş süresi ortalama on yıl sürmektedir (8, 24, 38).

AH'nın klinik semptomları yaşlılarda yaygın olarak teşhis edilmesine rağmen, AH'nın nöro/patofizyolojisi ile ilgili süreçlerin ve mekanizmaların hastalığın klinik

semptomları ortaya çıkmadan birkaç on yıl önce başladığını gösteren önemli kanıtlar bulunmaktadır (40).

2.3. Alzheimer Hastalığının Nöropatolojisi

AH'nin henüz kesin etiyopatogenezi ortaya çıkarılamamasına rağmen hastaların beyinlerinde yapılan makroskopik incelemelerde beyinde atrofi, ventrikül ve sulkuslarda genişleme, giruslarda daralma bulgularının gözlemlendiği bildirilmiştir (41).

Alzheimer'ın patogenezinde başlıca rol oynayan faktörler olarak; amiloid β ($A\beta$) adı verilen proteinlerin birikerek hücrelerarası boşlukta oluşturdukları amiloid plaklar, Tau proteinlerinin hiperfosforilasyonu sonucu hücre içi alanda oluşan Nörofibriler Yumaklar ve oksidatif stres kabul edilmektedir (2, 5-7). Bununla birlikte genetik mutasyonlar (42), sinaps kaybı (13), glutamat eksitoksisitesi (43), nöronal hücre ölümü (20), yaşlanma (3), biyometallerin (Cu, Fe, Zn) birikimi (4), inflamasyon (44), mitokondriyal fonksiyon bozukluğu da (45) Alzheimer patogenezinde rol oynadığı kabul edilen diğer etmenler arasında yer almaktadır. Ayrıca öğrenme ve hafıza ile ilgili spesifik beyin bölgelerindeki asetilkolin eksikliği (ACh) ve kolinerjik nöronların kaybı (8) ile davranışla ilişkili serotonerjik ve dopaminerjik enzimatik sistemler ve reseptörlerdeki değişiklikler de AH'nin gelişimine ve ilerlemesine doğrudan katkı sağlamaktadır (1).

2.3.1. Amiloid Plaklar

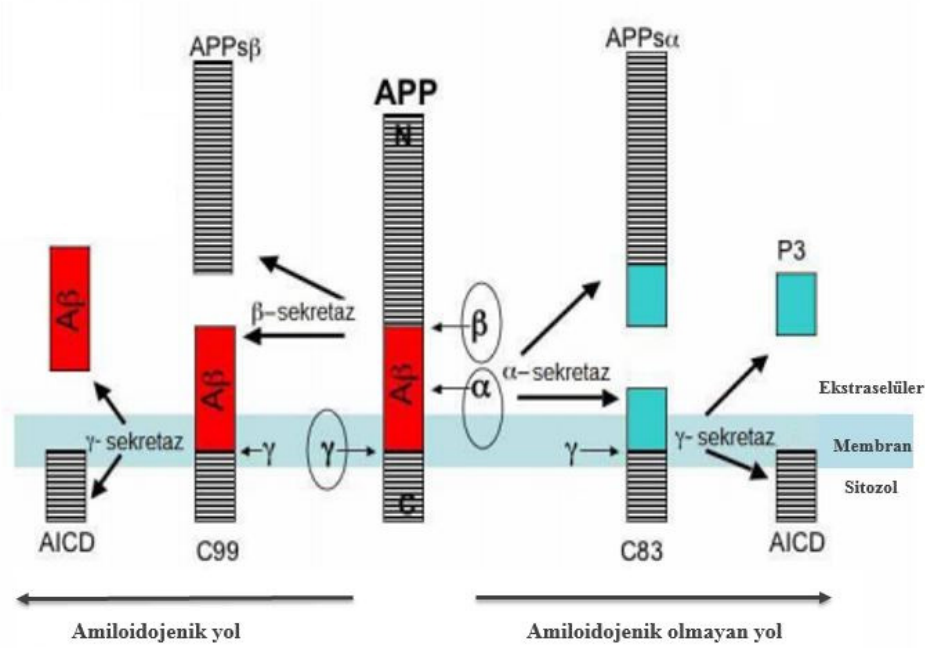
Hatalı katlanmış proteinlerin sitoplazmada veya hücre dışı alanda meydana getirdikleri agrege yapıların, nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde rol oynadığı bilinmektedir. Alzheimer hastalığında ise bu agrege yapıların oluşmasına yol açan protein $A\beta$ olup (5, 45) Alzheimer'in temel nöropatolojik bulgusu olan amiloid plakların da ana birleşenidir (46).

$A\beta$; molekül büyüklüğü 4 kDa boyutunda, 39-43 aminoasitten oluşan agrege özelliğe sahip bir proteindir (47, 48). $A\beta$ 'nin monomerik, oligomerik, protofibril, fibril ve agregat olmak üzere farklı formları bulunmaktadır (12, 49).

A β peptidi; mitokondri, golgi aygıtı ve endoplazmik retikulum organellerinde, endozomal ve lizozomal gibi proteolitik enzimlerin bulunduğu endositik veziküllerin zarlarında ve plazma membranlarında bulunan Amiloid Prekürsör Proteinin (APP) proteolitik enzimler tarafından parçalanmasıyla oluşmakta ve sinapslardan ekstrasellüler alana taşınmaktadır (50).

A β 'nin oluşmasına yol açan APP, 21. Kromozom (21q21.3) üzerinde bulunan gen tarafından kodlanan, merkezi ve periferik sinir sisteminde nöron membranlarında ifadelenen, 695-770 aminoasit uzunluğunda tip 1 integral transmembran glikoproteindir (51, 52). mRNA'nın alternatif kesimi sonucunda APP'nin ekzon uçlarının farklı şekillerde birleşmesiyle çeşitli uzunluklarda izoformların oluşmasına neden olur. Beyindeki ekspresyonlarından dolayı AH ile ilişkili başlıca izoformlar ise aminoasit uzunluğuna göre 695, 751 ve 770 amino asitten oluşan APP695, APP751 ve APP770'dir (53). APP695 çoğunlukla nöronlarda ifade edilirken diğer iki izoform glia ve astrositlerde daha fazla bulunmaktadır (54). Ayrıca embriyogenez sırasında APP695 izoformunun embriyonik beyin olgunlaşmasında rol oynayan başlıca form olduğu tespit edilmiştir (55). APP'nin fizyolojik fonksiyonları tam olarak bilinmemekle birlikte, metal iyon taşınımında ve metal homeostazın düzenlenmesinde, nöronal sağkalımında, beyin ve hafıza gelişiminde, hücrel adezyona karşı korumada ve sinaptik plastisitenin düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (52, 55-59).

APP'i, proteolizinde rol alan enzim türüne göre "amiloidojenik yolak" ve "amiloidojenik olmayan yolak" olarak adlandırılan iki yol ile metabolize edilmektedir (Şekil 2.1) (19, 48, 57, 60). Bu süreçler nöronal aktivite tarafından regüle edilmekle birlikte α -sekretaz, β -sekretaz ve γ -sekretaz enzimler tarafından APP'nin proteolizi gerçekleştirilmektedir (61). Her iki yol da hem sağlıklı bireylerde hem de Alzheimer'lı hastalarda aktiftir, ancak Alzheimer patolojisinde amiloidojenik yolak aktivitesi daha fazladır (52). Normal bireylerde APP'nin proteolizinin büyük bir kısmı amiloidojenik olmayan yolda ilerlerken; yaşlanma, genetik ve çevresel faktörlerin meydana getirdiği değişimler, APP üretimini ve/veya işleyişinin değişmesine yol açarak APP'nin ilerleyeceği yolağı etkileyebilmektedir (5, 18).



Şekil 2.1. APP proteolizi ile Amiloidojenik yolak ve Amiloidojenik olmayan yolakların gösterimi (62).

Amiloidojenik olmayan yolakta APP'nin proteolizinde rol oynayan sekretaz enzimleri α ve γ -sekretazlardır. α -sekretazın APP'yi transmembran bölgesinde yer alan 687. aminoasitten kesmesiyle ekstrasellüler alana salınan çözülebilir APP α (sAPP α) adı verilen bir protein ile membrana bağlı olarak 83 aminoasitten oluşan C-teminal fragmanı- α (CTF- α , C83) oluşmaktadır (Şekil 2.1). Membrana bağlı olan CTF- α 'nın γ -sekretaz ile kesilmesi sonucunda ise hücre dışına salınan 3 kDa'luk p3 fragmanı ile membrana bağlı şekilde APP intrasellüler bölgesi (AICD) adı verilen parçalar oluşmaktadır. Oluşan bu parçaların amiloidojenik özelliği bulunmamakla beraber herhangi bir toksik etki de göstermemektedirler (19, 48, 52, 53, 60).

sAPP α 'nın çeşitli nöroprotektif özelliklere sahip olmakla beraber (59) kan pıhtılaşması, K^+ kanallarının aktivasyonu, sinirsel uyarılabilirliğin düzenlenmesi, oksidatif ve metabolik strese karşı nöral direncin artırılması, sinaptik plastisite, öğrenme ve hafızanın geliştirilmesinde önemli role sahip olduğu düşünülmektedir (54). CTF- α 'nın nörodejenerasyon ile ilişkili olabileceği (63), AICD'nin ise Ca^{+2} sinyalizasyonunun ve transkripsiyonun düzenlenmesinde fizyolojik role sahip olduğu düşünülmektedir (59).

Amiloidojenik yolda ise APP'nin proteolizinden β -sekretaz ve γ -sekretaz enzimleri sorumludur. İlk kesilme β -sekretaz tarafından APP'nin N-terminal ucunda bulunan 671. aminoasitten olur. Bu kesim sonucunda hücrelerarası boşluğa salınan çözünebilir APP β (sAPP β) adı verilen bir protein ile 99 aminoasitlik C terminal fragman- β (CTF- β , C99) oluşmaktadır (Şekil 2.1). Membrana bağlı şekilde bulunan CTF- β 'nin γ -sekretaz tarafından kesilmesiyle de AICD parçası ve 39-43 aminoasit uzunluğunda A β proteini meydana gelmektedir. Amiloidojenik yolda oluşan A β proteinin farklı uzunluklarda olması γ -sekretazın APP'yi farklı pozisyonlardan kesebilmesinden kaynaklanmaktadır (19, 48, 52, 53, 60).

sAPP β , aksonal distrofi ve nöronal hücre ölümüne yol açan anterograd aksonal taşınmayı bozmasının yanı sıra kaspaz 6'ya bağlanarak apoptozun ekstrinsik yolağının başlatılmasına da yol açmaktadır (19). CTF- β 'nin asetilkolinesteraz aktivitesinde, AICD parçasının ise transkripsiyonun düzenlenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir (63). A β peptitlerinin; sinaptik fonksiyon bozukluğuna, mitokondriyal işlev kaybına, ATP üretimindeki azalmaya, reaktif oksijen/nitrojen ürünlerindeki artışa, hücre içi kalsiyum homeostazisindeki bozulmaya, dendrit ve akson dejenerasyonuna, lizozom, endoplazmik retikulum ve golgi gibi hücresel organellerin fonksiyonel bozulmalarına, kaspaz aracılı apoptoza, astrogliosis ve nöroinflamasyonun indüksiyonuna, oksidatif stres oluşumuna ve nöronal hücre ölümüne yol açarak nörotoksik etki göstermektedir (14, 64-66).

γ -sekretazın APP'yi farklı aminoasit pozisyonlarından kesebilmesinden dolayı %5-10 oranında 42 amino asitten meydana gelen A β 1-42 (A β 42) ve %80-90 oranında C-terminal tarafından iki aminoasit eksik olan 40 aminoasitlik A β 1-40 (A β 40) peptidleri oluşmaktadır. Farklı uzunluklarda meydana gelen bu A β türlerinden en nörotoksik etkiye sahip olan, hidrofobik ve redoks aktivitesi bakımından daha güçlü ve daha kolay agregate olabilen A β 42'dir (12, 67). Bu özelliklerinden dolayı A β 42'nin daha amiloidojenik olduğu ileri sürülmektedir (52). Ayrıca, biyolojik sıvılarda daha az bulunmasına rağmen, A β 42 peptidi amiloid plakların merkezini oluşturmaktadır (68).

APP'nin metabolizma ürünlerinden biri olan A β , sağlıklı bireylerde mikroglia tarafından fagosite edilebilmelerinin yanı sıra (69), Apolipoprotein E (APOE), neprilisin, insülin degrade edici enzim (IDE), endotelin dönüştürücü enzim (ECE-1), aminopeptidaz, Jelatinaz A, katepsin B, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE), α 2-makroglobulin (α 2-MG), ve matriks metalloproteinaz (MMP) gibi proteinlere de bağlanarak degrades olabilmektedir (59, 70-73). Fakat fizyolojik olarak hücre içi veya hücre dışı çeşitli mekanizmalarla uzaklaştırılmasının yetersiz kalması durumunda ya da A β oluşumuna neden olan yolağın aktivasyonunda artışın olması sebebiyle beyinde A β 'nın miktarı artmaktadır. Sağlıklı bir beyinde, A β 'nın beyin omurilik sıvısındaki yarılanma ömrü yaklaşık 15 dakika iken (74); A β oluşumu ve klirensi arasındaki dengenin bozulmasından dolayı A β peptidleri hücreler arasında birikerek amiloid plakların merkezini oluşturmaktadır (68).

Amiloid plaklar, içermiş oldukları A β peptidin yapısına ve toksisite potansiyeline göre beyinde 3 farklı özellikte plak oluşturabilmektedir. Bunlar diffüz, kompakt ve nöritik (senil) plaklardır (52). Diffüz plaklar; genellikle 20 μ m'den küçük, amorf ve küresel yapılı, A β birikiminden oluşmuş öncül amiloid plaklardır (75). Toksik etkisi bulunmayıp nöronal hasara yol açmayan bu plaklar hem sağlıklı bireylerde hem de Alzheimer hastalarında meydana gelebilmektedir. Diffüz plaklar inflamasyon, oksidatif stres gibi faktörlerin etkisi ile kompakt plak adı verilen toksik karakterli plaklara dönüşebilmektedirler. Bu plaklar nöron dejenerasyonuna yol açmaktadır. Nöritik plaklar ise çapı 50–200 μ m arasında değişen, A β peptidi ile birlikte fonksiyonunu yitirmiş astrosit ve mikrogliaların, Nörofibriler Yumakların ve distrofik nöritlerin birarada bulunduğu plaklardır. Alzheimer hastalarında kompakt ve nöritik plaklar yoğun bir şekilde bulunmaktadır (38, 52, 76).

Alzheimer hastalığında amiloid plaklar; hipokampüste, amigdala, insular, entorinal ve singulat kortekslerde, subkortikal çekirdeklerde, beyin sapı yapılarında ve serebellumun moleküler tabakasında birirmektedir. A β birikimiyle nörotoksik etki gösteren bu plaklar, sinaptik fonksiyon bozukluğuna ve beyin dokusunda nöronal hücre ölümüne yol açmaktadır (77). A β peptidinin aşırı üretimi ve birikimi sonucunda meydana gelen nörotoksitenin Alzheimer hastalığının başlangıcındaki kilit süreç olduğu düşünülmektedir. Yaygın olarak kabul edilen bu görüş “Amiloid

Kaskad Hipotezi'' olarak adlandırılmaktadır. Bu hipoteze göre, Aβ'nın Tau proteinlerinin hiperfosforilasyonuna ve oksidatif strese sebep olduğu ileri sürülmektedir (5, 52, 59).

2.3.2. Nörofibriler Yumaklar

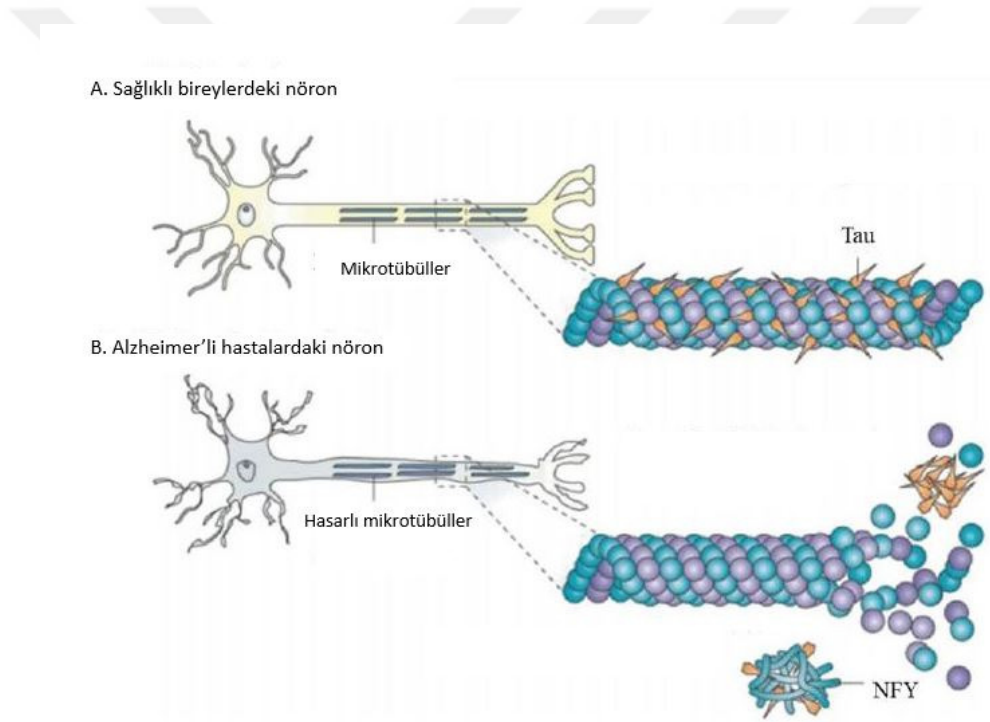
Tau proteinlerinin hiperfosforilasyonu sonucu oluşan Nörofibriler Yumaklar (NFY) Alzheimer'ın nöropatolojisinde gözlenen ikinci patolojik bulgudur (78). NFY'lerin temel bileşeni olan Tau proteini, 17. Kromozomda (17q21.31) kodlanmakta ve mikrotübül asosiye proteinler (MAP) ailesinde yer almaktadır. (79-80).

Yetişkin insan beyninin merkezi sinir sisteminde Tau proteininin altı izoformu bulunmaktadır. Tau proteinini kodlayan Mikrotubul ilişkili Tau geni (MAPT) 16 eksondan oluşur (81). Transkripsiyon esnasında 2, 3 ve 10. ekzonlarının mRNA'nın alternatif eklenmesiyle sıfır (0N), bir (1N) veya iki (2N) N-terminal ucu ve üç (3R-tau) veya dört (4R -tau) C-terminal mikrotübül bağlama tekrarı içeren izoformlar meydana gelmektedir (80). Tau'nun en uzun olan izoformu, 441 amino asitten oluşan ve dört mikrotübül bağlama tekrarına sahip (2N4R, tau441) izoformdur (78).

Nöronal aksonlarda bol miktarda bulunan (82) Tau proteini, mikrotübüllerin stabilizasyonunda ve aksonal transportta önemli rol oynamaktadır (83). Fizyolojik koşullarda Tau proteini, postsinaptik reseptör aktivitesinin modüle edilmesinde rol oynayan dendritlerde de az miktarda bulunmaktadır. Bununla birlikte Tau'nun çekirdekte de bulunduğu ve oksidatif strese karşı DNA'nın bütünlüğünü korumakta rol aldığı düşünülmektedir. Ayrıca Tau oligodendrositlerde ve astrositlerde de düşük seviyelerde ifade edilmektedir. Fakat AH'da nöronal Tau patolojisi baskındır (80).

Tau proteinlerinin C-terminal bölgesi, tübülün heterodimerlerine bağlanarak mikrotübülleri stabilize etmektedir (80). Kinazların ve fosfatazların aktivite düzeylerinin değişmesi Tau'nun hiperfosforilasyonuna yol açmaktadır. Glikojen sentaz kinaz-3β (GSK-3β), Ca²⁺/ kalmodulin bağımlı kinaz (CaMK), siklin-bağımlı protein kinaz-5 (CDK5) ve mitojenle aktive edilen protein kinazları (MAPK) gibi

kinazların aktivitelerinin artışıyla hiperfosforile olan Tau proteinlerinin mikrotübüllere bağlanma afinitesi azalmaktadır. Bunun sonucunda mikrotübül stabilizasyonu bozulmakta ve bağlanmamış fosforile Tau proteinleri birikerek NFY olarak adlandırılan çözünemeyen yapıların meydana gelmesine neden olmaktadır (Şekil 2.2) (78, 84-88). Oluşan bu NFY'ler, mikrotübül stabilizasyonu, aksonal transportu ve hücre iskelet bütünlüğünü bozarak nöronal hücre apoptozisine neden olurlar. Ayrıca Tau agregatları, hiperfosforile olmamış Tau proteinlerinin mikrotübüle bağlanma aktivitesini azaltarak ve NFY'lerin merkezinde toksik Tau toplanmasını teşvik ederek nöronal toksisiteye ve nörodejenerasyona yol açmaktadırlar (85, 89).



Şekil 2.2. Nörofibriler Yumak oluşumu (90).

Tau proteini, sinyal peptidleri içermemesine rağmen, fizyolojik koşullarda monomerik veya fosforile edilmemiş formda üretilmektedir (91). Nöronal Tau salınımının mekanizması ve işlevi tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen bir araya toplanmış olan Tau agregatları, presinaptik zardan (92), ekzositoz ile (93), eksozomdan (94), sinaptik veziküllerden (95) veya plazma membranı boyunca translokasyondan (137) doğrudan sızıntı yoluyla hücrelerden salınabilmektedir. Tau'nun hiperfosforilasyonu ise bu sekresyonu kolaylaştırmaktadır (96). Yapılan

son araştırmalarda, artan nöronal aktivitenin *in vitro* Tau salımını uyardığı ve *in vivo* Tau yayılımını ise arttırdığı tespit edilmiştir (97). Serbest bırakılan Tau agregatları postsinaptik nöronlar tarafından alınmaktadır (80).

NFY'leri içeren nöronlar, sitoplazmalarından Tau agregatlarından kurtulmak için çeşitli hücre metabolizmalarını aktive ederler (89). Endozomal-lizozomal ve otofaji yolakları Tau agregatlarının klirensinde rol oynamaktadır (98). Ayrıca, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar da mikrogli'a'nın hem çözünür hem de çözünemeyen Tau'yu aldığı gözlemlenmiştir (99).

2.3.3. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, AH'nın patogeneezinden sorumlu bir diğ er ana faktördür. Alzheimer'ın etiyo lojisinde yer alan oksidatif stres, Alzheimerlı hastaların beyinlerinde meydana getirdiğ i redoks durumundaki değ işikliklerden kaynaklanmaktadır (7).

Aerobik organizmalarda gerç ekleşen ksenobiyotik metabolizma, mitokondriyal elektron transportu, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonlarında kullanılan moleküler oksijenin %98'i oksidazlar yoluyla suya dönüştürölürken %1-2 oranında ise reaktif oksijen metabolitleri (ROM) meydana gelmektedir. Oluşan bu reaktif oksijen metabolitleri çeşitli mekanizmalar ile biyomoleküllere hasar verebilmektedir. Hücreler bu hasarı hücre iç i savunma mekanizması olan antioksidan sistemlerini aktif hale getirerek dengede tutmaya çalışmaktadırlar. Fakat prooksidan ile antioksidan arasındaki dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda oksidatif stres ortaya çıkmaktadır. Yani ROM üretiminin artması ile beraber hücrenin antioksidan kapasitesinin de azalması oksidatif stresin oluşumuna neden olmaktadır. Kısacası oksidatif stres; hücrelerin lipid peroksidasyonuna neden olan reaktif oksijen / nitrojen türlerinin (ROS/RNS) oluşumu ile hücrelerin antioksidan savunma sistemleri yoluyla bu molekülleri nötrale etme yeteneğ i arasındaki dengesizlik olarak tanımlanmaktadır (100-103).

Serbest radikaller, atomik veya moleküler orbitallerde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküller olarak tanımlanmaktadır (103).

Eşleşmeyen elektron(lar), genellikle serbest radikallere oldukça fazla reaktif özelliği kazandırarak diğer moleküllerle hızla reaksiyona girmelerini sağlamaktadır (104). Radikallerle reaksiyona giren moleküller elektronu azaldığından reaktif hale gelmektedirler. Bu etkileşim bir radikal ile diğer moleküllerin arasına bir antioksidan sistem devreye girinceye kadar zincirleme reaksiyon şeklinde devam etmektedir (105).

Serbest radikaller olan reaktif oksijen ve nitrojen türleri savunma mekanizmalarının kapasitelerini aşacak seviyede meydana geldikleri zaman pek çok hücre yapısını olumsuz yönde etkileyerek hücre hasarlarına yol açmaktadırlar. Organizmada meydana gelen bu hasarlar lipidler, proteinler, karbohidratlar, nükleik asitler, enzimler gibi biyomoleküllerin hemen hemen tamamını etkilemekte (106) ve meydana gelen bu hasarlar sonucu hücre ölümü gerçekleşmektedir (103). Ayrıca, serbest radikallerin nörodejenerasyonda da önemli bir rol oynadığı yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır (84).

İnsan beyni, vücut ağırlığının sadece % 2'sini oluşturmalarına rağmen, solunum sistemi tarafından sağlanan oksijenin yaklaşık % 20'sini tüketmektedir (107). Enerji üretiminin yüksek düzeyde olması daha çok ROS ürünlerinin açığa çıkmasına neden olmaktadır. Ayrıca beyin kolaylıkla okside olabilen dokosaheksaenoik asit ve araşidonik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar) bakımından da zengindir. Beynin temel işlevsel birimi olan nöron, yüksek oksijen tüketimine ve metabolik hıza sahip olması ve antioksidan enzim kapasitesinin düşük düzeyde bulunması nedeniyle serbest radikal hasarlarına karşı daha savunmasızdır (84, 107). Serbest radikal üretimi arttıkça beyindeki PUFA içeriğinin kademeli olarak azaldığı gözlemlenmiştir (108). Hücre içi serbest radikallerin birikmesinden ayrı olarak, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki veya ekspresyonlarındaki değişiklikler, Alzheimer hastalarının hem merkezi sinir sisteminde hem de periferik dokularında tespit edilmiştir. Bu nedenle, oksidatif stres AH'de önemli bir nöropatolojik bulgu olarak ortaya çıkmaktadır (107).

Oksidatif stresin AH'da nasıl ve nereden kaynaklandığına yönelik etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Fakat yapılan araştırmalarda,

mitokondriyal disfonksiyon (109), metal birikimi (47, 110), hiperfosforile edilmiş Tau (111), inflamasyon (112) ve A β birikiminin (109) oksidatif stresin indüklenmesinin altında yatan temel mekanizmalar olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, SOD, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve CAT gibi antioksidan sistem bileşenlerinin eksikliği veya inaktivasyonu sonucunda serbest radikallerin temizlenmesinin azalması da oksidatif stresin oluşumunu tetiklemektedir. Öte yandan, oksidatif stresin, A β birikimi ve Tau hiperfosforilasyonu oluşumuna yol açarak AH etiyopatogenezinde rol aldığını gösteren bulgulara mevcuttur (84). Yani AH'daki kanıtlar hasarın çift yönlü olduğunu ya oksidatif stresin Alzheimerın ortaya çıkmasına yol açmasıyla ya da amiloidojenik yolağın oksidatif stresi tetiklemesiyle oluştuğu yönündedir (57).

Oksidatif stres, Alzheimer hastalarının beyinlerinde serbest radikal oluşumunu uyarması sonucunda endojen kaynaklı antioksidan kapasitenin azalmasına, mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna, A β protein birikimine, Ca⁺² homeostazının bozulmasına, proteazom fonksiyonlarının değişmesine ve membran hasarına neden olmaktadır (113).

2.4. Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılan Terapötik Yaklaşımlar

Alzheimer'ın patogenezinde yer alan çoklu mekanizmalar nedeniyle hastalığın tedavisi için etkili bir yöntemin geliştirilmesinde önemli derecede zorluklar ortaya çıkmaktadır (114). Alzheimer'lı hastaların öğrenme ve hafıza ile ilgili spesifik beyin bölgelerindeki asetilkolin eksikliği ve kolinerjik nöronların kaybı AH'nin ilerlemesine ve gelişimine doğrudan katkı sağladığı bilinmektedir (8). AH'de en belirgin olarak gözlemlenen nörotransmitter eksikliğinin asetilkolin olması nedeniyle hastalığın tedavisinde kolinerjik ajanlar kullanılmaktadır. Bu amaçla Amerikan Gıda ve İlaç Cemiyeti (FDA) onaylı asetilkolin esterase (AChE) inhibitörleri (donepezil, rivastigmin ve galantamin) AH'nin tedavisinde kullanılmaktadır (67). Ayrıca, Alzheimer hastalarının ekstrasellüler alanda miktarı artan ve nöronal disfonksiyona yol açan glutaminin etkisini bloke etmek amacıyla FDA onaylı N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör blokörü olan memantin de Alzheimer'ın tedavisinde alternatif olarak kullanılmaktadır (80, 114, 115).

2.5. Karvakrol

Kolinerjik sistemdeki ana nörotransmitter, hafıza ve öğrenmede önemli bir rol oynayan asetilkolindir (ACh). Kolinerjik sistem, AH'ye yol açan fonksiyonel süreçlerde güçlü bir şekilde yer almakta ve bazal ön beyin kolinerjik kaybı Alzheimer da en iyi bilinen bir patolojik durum olarak ortaya çıkmaktadır. Hafıza bozukluğu ve demans, AH'nin temel semptomları olduğundan, merkezi sinir sistemindeki kolinerjik fonksiyon kaybının, yaşlanma ve AH ile ilişkili bilişsel fonksiyonlardaki düşüşe önemli ölçüde katkıda bulunduğunu ifade eden “kolinerjik hipotezin” ortaya çıkmasına neden olmuştur. Kolinerjik hipotez, bugüne kadar AH'na yönelik tedavi stratejileri ve ilaç geliştirme yaklaşımlarının çoğunluğunun temelini oluşturmuştur. ACh, kolin asetil transferaz enzimi aracılığı ile sentezlenir ve farmakolojik etkisi, kolinesteraz ile sonlandırılır. Omurgalılar iki kolinesteraz izoformuna sahiptir: temel olarak nöronlar ve aksonlar ile ilişkili asetilkolinesteraz (AChE) ve beyin içindeki glial hücreler tarafından salgılanan butirikolinesteraz (BChE). Kolinesteraz inhibitörleri ACh'nin parçalanmasını önler ve ACh konsantrasyonunu ve etki süresini artırarak hastalara septomatik olarak bir rahatlama sağlamaktadır. Günümüzde Alzheimer'in tedavisinde kolinesteraz inhibitörleri olan donepezil, rivastigmin ve galantamin ilaçları kullanılmaktadır. FDA onaylı bu ilaçlar, Alzheimer'la ilişkili davranışsal ve bilişsel fonksiyonlarda iyileşme sağlamaktadır fakat hastalığın seyrini değiştirmemektedir. Ek olarak, klinik denemeler ve invaziv olmayan fonksiyonel görüntüleme araştırmalarından elde edilen sonuçlar, kolinesteraz inhibitörlerinin APP'nin işleminden geçirilmesini değiştirebileceği ve bu nedenle bir dereceye kadar nöroprotektif etki sağlayabildiğini göstermiştir (67, 114, 116, 117).

NMDA antagonistleri:

Glutamaterjik nöronlar, sinaptik plastisite, nöronal büyüme ve farklılaşma, biliş, öğrenme ve hafızanın düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar. Ana eksitatör nörotransmitter olan glutamatın, sinaptik aralığa anormal şekilde uzun süreli salınımı eksitotoksisite ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Alzheimer'ın nöronal patolojisinde ortaya çıkan bu durum; hücre dışı glutamat birikimine, NMDA

reseptörü aktivasyonunun artmasına ve NMDA reseptörü aracılığıyla kalsiyum iyonu akışında bir artışa yol açarak öğrenme ve hafıza dâhil olmak üzere çoklu kalsiyum bağımlı işlevlerin düzensizliğine neden olmaktadır. FDA onaylı dört ilaçtan biri olan NMDA reseptör antagonisti memantin ise, NMDA reseptörlerini bloke edip glutamat kaynaklı nörotoksisiteyi engelleyerek etkisini göstermektedir (114, 116, 118, 119).

Amilod- β hedefli tedavi stratejileri:

Yapılan çalışmalar, A β peptit oluşumunun azaltılması amacıyla APP sentezinden sorumlu enzimatik yolların modüle edilmesine odaklanmıştır. Başka bir deyişle, α -sekretaz enziminin aktivasyonuna ve β -sekretaz ve/veya γ -sekretaz enzimlerinin inhibisyonuna yönelik ajanlar geliştirilmeye çalışılmıştır (54).

α -sekretaz enziminin aktivasyonu, APP'nin amiloidojenik olmayan yolak tarafından işlenmesine yol açmakta ve böylelikle amiloidojenik yolak için ortamdaki mevcut APP miktarının azalmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla, nöroprotektif ve sinaptogeneze rol alan çözülebilir A β peptiti oluşmaktadır. Bu amaç doğrultusunda geliştirilen Etazolat; APP işlenmesini amiloidojenik olmayan yola yönlendiren bir α -sekretaz stimülatörüdür. Etazolat, α -sekretazın nörotrofik etkisini uyarır; ayrıca semptomları hafifleten ve hastalık ilerlemesini değiştiren A β tarafından indüklenen nöronal ölümü de inhibe eder. Yapılan faz II klinik çalışmalarında, hafif ve orta dereceli AH'li 159 hastada Etazolat'ın genel olarak güvenirliliği olduğu ve iyi derecede tolere edildiği gözlenmiştir (54, 115, 120).

β -sekretaz enzimi APP'nin işlenmesi için amiloidojenik yolağın başlatılmasından sorumludur. β -sekretazın inhibisyonu, AH için ideal bir tedavi stratejisi olarak görülmektedir. Çünkü başlangıçta amiloidojenik yolak iptal edilerek amiloid beta oluşumu önlenmiş olacaktır. β -sekretaz enziminin inhibisyonuna yönelik yapılan çalışmalarda bir takım zorluklarda ortaya çıkmaktadır. β -sekretazı inhibe eden ilaçların miyelinazasyona katılan büyüme faktörü neuregulin 1'i de engellemesi, aspartik proteaz sınıfına ait olduğu için inhibitörünün büyük olmasından dolayı kan-beyin bariyerini kolayca geçememesi ve ayrıca APP'ye oranla β -sekretazın daha fazla substrat içermesi β -sekretaz inhibisyonunun geliştirilmesinde

karşılaşılan zorluklardır. Faz I klinik çalışmaya giren tek β -sekretaz inhibitörü CTS-21166'dır (115, 121, 122).

γ -sekretaz enzimi, amiloidojenik yolda APP'nin son bölünmesinden ve böylece A β 40 ve A β 42 peptitlerinin üretilmesinden sorumludur. γ -sekretaz inhibitörü olarak geliştirilen Semagacestat, Faz III klinik denemelerinde plasebo grubuna kıyasla bilişsel fonksiyonlarda işlev bozukluğuna yol açması sebebiyle durdurulmuştur (54). Ayrıca APP'ye ek olarak diğer proteinler için de özellikle hücrel büyüme, farklılaşma, iletişim ve gelişiminde rol oynayan Notch proteini, substrat olan bu enzimin spesifik olmayan inhibisyonu nedeniyle γ -sekretaz inhibitörlerinin geliştirilmesini engelleyen en büyük faktördür (123, 124). Notch sinyalinin bozulması, mide, lenfatik, cilt ve bağışıklık sisteminde toksik reaksiyonların ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Notch sinyal yolağının bozulması nedeniyle gözlemlenen bu olumsuz etkiler göz önüne alındığında, yeni terapötik strateji olarak γ -sekretazın Notch koruyucu modülatörlerin geliştirilmesinin daha etkili olabileceği düşünülmektedir (84).

A β agregasyonunun önlenmesi, AH tedavisi için alternatif bir diğer terapötik stratejidir. Bu stratejinin gerekçesi, A β 'nin çözünmeyen fibriller ile agregasyonunu bloke etmek ve böylece beyinden A β 'nin klirensini arttırmaktır. Nörotoksik ve sinaptotoksik reaksiyonlara yol açan A β agregasyonlarının, A β -A β etkileşimlerini engelleyip birikmesini önleyen daha küçük yapıli moleküllerin geliştirilmesi hedeflenmiştir (125). Bu amaçla agregasyon ajanı olarak araştırılan inositol'ün izomerik formu olan Scyllo-inositol, çözünebilir A β peptitlerinin bir araya gelip birikmesini önlemektedir. Faz II'de başarılı sonuçlar veren bu bileşiğin klinik çalışmaları devam etmektedir (54). A β agregasyonu, bakır, demir ve çinko gibi metal iyonlarının varlığında artış göstermesi nedeniyle AH tedavisinde A β 'nin fibrilizasyonunu azaltma potansiyeline sahip metal iyon tutucu ajanlar çalışılmıştır. AH'de denenmiş metal tutucu özelliklere sahip bir bileşik olan clioquinol, antifungal ve antiprotozoal bir ilaçtır. Beyindeki metaller ile A β peptidi arasındaki etkileşimi inhibe etmesi amacıyla araştırılan bu ilaç Faz II/ III klinik çalışmalarda başarılı sonuçlar vermemiştir (115, 126). A β agregasyon inhibitörlerine yönelik bir diğer çalışma ise, Faz II klinik denemesine ulaşmış olan tramiprosate

(glukosaminoglikan)'dır. A β peptidine bağlanarak A β 'yi fibril olmayan bir formda tutar ve böylece amiloid oluşumunu ve birikmesini önler. Ayrıca, glukozaminoglikanların, amiloid fibrillerinin oluşumuna ve A β plak oluşturmalarına katkıda bulunarak agregasyonu teşvik eden glukozaminoglikanların arasındaki etkileşimi de inhibe eder. Faz II klinik denemelerinde başarılı olmasına rağmen Faz III klinik denemesinde başarılı sonuçlar elde edilememiştir (127, 128).

Amiloid plakların parçalanmasından sorumlu enzimlerin aktivasyonunun artırılması AH tedavisi için alternatif olarak düşünülen bir diğer terapötik yaklaşımdır. Amiloid agregatları ve plakları, neprilisin, insülin degrade edici enzim (IDE), plazmin, endotelin dönüştürücü enzim, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) ve metaloproteinaz gibi farklı proteazlarla parçalanır. Bu enzimlerin seviyesi AH'de düşmekte ve bu durum amiloid plak oluşumuna ve birikmesine katkı sağlamaktadır. Her ne kadar bu, hastalık modifiye edici ilaçların geliştirilmesinde ilgi çekici bir stratejisi olarak gözüксе de, şu anda hiçbir proteaz aktivatörü spesifik olmaması nedeniyle çalışılamamıştır (129, 130).

AH tedavisi için anti-A β immünoterapötik ajanların geliştirilmesi alternatif bir diğer yaklaşımdır. İmmünoterapi, senil plakların oluşumunu ve degradasyonunun önlenmesi veya A β 'nin nöronal hücrelerden klirensinin artırılmasını amaçlayan bir strateji olup Alzheimer da amiloid miktarını azaltmada en çok araştırılan aktif immünizasyon (A β aşısı) ve pasif immünizasyon (A β antikorları) yöntemlerini içermektedir (131). Bağışıklık kazandırma tekniklerinden biri olan aktif immünizasyon yani aşılama, T ve B hücrelerini uyarmaya ve mikrogliya'ların fagositik kapasitesini aktive ederek bir immün tepkisi oluşturmaya dayanır (54). Ayrıca yapılan son araştırmalarda A β aşısının, Tauopati ile ilgili NFY'lerde bir azalmaya yol açabileceğini göstermiştir (132). Hastalarda 42 amino asitli amiloid peptidinden oluşan ilk A β aşısı AN1792 test edildiğinde, T hücrelerinin aracılık ettiği bir anti-AN1792 otoimmüne yol açarak meningoensefalit gibi nöroinflamatuvar yan etki ortaya çıkarmasından dolayı faz II klinik çalışmaları durdurulmuştur (133). Farmakolojik bir firma tarafından tasarlanan A β aşısı olan CAD 106 ile tedavi edilen hastaların % 75'inde herhangi bir enflamatuar etkiye yol açmadan toksik oligomerler ve fibriller dâhil olmak üzere A β 'nin farklı agregasyonlarına bağlandığı ve bu

toksisiteyi n t rleştirebildiği gözlemlenen faz II klinik çalışmalar tamamlanmıştır (134).

Çalışılan başka bir immünoterapi yöntemi olan pasif immünizasyon ise A 'yı hedef alan monoklonal veya poliklonal antikörlerin pasif olarak intravenöz yolla uygulanmasını içerir. Bu stratejide amaç T hücrelerinin aracılık ettiği bir proinflatuar reaksiyona yol açmadan bir anti-A immün tepkisi uyandırmaktır. Transgenik hayvanlarda yapılan çalışmalar da, pasif immünizasyonun nöronlardaki sadece amiloid miktarını değil, aynı zamanda nöronal amiloid plakların elimine edilmesinden önce bile bilişsel fonksiyonlardaki zayıflığı azalttığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular, AH'da meydana gelen patofizyolojik yolak üzerinde temel bir rol oynadığına inanılan        amiloid oligomerlerinin nötralizasyonuna dayandırılmaktadır (135, 136). Bu kapsamda geliştirilen monoklonal antik rlardan Bapineuzumab, A  proteininin N terminaline (A  1-5); Solanezumab ise A  proteininin (A  12-28) orta bölümüne bağlanabilmesi için tasarlanmış antik rlardır. Bapineuzumab ve Solanezumab, hafif-orta şiddetli Alzheimer hastalarında yapılan faz II/III klinik denemelerinde başarılı sonuçlar vermemiştir (137, 138).

Alzheimer hastalarında bilişsel işlevlerdeki azalmayı doza bağlı bir şekilde yavaşlatmak için geliştirilen çeşitli antik rlardan bir diğeri olan fare monoklonal antik runun insanlara uyarlanmış IgG1 versiyonu olan BAN2401, büyük     lebilir A  protofibrillerine seçici olarak bağlanır. Yapılan faz II klinik denemelerinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir (139, 140). Gantenerumab, A  fibriller üzerinde eksprese edilen konformasyonel bir epitopa bağlanması için yüksek bir afiniteye sahip olacak şekilde tasarlanmış bir insan IgG1 antik rudur. Bu antik run terapötik temeli, mikroglialar tarafından alınımını ve fagositoz aktivasyonunu içeren bir işlem yoluyla amiloid plakların parçalanmasıyla etki göstermesidir. Hafif AH ve AH'nın prodromal evrelerinde olan hastalarda Gantenerumab'ın etkinliğinin değerlendirildiği faz III klinik çalışmalar devam etmektedir (141-143).

Tau hedefli tedavi stratejileri:

Nöronal h celer tarafından eksprese edilen Tau proteini özellikle de aksonal morfoloji, büyüme ve polariteyi düzenleyerek mikrotübülleri stabilize etmektedir.

Çeşitli fosforilasyon bölgelerine sahip olan Taunun fosforile edilmesiyle mikrotübüllere afinitesi azalır. Hiperfosforile edilmiş Tau heliks yapıdaki filamentler şeklinde birikerek Alzheimerin nöropatolojisinde yer alan NFT'leri oluşturur. Bu nedenle, Alzheimer de Tau patolojisini inhibe etmeyi amaçlayan yeni terapötik yaklaşımlar geliştirilmesi hedeflenmiştir (80, 119).

Tau fosforilasyonu, Tauopatinin en önemli patojenik evrelerinden biri olması nedeniyle Tau hiperfosforilasyonunda rol alan kinaz ve fosfataz enzimlerinin inhibisyonuna yönelik ajanlar geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda Tau fosforilasyonunda rol oynayan birincil enzimlerden biri olan glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3) üzerine odaklanılmıştır (80, 118). Lityum ve valproat, GSK3 üzerinde inhibe edici etkilere sahip olduğu ve transgenik farelerde Tau patolojisini azalttığı bildirilmiştir (144, 145). Bununla birlikte Alzheimer hastalığı ve progresif supranükleer palsinin tedavisi için araştırılan Tideglusib, faz II klinik çalışmalarında bulunan tek GSK-3b inhibitörüdür. Tau fosforilasyonunu azalttığı, insan nöroblastom hücre ve murin primer nöron hücre hatlarında apoptozu önlediği bildirilmiştir. Bununla birlikte, AH'li 306 hastadaki kısa süreli (26 haftalık) bir faz II deneyinde ise beyin hacmindeki kaybı geciktirdiği ve bilişsel bir iyileşme eğilimi gösterdiği rapor edilmiştir (146).

Mikrotübülleri stabilize etmekte rol oynayan Tau proteini, patolojik koşullarda mikrotübüllerden koparak mikrotübüllerin bozulmasına yol açmaktadır. Böylece mikrotübülün stabilizasyonu, Tau kaynaklı nörotoksisiteyi telafi etmek için potansiyel bir terapötik yaklaşım olarak kabul edilmektedir (87). Bu amaç doğrultusunda, mikrotübül stabilize edici etkilere sahip çeşitli bileşikler geliştirilmektedir. Mikrotübül stabilizatörü paklitakselin, AH'nin tau-transgenik farelerde hızlı aksonal taşınımı, mikrotübül yoğunluğunu ve motor fonksiyonunu geliştirmesine rağmen toksik yan etkilere sahip olması nedeniyle klinik çalışmaları gerçekleştirilememiştir (147). Epsilon D, kan-beyin bariyeri klirensi ile bilinen başka bir mikrotübül stabilize edici bileşik olup mikrotübül patolojisinde belirgin bir iyileşme gösterdiği bildirilmiştir (148). NAP (NAPVSIPQ) ve D-SAL (SALLRSIPA), mikrotübül stabilizasyon etkilerine sahip iki nöropeptittir (149). NAP, nöronal ve glial tübülün ile etkileşime girer ve böylece Tau fosforilasyonu

üzerinde inhibitör etki göstererek mikrotübül dinamiğini düzenler. Peptidin burun içi uygulanması da denenmiş olup ön çalışmalar AH hayvan modellerinde olumlu sonuçlar göstermiştir. Ayrıca BMS-241027, hafif AH'li hastalarda halen faz I denemelerinde bulunan küçük moleküllü bir mikrotübül stabilizatörüdür (114).

Tau-Tau etkileşimlerini ve NFY birikiminin önlenmesine yönelik araştırılan bileşikler, Tau hedefli terapötik yaklaşımlardan biridir. Astemizol, lansoprazol gibi bazı ilaçlar, Tau proteinine bağlanmada güçlü bir afinite göstermesi dolayısıyla Tau-Tau etkileşimini dolaylı olarak azaltır (114). Metiltiyoninyum klorür (metilen mavisi, MT), birinci nesil Tau agregasyon inhibitörüdür. Tau etkileşimlerini önlediği, Aβ agregasyonunu ve AChE aktivitesini inhibe ettiği, oksidatif stresi azalttığı ve Tau transgenik farelerde biliş bozukluğunu önlediği bildirilmiştir. Fakat Faz II klinik çalışmalarda ortaya çıkan yan etkiler nedeniyle MT'nin klinik araştırmaları sonlandırılmıştır (119, 150). İkinci nesil bir Tau agregasyon inhibitörü olan löko-metiltioninyum (LMTM, TRx0237), Faz III çalışmalarında, hafif ila orta şiddetli AH hastalarda bilişsel ve fonksiyonel becerilerde başarılı sonuçlar elde edilememiştir (151).

Aktif ve pasif immünoterapi ile hiperfosforile Tau klirensinin artırılması başka bir terapötik yaklaşımdır. AADvac1, NFY'ın oluşumunun ilerlemesini inhibe eden ve patolojik Tauyu hedef alarak AH'nin ilerlemesini yavaşlatan veya durduran ilk aktif peptid aşısıdır. İnsanlarda denenilen ilk aktif Tau immünoterapi adayı olan AADvac-1, Faz II klinik deney aşamasında olup patolojik Tau'ya karşı yüksek afiniteye sahip antikoru indükleyerek Tau oligomerlerinin ve hiperfosforile Tau seviyesi ile NFY miktarını azalttığı bildirilmiştir (152). İncelenmekte olan bir başka aktif Tau-hedefli immünoterapi aşısı ACI-35'tir. Fosforlanmış Tau'yu taklit etmek için sentetik fosforlanmış bir peptit taşıyan lipozom bazlı bir aşı olup Faz I klinik deney aşamasındadır (118).

Tau antikoru 43D ile pasif immünizasyonun, hem Tau hem de Aβ patolojilerini azalttığını ve 3xTg-AD farelerinde bilişsel fonksiyonları geliştirdiği ve AH ile ilgili Tauopatiler için potansiyel bir tedavi olduğu bildirilmiştir (132). Yapılan bir başka pasif immünizasyon çalışmasında ise oligomerik Tau peptidlerine

karşı spesifik bir monoklonal antikor kullanarak P301L transgenik farelerde oligomerik Tau miktarını azaltırken motor fonksiyonlarda iyileşme göstererek Tau'dan kaynaklı patogeneze karşı etkili bir şekilde koruma sağladığı bildirilmiştir (153). Pasif immünizasyon tekniği ile hiperfosforile Tau moleküllerine, Tau fragmanlarına Tau oligomerlerine ve Tau agregatlarına karşı üretilen monoklonal antikorların terapötik etkilerinin araştırıldığı klinik çalışmalar devam etmektedir (80).

Antioksidanlar

Oksidatif stresin AH'nin patogenezinde rol alarak nöronal hücre disfonksiyonuna, A β birikimine ve hücre ölümüne yol açtığı bilinmektedir. Alzheimer'li hastaların beyinlerinde protein oksidasyon ve lipid peroksidasyon ürünlerindeki artış, antioksidan enzim aktiviteleri ve ekspresyonlarındaki azalmanın gözlemlenmesi antioksidanların AH tedavisinde kullanılmasının yararlı olabileceği ileri sürülmüştür (154). Bu amaç doğrultusunda, nörotrofik ve nöroprotektif etkiye sahip antioksidan bileşiklerin/bitki ekstratlarının geliştirilmesi AH'nin önlenmesi ve tedavisinde yeni terapötik bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir (155).

Çay, soğan ve kakao (soğan elmalar, meyveler, yer fıstığı, soya fasulyesi, patates, brokoli, üzüm) dahil birçok bitkide bulunan flavonoid bir molekül (polifenolik bir flavonoid molekülü) olan Quercetin, AChE'yi inhibe ederek nöroprotektif aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (156, 157). *In vitro* çalışmalarda A β 40, A β 42 ve A β 35 sitotoksitesine karşı güçlü bir koruma sağladığı belirtilirken; hayvan çalışmalarında ise Quercetin'in, oksidatif stresi modüle ederek A β 42 ile indüklenen toksisiteye karşı koruma sağladığı, hafıza ve kolinerjik fonksiyon bozukluğunun önlenmesinin yanı sıra bilişsel yeteneklerini geliştirdiği ifade edilmiştir (158, 159).

Kurkumin, zerdeçal (*Curcuma longa*) bitkisinin rizomundan elde edilen ve antioksidan aktiviteye sahip polifenolik bir bileşendir (160). Antienflamatuar, antikarsinojenik ve antimikrobiyal özellikleri bilinen kurkuminin ayrıca AChE inhibitör aktivitesine sahip olduğu yapılan çeşitli çalışmalarla tespit edilmiştir (117, 161). Kurkumin, *in vitro* koşullarda Alzheimer'ın β -amiloid fibrillerine karşı anti-amiloidojenik etki gösterdiği ve bilişsel fonksiyonlarda iyileşme sağladığı rapor

edilmiştir (162). Bu etkiyi, GSK-3 aracılı Tau fosforilasyonunu β -sekretaz ve γ -sekretaz aktivitesini inhibe ederek A β kaynaklı mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu, oksidatif stresi ve A β 40 ile A β 42 oluşumunu inhibe etmesi şeklinde nöroprotektif etki göstererek gerçekleştirmektedir (163, 164). Altı ay boyunca kurkumin tedavisi uygulanan hafif-orta şiddetli Alzheimer hastaları üzerinde yapılan bir Faz II klinik çalışmasında bilişsel işlevde ve plazma veya beyin omurilik sıvısında A β , total Tau ve fosforile edilmiş Tau seviyelerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (116, 165).

Antioksidan, antienflamatuar, fitoöstrojenik, kardiyoprotektif ve antikarsinojenik gibi çeşitli biyolojik aktivitelere (166-168) sahip olan Resveratrol, bazı bitkilerde, özellikle de üzüm kabuğunda ve tohumlarında bulunan bir polifenoldür (169). Resveratrolün A β 42 fibril oluşumunu, birikimini ve sitotoksiteyi inhibe ettiği ve oligomerlerin oluşumuna yol açan önceden oluşmuş fibrilleri de depolimerize ettiği bildirilmiştir (170, 171). Resveratrolün moleküler mekanizmasına yönelik çalışmalarda iki bağlanma bölgesinin bulunması ve amiloid polipeptidlerine bağlanarak yapılarında belirgin konformasyonel değişikliklere yol açmasıyla birlikte fibril oluşumunu önleyerek inhibitör etki gerçekleştirdiği ileri sürülmüştür (172). Ek olarak, resveratrolün hipokampüsteki nörodejenerasyonu azalttığı ve fare modellerinde bilişsel işlevlerdeki azalmayı önlediği de bildirilmiştir (169). Ayrıca Resveratrol, α -sekretaz enziminin up-regülasyonunu sağlamakla birlikte ve APP'nin amiloidojenik olmayan yolda işlenmesini de teşvik etmektedir (158). Resveratrol şu anda Faz II klinik aşamasındadır (173). Amiloid nöropatolojisinde, A β ligomerizasyonunda ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör ekspresyonundaki rolü nedeniyle resveratrolün nöroprotektif potansiyele sahip olması (174-176) ve standart kolinerjik inhibitörlere (galantamin) göre daha etkili kolinerjik inhibisyona sahip olmasından (177) dolayı AH tedavisi için yeni bir terapötik ajan olarak kullanımı önerilmektedir.

Antioksidan ve AChE inhibitörü olan epigallocatechin gallate (EGCG), yeşil çayda (*Camellia sinensis*) bulunan temel biyofenol bir bileşiktir (178). EGCG, β -amiloid ile indüklenen nörotoksitenin azaltılması, Protein Kinaz-C sinyal yolağının modülasyonu, kolinerjik iletimin kolaylaştırılması, nörit büyümesini ve bilişsel

fonksiyonları artırarak nöroprotektif etki sağlamaktadır (117). EGCG anti-aggregasyon etkisini, katlanmamış veya yanlış katlanmış A β peptitlere kovalent olmayan bağlarla bağlanarak A β 'nin fibrilleşmesini ve agregasyonunu inhibe etmesiyle göstermektedir (179). EGCG'nin tek veya memantin ile birlikte kullanımı eksitoksisite hasarlarına karşı önemli ölçüde koruma sağladığı yapılan hayvan çalışmalarında da tespit edilmiştir (116). Ayrıca hem mutant PS2 AH hem de A β ile indüklenmiş modeller kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise, EGCG ile tedavi sonrasında, hafızayı ve α -sekretaz aktivitesini arttırdığı, A β peptit miktarını, β ve γ -sekretaz enzim aktivitelerini ise azalttığı bulunmuştur (180).

Rosmarinik asit, *Salvia officinalis* (Adaçayı), *Rosmarinus officinalis* (biberiye) ve *Melissa officinalis* (Limon melisa otu) gibi birçok bitkide bulunan polifenolik bir bileşiktir (181). A β 42 tarafından indüklenen ROS oluşumu, lipid peroksidasyonu, DNA fragmentasyonu, kaspaz-3 aktivasyonu ve Tau protein hiperfosforilasyonunun neden olduğu nörotoksisiteyi önlediği, hem fibril oluşumu hem de oligomer birikimini inhibe ettiği yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (182). Antioksidan ve AChE inhibitör aktivitesine (183, 184) sahip olan Rosmarinik asitin, stres ve yaşlanma ile indüklenen çözünmeyen fosforile Tau proteininin oluşumunu da azalttığı bildirilmiştir (185). Reaktif nitrojen türlerinin yol açtığı A β 35 nörotoksisitesine karşı nöroprotektif etki gösterdiği (186) ve bunun yanı sıra hayvan modellerinde hastalığın ilerlemesini geciktirdiği (187) ve kognitif fonksiyonları iyileştirdiği de belirlenmiştir (188). Melatonin, şu anda faz II çalışmasında bulunan bir diğer güçlü antioksidandır (119). Beyinde endojen olarak üretilen bir hormon olan Melatonin, yaşlanmada ve Alzheimer'li hastalarda miktarı azalmaktadır. Klinik çalışmalardan elde edilen veriler melatonin takviyesinin uykuyu iyileştirdiğini ve Alzheimer hastalarında bilişsel fonksiyonlardaki bozulmanın ilerlemesini yavaşlattığını göstermektedir (114). Melatoninin, nöronal hücreleri, antioksidan ve anti-amiloid özellikleri yoluyla A β aracılı toksisiteden etkili bir şekilde koruduğu ve A β oluşumunu önlemekle beraber amiloid fibrillerin oluşumunu da engellediği bildirilmiştir (189). Ayrıca, melatoninin, Tau hiperfosforilasyonunu etkili bir şekilde azalttığı ve kolinerjik sistemin korunmasında önemli rol oynadığı da bildirilmiştir (190, 191). Kesin mekanizma hala tam olarak anlaşılmamasına rağmen, melatoninin

protein kinazların ve protein fosfatazların aktiviteleri üzerine doğrudan bir düzenleyici etki göstererek gerçekleştirdiği düşünülmektedir (114, 189).

Rutin, birçok bitkide (karabuğday tohumu gibi), meyvelerde (narenciye gibi) ve sebzelerde bulunan ve antikanserojen, sitoprotektif, antitrombosit, vazoprotektif ve kardiyoprotektif aktiviteler dâhil olmak üzere birçok farmakolojik özelliğe sahip önemli bir flavonoiddir (192). A β 42 fibril oluşumunu ve β -sekretaz aktivitesini inhibe ettiği, A β agregasyonunu ve sitotoksisiteyi önlediği (193) ve bunun yanı sıra reaktif oksijen türlerinin, nitrik oksit, glutatyon disülfid ve malondialdehit oluşumunu azalttığı, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerini arttırarak mitokondriyal hasarı önlediği bulunmuştur (194). Ayrıca mikrogliya'da TNF- α ve IL-1 β oluşumunu azaltarak proinflamatuvar sitokinlerin üretimini modüle ettiği belirlenmiştir (192).

Havuç, biber, kereviz, zeytinyağı, nane, kekik ve biberiye gibi çeşitli bitkilerde (195) bulunan bir flavonid biyofenol olan Luteolinin, A β 42 oluşumunu önlediği ve A β 35'in indüklediği nöronal ölümü inhibe ederek toksisiteye karşı koruduğu bildirilmiştir (196).

Antioksidan ve AChE inhibitör aktiviteleri bilinen yaban mersininin (197) nöroprotektif etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, A β 'nin mikrogliyal klirensini önemli ölçüde arttırdığı, A β 42 agregasyonunu inhibe ettiği ve mikrogliyal aktivasyonu bastırdığı bulunmuştur. Bu etkiyi p44/42 mitojenle aktive olan protein kinaz modülünün baskılanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (116, 191). Hafif-orta şiddetli AH hastalarında yaban mersininin nörobilişsel işlev üzerindeki etkisinin araştırıldığı klinik bir çalışmada ise antidepresan potansiyele sahip olduğu, öğrenme ve hafıza üzerinde önemli derecede iyileşme sağladığı, nöroplastisiteyi geliştirdiği, β -amiloid'in klirensini artırdığı ve inflamasyonu azalttığı bildirilmiştir (198).

AH'nın önlenmesi ve tedavisinde yeni stratejik bir yaklaşım olarak antioksidan özellikli nanopartiküllerin kullanılması da önerilmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmada, trifenilfosforyum Ceria nanopartiküllerin (TPP-ceria NP) mitokondriyal oksidatif strese karşı nöroprotektif etkisi araştırılmıştır. Beş nanometreden daha küçük boyutta olan Ceria (CeO₂) nanopartikülleri, SOD ve CAT

gibi katalitik özelliklere sahiptir. O₂ ve H₂O₂'yi etkili bir şekilde ortadan kaldırarak hücreleri oksidatif strese karşı koruyabilmektedir. Bu özelliği, CeO₂'nin oksijen atomlarını geri dönüştürülebilir bir şekilde bağlayabilmesi ve ayrıca nanopartiküllerin yüzeyinde bulunan Ce⁴⁺ ve Ce³⁺ arasında hızlı bir şekilde dönüşebilmesinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, kardiyoprotektif, antikanserojen, yara iyileşmesi, kronik inflamasyon ve oküler bozukluklar gibi çeşitli hastalıkların tedavisi için de kullanılmaktadır. Trifenilfosfonyum (TPP), negatif mitokondri membran potansiyelinden yararlanarak mitokondriyi hedef alabilen lipofilik bir katyondur. Son zamanlarda, AH tedavisi için yeni bir yaklaşım olarak elektrostatik adsorpsiyon yoluyla mitokondriye lokalize olabilen küçük ve pozitif yüklü trifenilfosfonyum (TPP) ile modifiye edilmiş CeO₂ nanopartiküllerinin tasarımı ve sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nanokompozitin *in vivo* ve *in vitro* AH modellerinde nöronal ölümü inhibe ettiği ve ROS'u elimine ederek oksidatif stresi azalttığı bulunmuştur (199). Ayrıca, TPP-ceria NP'lerinin reaktif nöroglia ve mitokondriyal hasarı azalttığı da bildirilmiştir. Sonuç olarak, AH için yeni bir stratejik tedavi yöntemi olarak TPP-ceria NP'lerinin AH'de mitokondriyal oksidatif strese bağlı hasarın tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olarak kullanılabileceği önerilmektedir (200).

Karvakrol

Karvakrol, *Thymus* (kekik), *Origanum*, *Satureja* ve *Corydorthymus* da dâhil olmak üzere Lamiaceae familyasının uçucu yağlarında bulunan fenolik bir monoterpendir (25). Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda karvakrolün, antibakteriyel (201), antifungal (202), antiviral (203), antikanser (204), antioksidan (26), anti-inflamatuvar (27), anti-obezite (205), antidepresan (206), antitümör (204) aktivitelerine sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, karvakrolün metabolik enzimleri modüle ederek hasar görmüş organları yenileyebildiği de bildirilmiştir (207). Bununla birlikte, karvakrolün asetilkolin esterase inhibitör aktivitesine sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır (28-30). Karvakrol ile AChE'nin AChE'nin etkileşimi büyük olasılıkla proteinlere bağlanan fenolik hidroksil grubuna dayandırılmaktadır, burada konformasyonel bir değişime neden olarak işlev kaybına yol açtığı kabul edilmektedir (28). Ayrıca, düşük moleküler ağırlığına ve lipofilik yapıya sahip

olmasından dolayı karvakrolün, kan-beyin bariyerini kolayca ve hızlı bir şekilde geçtiği bilinmektedir (208).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez kapsamında kullanılan kimyasal malzemelerin ve kitlerin listesi Çizelge 3.1 'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmada Kullanılan Kimyasal ve Kitlerin Listesi.

Kimyasallar ve Kitler	Alındığı Firma
Amyloid beta peptid insan (A β 1-42)	Cayman Chemical Company®
Amyloid beta peptid rat (A β 1-42)	Sigma-Aldrich®
Amyloid Beta 1-40 Rat Elisa Kit	Bioassay Technology Laboratory®
Amyloid Beta 1-42 Rat Elisa Kit	Bioassay Technology Laboratory®
Catalase (CAT) Assay Kit	Bioassay Technology Laboratory®
DMEM-F12 Medium	Sigma-Aldrich®
DMSO (Dimethyl Sulfoxide)	Panreac Applichem®
FBS (Fetal Bovine Serum)	Sigma-Aldrich®
Hydrogen Peroxide (H ₂ O ₂) Assay Kit	Cayman Chemical Company®
LDH Assay Kit	Cayman Chemical Company®
Malondialdehyde (MDA) Assay Kit	Bioassay Technology Laboratory®
MTT Cell Proliferation Assay Kit	Cayman Chemical Company®
N-2 Supplement	Gibco®
PBS (Phosphate-Buffered Saline)	PAN Biotech®
Penicillin-Streptomycin Solution	Sigma-Aldrich®
Retinoic Acid	Sigma-Aldrich®
Superoxide Dismutase (SOD) Assay Kit	Bioassay Technology Laboratory®
Tau Protein Rat Elisa Kit	Bioassay Technology Laboratory®
Trypan Blue Solution	Bio-rad Laboratories®
Trypsin/EDTA Solution	Sigma-Aldrich®

3.2. Kullanılan Laboratuvar Gereçleri ve Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan malzeme ve cihazların listesi Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Araştırmada Kullanılan Malzeme ve Cihazların Listesi.

Malzeme ve Cihaz Adı	Modeli
Buzdolabı	Samsung
Cryo vial	Isolab
Derin dondurucu (-80°C)	Nüve, DF 490
Distile su cihazı	Kros
Elektronik hassas terazi	Ohaus
ELISA okuyucu	Bioteck Epoch
ELISA plak yıkayıcısı	ELx50 Bioteck
Eppendorf tüp (1,5 ml)	Pirovet SSIBio
Etüv	Nüve, EC160
Falkon tüpler (15 ml, 50 ml)	Isolab
Hücre kültürü flaskaları (25-75 cm ²)	TPP
Hücrekültürü plakları (48-96 kuyucuklu)	TPP
İnvert mikroskop	Olympus
Karbondioksitli doku kültür etüvü	Nuaire, Nu4750E
Laminer flow bench (Class II)	Bilser
Mikropipetler (1000, 200, 100, 10, 2 µl)	Finpipette Labsystems
Otomatik pipet	Thermo scientific
Santrifüj	Nüve, NF 400R
Sıvı azot tankı	Statebourne biorack 3000
Steril pastör pipeti	LP Italiana SPA
Su banyosu	Electro-mag M96KD
Vorteks	Velp scientifica

3.3. *In vitro* Çalışmalar

3.3.1. Hücre kültürü

ATCC® hücre kültürü koleksiyonundan temin edilen insan nöroblastom hücre hattı olan SH-SY5Y hücreleri (ATCC®, CRL-2266™) tez çalışması kapsamındaki in vitro araştırmalarda kullanılmıştır. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri için kültür ortamı olarak Dulbecco’s modified Eagle medium-high glucose (DMEM): F12 besiyeri içine %10 inaktif edilmiş fetal bovin serumu (FBS), %1 Antibiyotik-Antimitotik Solüsyon (penicillin-streptomycin) ve %1 N-2 Supplement eklenerek besiyeri ortamı oluşturulmuştur. Bu besiyerini içeren 25 ve 75 cm²’lik kültür flasklarına ekimi yapılan hücreler 37°C ve %5 CO₂ içeren koşullarda inkübe edilmiştir. Hücre yoğunluğunun %70-80 ulaşmasının ardından hücreler pasajlanma

işlemiyle çoğaltılmıştır. Pasajlanma işleminde flasklarda bulunan besiyeri ortamdan uzaklaştırılarak fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi ile yıkanmıştır. Tripsin/EDTA solüsyonu eklenen flasklar 2 dk boyunca inkübatörde bekletilmiştir. Flask tabanından tamamen ayrılan hücrelere yeni besiyeri eklenerek 3000 rpm'de 4 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda süpernatant uzaklaştırılarak taze besiyeriyle yeniden süspanse edilmiştir. Besiyeri ortamı iki günde bir olacak şekilde yenilenmiştir (209).

3.3.2. SH-SY5Y hücrelerinin farklılaştırılması

SH-SY5Y hücrelerinin farklılaştırma işlemi Bittencourt Pasquali ve arkadaşları (210) tarafından önerilen yöntem esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre hücrelerin 75cm²'lik flasklara 1,5x10⁴ hücre/cm² olacak şekilde ekimi yapılmıştır. Hücrelerin ekilmesinden 24 saat sonra %1 FBS, 10 µM retinoik asit (RA) ve DMEM high glucose:F12 içeren farklılaşma besiyeri eklenmiştir. Her 3 günde bir kültür ortamı değiştirilerek farklılaştırma işlemi 5 gün boyunca devam etmiştir.

Daha önce Lee ve arkadaşlarının tarif ettiği gibi (211), SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinin farklılaştırılmış hücrelere dönüşmüş olmaları, 5 günlük retinoik asit uygulamasından sonra mikroskop altında hücrelerin nörit uzantılarının ve çevresindeki nöronlarla sinaptik bağlantılarının oluşmuş olmasıyla doğrulanmıştır.

Amiloid betanın (Aβ1-42) kullanmadan önce peptitin agrege olabilmesi için serum fizyolojikte 37°C'de 72 saat boyunca inkübe edildi (249).

3.3.3. Amiloid beta peptidi (Aβ1-42) ile Oluşturulan *in vitro* AH Modeli ve Deney Grupları

Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerine amiloid beta uygulaması için; kültür flasklarına ekilen SH-SY5Y hücreleri RA varlığında farklılaştırılmıştır. Farklılaştırma süresinin sonunda flasklarda bulunan kültür ortamı 1, 5, 10, 25, 50, 100 ve 125 µM konsantrasyonlarda Aβ1-42 içeren taze farklılaştırma besiyeri eklenmiş ve 48 saat boyunca β-amiloid peptid ile inkübe edilmiştir. Hücreler 96

kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğunda 1×10^4 hücre olacak şekilde plakaya yerleştirildi (249) ve aşağıda anlatıldığı gibi gruplara göre ilgili işlemler gerçekleştirildi.

İn vitro deney grupları şu şekilde oluşturulmuştur:

1. Kontrol Vehicle grubu: Farklılaşmış olan SH-SY5Y hücrelerinin besiyeri ortamına 50 µl serum fizyolojik eklenmiş ve 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu süre bitiminde hücrelerin besiyeri ortamına son konsantrasyonu % 0.1 olacak şekilde DMSO eklenmiş ve hücreler inkübatörde 24 saat daha inkübe edilmiştir.

2. Alzheimer grubu (AD): Bu gruptaki farklılaşmış olan SH-SY5Y hücrelerinin besiyeri ortamına ön çalışmalarda IC50 (50 µM) değeri bulunan 50 µM konsantrasyonda amiloid beta eklenmiş ve 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu süre bitiminde hücrelerin besiyeri ortamına son konsantrasyonu % 0.1 olacak şekilde DMSO eklenmiş ve hücreler inkübatörde 24 saat daha inkübe edilmiştir.

3. Karvakrol-100 (CVC-100): Bu gruptaki farklılaşmış olan SH-SY5Y hücrelerinin kültür ortamına 50 µM Aβ1-42 uygulamasından 48 saat sonra, son konsantrasyonu 100 µM olacak şekilde karvakrol eklenerek 24 saat daha inkübe edilmiştir.

4. Karvakrol-200 (CVC-200): Bu gruptaki farklılaşmış olan SH-SY5Y hücrelerinin kültür ortamına 50 µM Aβ1-42 uygulamasından 48 saat sonra son konsantrasyonu 200 µM olacak şekilde karvakrol eklenerek 24 saat daha inkübe edilmiştir.

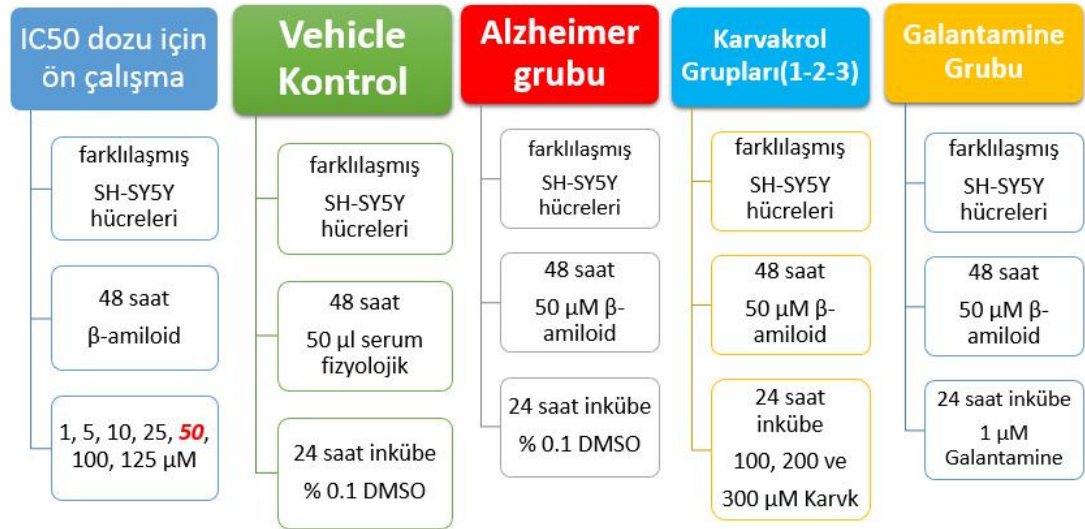
5. Karvakrol-300 (CVC-300): Bu gruptaki farklılaşmış olan SH-SY5Y hücrelerinin kültür ortamına 50 µM Aβ1-42 uygulamasından 48 saat sonra son konsantrasyonu 300 µM olacak şekilde karvakrol eklenerek 24 saat daha inkübe edilmiştir.

6. Galantamine (GLT): Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde kullanılan ve FDA tarafından onaylanan bir asetilkolin esterase inhibitörü olan Galantamine, karvakrolün etkinliğinin karşılaştırılması amacıyla pozitif kontrol

olarak kullanılmıştır. Bu amaçla bu gruptaki farklılaşmış olan SH-SY5Y hücrelerinin kültür ortamına son konsantrasyonu 50 µM olacak şekilde Aβ1-42 uygulamasından 48 saat sonra son konsantrasyonu 1 µM olacak şekilde Galantamine eklenerek 24 saat daha inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda süpernatantlar toplanarak Hücre Canlılık Testleri (MTT ve LDH), Tau proteini seviyesinin ölçümü, Oksidan-antioksidan parametrelerinin ölçümü (oksidan parametrelerden; MDA ve H₂O₂, antioksidan parametrelerden ise SOD ve CAT) ELISA kit ile ve üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. Yapılan ELISA protokolü bu bölümün sonunda genel olarak özetlenerek verilmiştir. Oluşturulan *in vitro* deney gruplarının şematik gösterimi Şekil 3.1.'de verilmiştir.

İN VİTRO GRUPLAR



Şekil 3.1. *In vitro* deney gruplarının şematik gösterimi.

3.4. İn vivo Çalışmalar

3.4.1. Deney hayvanları

Tez çalışmasında kullanılan ratlar Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilmiştir.

Deneylerde 200-300 gram ağırlığında ve 2-3 aylık toplam 28 adet erkek Wistar sıçan kullanılmıştır. Tüm hayvanlar deney süresince standart ışık 12 saatlik aydınlık/12 saatlik karanlık döngüsünde, 20–25 °C arasında, yeterli miktarda yem ve su verilerek plastik kafeslerde deney sonuna kadar bekletilmiştir. Çalışmanın tüm uygulamaları Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu (BAİBÜ-HADYEK) tarafından verilen 19.04.2018 tarihli ve Kararlar-25 sayılı yazısı ve 2018/18 nolu karar ile onaylanmıştır. Ayrıca çalışma finansal olarak Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2018.08.02.1364).

3.4.2. Amiloid beta peptidi (A β 1-42) ile Oluşturulan *in vivo* AH Modeli ve Deney Grupları

A β 1-42'nin sıçanlara bilateral intrahipokampal enjeksiyonu ile Alzheimer Hastalığı modelinin oluşturulması daha önce tarif edildiği gibi gerçekleştirilmiştir (17). Daha önce tarif edildiği gibi enjeksiyonlardan önce, A β 1-42 AH'deki gibi toksik özellik kazanması için serum fizyolojikte çözülerek inkübatörde 37°C' de 7 gün inkübe edildi (17). Hayvanlar 90 mg/kg ketamin+10 mg/kg ksilazin ile anestezi edildikten sonra kafa derisi üzerindeki kıllar traşlanarak batikon ile dezenfekte edilmiş olup stereotaksi aparatına yerleştirilmiştir. Daha sonra kafa hattının ortasında bistüri ile insizyon yapılmıştır. Bregmanın yerini tesbit etmek için, deri altı dokuları bistüri ile hafifçe kazınarak ve biriken kan ve doku sıvıları alınıp bregmanın görünür hale gelmesi sağlanmıştır. Stereotaktik koordinatlar (Bregma'nın 2.4 mm sol/sağ laterali ve 3,6 mm posteriorü, 2.8 mm ventrali) göz önüne alınarak 0.8 mm'lik matkap ucu ile kranyum delindikten sonra, daha önce serum fizyolojik içinde çözülerek hazırlanmış olan, 4 μ g A β 1-42 çözeltisi (1 μ L/taf) bilateral intrahipokampal enjeksiyonu, 0,2 μ L/dk hızla 1 μ L Hamilton mikroenjektörü ile yapılmıştır. Enjekte edilen A β 1-42 çözeltisinin geri çıkmasını önlemek için enjektör 10 dk boyunca belirlenen bölgede bırakılmıştır. Enjeksiyon tamamlandıktan sonra hayvan stereotaksik ayardan çıkarılıp kesi bölgesi suturela kapatılmış ve enfeksiyonu önlemek için batikon sürülmüştür. *In vivo* deney grupları aşağıda belirtildiği şekilde oluşturulmuştur:

1. Kontrol grubu (n=7): Bu gruptaki sıçanlara, Sham kontrol grubu oluşturmak için bilateral olarak intrahipokampal yolla 1 µl serum fizyolojik enjeksiyonu yapılmıştır. Daha sonra 6 gün boyunca sabah ve akşam olmak üzere günde 2 kez vehicle kontrol uygulama olarak intraperitoneal yolla serum fizyolojik içinde çözünmüş %0.1'lik DMSO uygulanmıştır**.

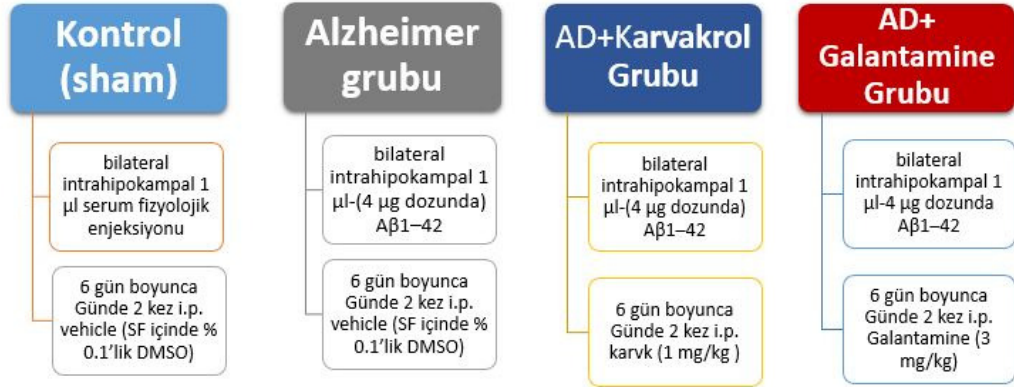
2. Alzheimer grubu (n=7): Bu gruptaki sıçanlara in vivo Alzheimer hastalık modeli oluşturmak için daha önce serum fizyolojik içinde çözülerek hazırlanmış olan 1 µl hacminde ve 4 µg dozunda Aβ1–42' nin bilateral intrahipokampal enjeksiyonu yapılmıştır. Daha sonra 6 gün boyunca sabah ve akşam olmak üzere günde 2 kez vehicle kontrol uygulama olarak intraperitoneal yolla serum fizyolojik içinde çözülen % 0.1'lik DMSO uygulanmıştır**.

3. Alzheimer+Karvakrol grubu (n=7): Bu gruptaki sıçanlarda öncelikle Alzheimer grubundaki gibi Alzheimer hastalık modeli oluşturulmuş olup daha sonra 6 gün boyunca sabah ve akşam olmak üzere günde 2 kez intraperitoneal yolla 1 mg/kg karvakrol (212) uygulanmıştır.

4. Alzheimer+Galantamine grubu (n=7): Bu gruptaki sıçanlarda öncelikle Alzheimer grubundaki gibi Alzheimer hastalık modeli oluşturulmuş olup daha sonra 6 gün boyunca sabah ve akşam olmak üzere günde 2 kez intraperitoneal yolla 3 mg/kg Galantamine (213) uygulanmıştır. Galantamine Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde kullanılan FDA onaylı bir ilaçtır (asetilkolin esteraz inhibitörü) ve karvakrolün etkinliğini karşılaştırmak amacıyla pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

** Sırasıyla üçüncü ve dördüncü gruba intraperitoneal yolla uygulanan Karvakrol ve Galantamin %0.1'lik DMSO' da çözüldüğü için gruplar arasında doğru bir karşılaştırma yapabilmek amacıyla Kontrol ve Alzheimer gruplarına vehicle kontrol uygulama olarak Karvakrol ve Galantamin'in ortak çözücüsü olan serum fizyolojik içinde çözülmüş %0.1'lik DMSO intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Oluşturulan *in vivo* deney gruplarının şematik gösterimi Şekil 3.2.'de verilmiştir.

İN VİVO GRUPLAR



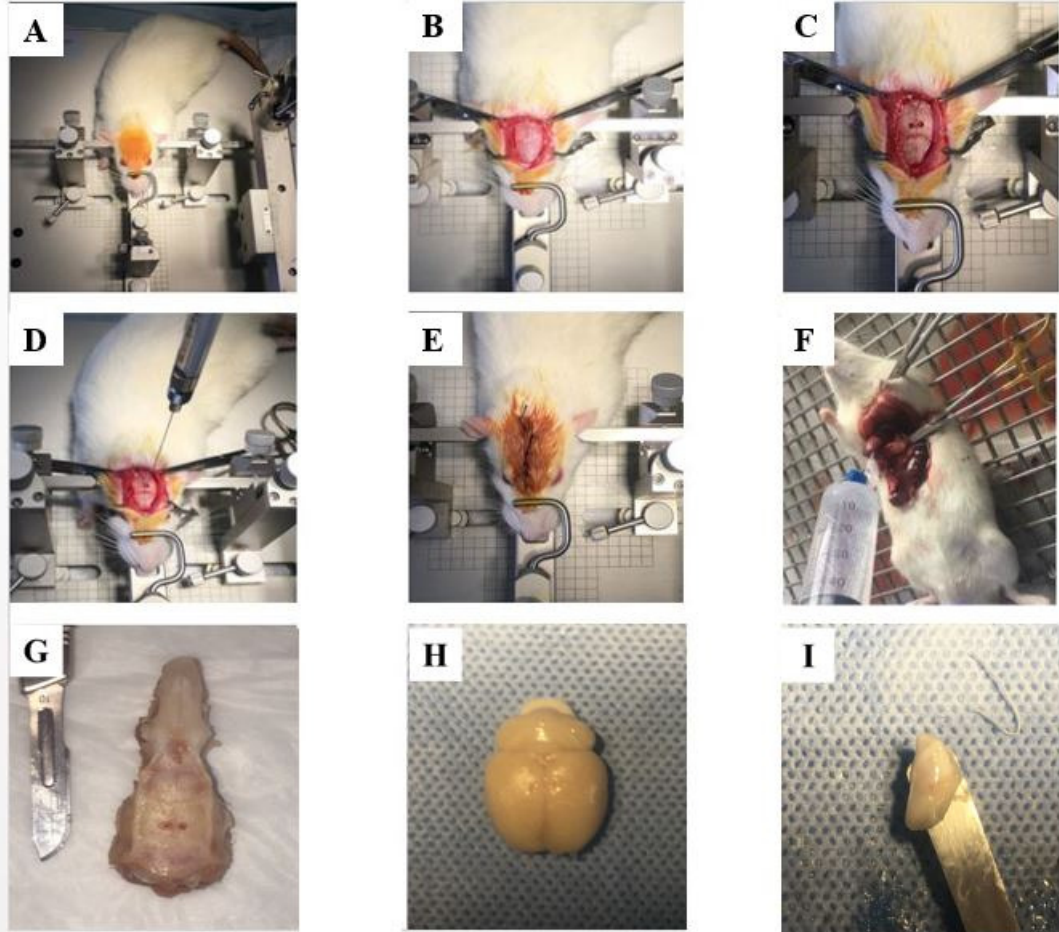
Şekil 3.2. *In vivo* deney gruplarının şematik gösterimi.

Tüm ratlara 6 günlük enjeksiyon uygulamalarından 24 saat sonra Pasif Sakınma Testi uygulanmıştır. Pasif sakınma testi uygulaması sonrasında tüm gruplardaki sıçanlardan ketamin anestezisi altında sağ ventrikülden yaklaşık 5 ml kan alınmış ve sıçanlar PBS ile intrakardiyak perfüze edilmiştir. Hayvanın beyini çıkarılarak bir hemisferdeki hipokampus bölgesi oksidan-antioksidan ve Tau seviyesi ölçümleri için hemen -80°C'ye konulmuş olup diğer hemisferdeki hipokampus bölgesi ise histolojik inceleme için %10'luk formaldehit içerisinde saklanmıştır. Alınan kan örnekleri 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve serum örnekleri -80°C'de saklanmıştır. Homojenize edilen hipokampusler ve serum örneklerine Tau proteini seviyesinin ölçümü, Oksidan-antioksidan parametrelerinin ölçümü oksidan parametrelerden; MDA ve H₂O₂, antioksidan parametrelerden ise SOD ve CAT) ELISA kit ile üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. Ayrıca serum örneklerinde Aβ1-40 ve Aβ1-42 peptid seviyelerinin ölçümü de ELISA metodu ile analiz edilmiştir.

Hipokampus dokularının homojenizasyonu aşağıdaki protokole göre gerçekleştirilmiştir:

Ratlardan elde edilen hipokampus doku örnekleri hassas terazide tartıldıktan sonra cam bir tüpün içerisine konuldu. Üzerlerine çalışma çözeltisi (140 mM'lık KCI çözeltisinden 1 gr doku için 9 ml çalışma çözeltisi) eklenerek homojenizatör

(ISOLAB, Wertheim, Germany) yardımıyla 3 dakika boyunca homojenize edildi. Homojenizasyon işlemi buz bir kalıbın üzerinde gerçekleştirildi. Homojenat 3000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra elde edilen hipokampus süpernatantları ependorf tüplere konularak analiz zamanına kadar -20°C'de saklandı.



Şekil 3.1. *İn vivo* AH modeli oluşturma ve deney sonunda hipokampusün çıkarılma aşamaları.

3.4.3. Pasif Sakınma Testi

Pasif sakınma, uzun ve kısa süreli belleği değerlendirmek amacıyla yaygın olarak kullanılan korku güdümlü bir testtir (214). Test düzeneği, giyotin bir kapı ile ayrılmış aydınlık ve karanlık 2 bölmeden oluşmaktadır. Düzeneğin zemininde ise sıçanların ayaklarına elektroşok verilebilecek şekilde iletken ızgara yüzey bulunmaktadır. Deneyin ilk gününde sıçanlar aydınlık bölmeye bırakılmış ve ortama alışması için de 10 dk süre verilmiştir. Bu sürenin ardından otomatik olarak açılan giyotinli kapı sıçanların karanlık bölmeye geçmesiyle kapanmıştır. Karanlık bölmeye geçen sıçanlara 3 sn süreyle 0,5 mA elektroşok uygulanmıştır. Deneyin ikinci günü

ise sıçanlar aydınlık bölüme bırakılmış ve karanlık bölüme geçme süreleri kaydedilmiştir. Aydınlık bölüme bırakılan hayvanın 300 sn içerisinde karanlık bölüme geçmediği durumda ise deney sonlandırılmıştır (215). Sıçanların karanlık bölümden aydınlık bölüme geçme süreleri pasif sakınma cihazı (Commat®, APAV-214 ELS, Türkiye) tarafından otomatik olarak kaydedilmiştir.

3.4.4. Histokimyasal Boyama

In vivo gruplardan elde edilen hipokampus dokuları paraformaldehitten çıkarılıp ksilol ve alkol solüsyon serilerinden geçirilerek parafine gömüldü. Parafin bloklardan 4-5 µm kalınlığında kesitler alındıktan sonra deparafinizasyon ve dehidrasyon işlemlerinden geçirilen kesitlere histolojik hematoksin-eozin boyama yapılarak hipokampus dokusu ve hipokampal nöronlar morfolojik olarak ışık mikroskobu altında değerlendirildi.

3.5. Biyokimyasal Analizler

3.5.1. Hücre Canlılığı Testleri

3.5.1.1. MTT Testi

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide) canlı hücreler tarafından koyu mavi-mor renkli formazanlara [(2E,4Z)-4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan] dönüştürülen sarı renkli bir substrat olup bu reaksiyon canlı hücrelerde bulunan aktif mitokondriler tarafından gerçekleştirilir ve hücre canlılığını ölçmek amacı ile kullanılır. Hücre canlılığı ve bileşiklerin sitotoksik etkilerini incelemek amacıyla üreticinin talimatlarına (Cayman Chemical Company®, Ann Arbor, MI, ABD) göre 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) çözeltisi kullanıldı. Kısaca, 96'lık plakelere ekilen farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin üzerine 10 µl MTT reaktifi eklendi ve 3 saat 37°C'de inkübe edildi. Süre bitiminde her bir kuyucuğa 100 µl kristal çözücü solüsyon eklenerek 4 saat 37°C CO₂'li inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonunda her bir örneğin absorbansı 570 nm'de okutularak % canlılık değerleri hesaplandı.

3.5.1.2. LDH Testi

Laktat Dehidrogenaz (LDH) hemen hemen her hücrede bulunan sitozolik bir enzimdir. Hücre membran bütünlüğü bozulduğu durumlarda ise ekstrasellüler ortama salınır. LDH sitotoksosite testi (Cayman Chemical Company®, Ann Arbor, MI, USA) üreticinin protokolüne göre gerçekleştirildi. Kısaca, 96'lık platelere 200 µl olacak şekilde ekimi yapılan farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra 400 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra 100 µl süpernatant alınarak yeni kuyucuklara aktarımı gerçekleştirildi. Her bir kuyucuğa 100 µl LDH reaksiyon solüsyonu eklenerek 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir örneğin absorbansı 490 nm'de ELISA okuyucuda (Epoch BioTek Instruments, Inc. Highland Park, Winooski, VT, USA) okutularak % sitotoksosite değerleri hesaplandı.

3.5.2. Antioksidan Parametreler

3.5.2.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Hücresinin enzimatik antioksidan savunmasında önemli role sahip olan Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit radikallerini nötralize ederek hücreyi oksidatif hasara karşı koruyan enzimatik bir antioksidandır. SOD, süperoksit (O_2^-) radikalini moleküler oksijene (O_2) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) katalizleyerek ortamdan süperoksitin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Oksijen metabolizmasının yan ürünü olarak oluşan süperoksit ortamdan uzaklaştırılmadığı takdirde apoptoza yol açarak hücre ölümüne neden olmaktadır. H_2O_2 ise CAT gibi diğer antioksidan enzimler tarafından parçalanmaktadır. Bu nedenle, SOD, oksijene maruz kalan hemen hemen tüm canlı hücrelerde önemli bir antioksidan savunma mekanizmasının ilk savunma hattını oluşturmaktadır (216). Süperoksit dismutaz aktivitesinin tespiti için kullanılan kit (Bioassay Technology Laboratory®, Shanghai, China) üreticinin protokolüne göre gerçekleştirildi.

3.5.2.2. Katalaz (CAT)

Katalaz (CAT), hücre içi organellerde özellikle peroksizom ve mitokondrilerde bulunan enzimatik bir antioksidandır. SOD tarafından süperoksit radikalının detoksifikasyonu sonucunda ortaya H_2O_2 'nin suya ve moleküler oksijene dönüştürülmesinden sorumludur. H_2O_2 , bir radikal olmaması ve biyolojik moleküllerle reaksiyona girmemesine rağmen, Fenton reaksiyonu ile en reaktif oksijen türlerinden biri hidroksil radikalının oluşumunda ve morfoloji, çoğalma, apoptoz, sinyalizasyon gibi birçok biyolojik sistemde ikinci bir haberci olarak rol almasından dolayı hücreden uzaklaştırılması oldukça önemlidir. Böylelikle CAT, H_2O_2 neden olabileceği oksidatif strese karşı hücrenin antioksidan savunma mekanizmasında önemli bir rol oynamaktadır (217). CAT aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılan kit (Bioassay Technology Laboratory®, Shanghai, China) üreticinin protokolüne göre yapıldı.

3.5.3. Oksidan Parametreler

3.5.3.1. Malondialdehid (MDA)

Serbest radikallerin yol açtığı lipid peroksidasyonu sonucu oluşan Malondialdehid (MDA), oksidatif hasarın tespitinde kullanılmaktadır (218). *In vitro* ve *in vivo* Alzheimer hastalığı modellerindeki MDA seviyeleri, üreticinin önerdiği protokole göre Bioassay Technology Laboratory®'den (Shanghai, China) Malondialdehid ELISA Kiti (Kolorimetrik) ile ölçüldü.

3.5.3.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Oksidatif stresin önemli bir belirteci olan hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit radikalının SOD tarafından veya mitokondriyal solunum sırasında univalent O_2 indirgemesi ile oluşmaktadır. Oksitleyici özelliğe ve hücre zarlarında serbestçe geçebilmesinin yanı sıra, ROS'un, özellikle de güçlü oksidanlar olan hidroksil radikal (OH) ve hipokloröz asidin (HOCl) öncüsüdür. CAT ve GSH-Px tarafından H_2O_2 'nin ortamdan uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (219). Hidrojen peroksit seviyesinin tespiti için kullanılan kit (Cayman Chemical Company®, Ann Arbor, MI, USA)

üreticinin protokolüne göre gerçekleştirildi. Kısaca, 96'lık platelerin her bir kuyucuğuna 100 µl ekilen farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra üzerlerine 10 µl enzim reaksiyon solüsyonu eklendi. Her bir örneğin absorbansı 530 nm dalga boyunda ölçüldü.

3.5.4. Amiloid beta peptidlerinin ölçümü

Aβ1-40 ve Aβ1-42 peptitleri, γ-sekretaz enziminin APP'yi farklı bölgelerden kesmesi sonucunda oluşmaktadır. Hem Aβ1-40 hem de Aβ1-42 AH beyin dokusunda bulunan hücre dışı plakların ana bileşenleridir (220). *In vivo* gruplardaki plazma Aβ1-40 ve Aβ1-42 peptit seviyeleri, üreticinin önerdiği protokole göre Aβ1-40 ve Aβ1-42 ELISA Kitleri (Bioassay Technology Laboratory®, Shanghai, China) kullanılarak ölçüldü.

3.5.5. Tau protein tespiti

Alzheimerin biyobelirteçlerinden biri olan Tau proteininin hiperfosforile olması durumunda AH beyinlerinde mikrotübüllerin stabilizasyonu bozulmakta ve Alzheimer'ın nöropatolojisinde gözlenen NFY'ların ana bileşenini oluşturmaktadır. (78). *In vitro* deneylerde nöronal süperfusatlarda *in vivo* deneylerde ise hipokampus ve plazmada Tau protein düzeyleri Tau ELISA Kiti (Bioassay Technology Laboratory®, Shanghai, China) kullanılarak ölçüldü.

Bioassay Technology Laboratory® ait ELISA protokolleri genel olarak aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

-96'lık platelerin her bir kuyucuğuna 40 µl konulan örneklerin üzerine herbir testin kendine ait olan Biotin solüsyonundan 10 µl (SOD, CAT, MDA, Tau, Aβ1-40 ve Aβ1-42) eklendi.

-Tüm kuyucuklara 50 µl Streptavidin-HRP solüsyonu eklenip plate üzeri foil ile kapatıldı. Plate 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi.

-İnkübasyon sonrasında ELISA plak yıkayıcısında 5×350 ml olacak şekilde yıkama işlemi gerçekleştirildi.

-Bu işlem sonrasında tüm kuyucuklara Substrat-A ve Substrat-B eklenip 37°C’de 10 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı.

-Süre bitiminde 50 µl Stop solüsyonu eklenerek her bir örneğin absorbansı 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda (Epoch BioTek Instruments, Inc. Highland Park, Winooski, VT, USA) ölçüldü.

3.6. İstatistiksel Analizler

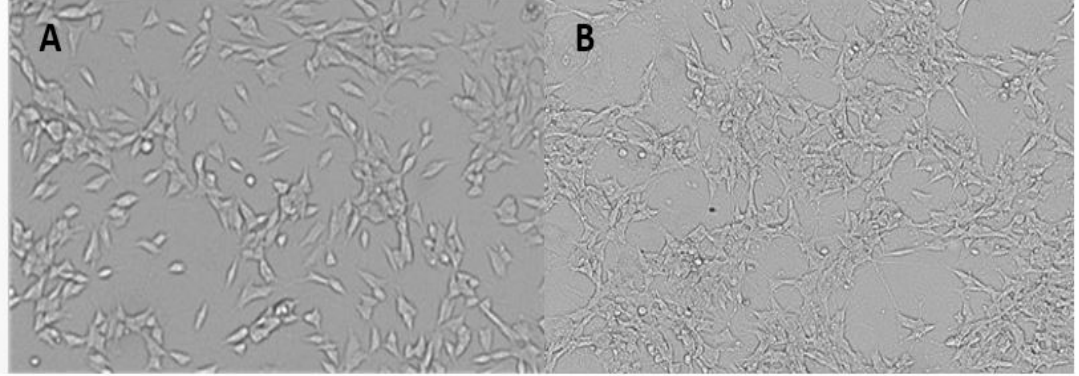
Çalışmalar sonucunda elde edilen veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak ifade edildi. Verilerin istatistiksel analizinde SPSS® 17.0 (Chicago, IL, USA) programı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile analiz edildi. Veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve devamında post-hoc LSD testi ile karşılaştırıldı. $p<0.05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. *İn Vitro* Nöronal AH Modelinde Karvakrol Maruziyeti Sonrasında Elde Edilen Bulgular

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

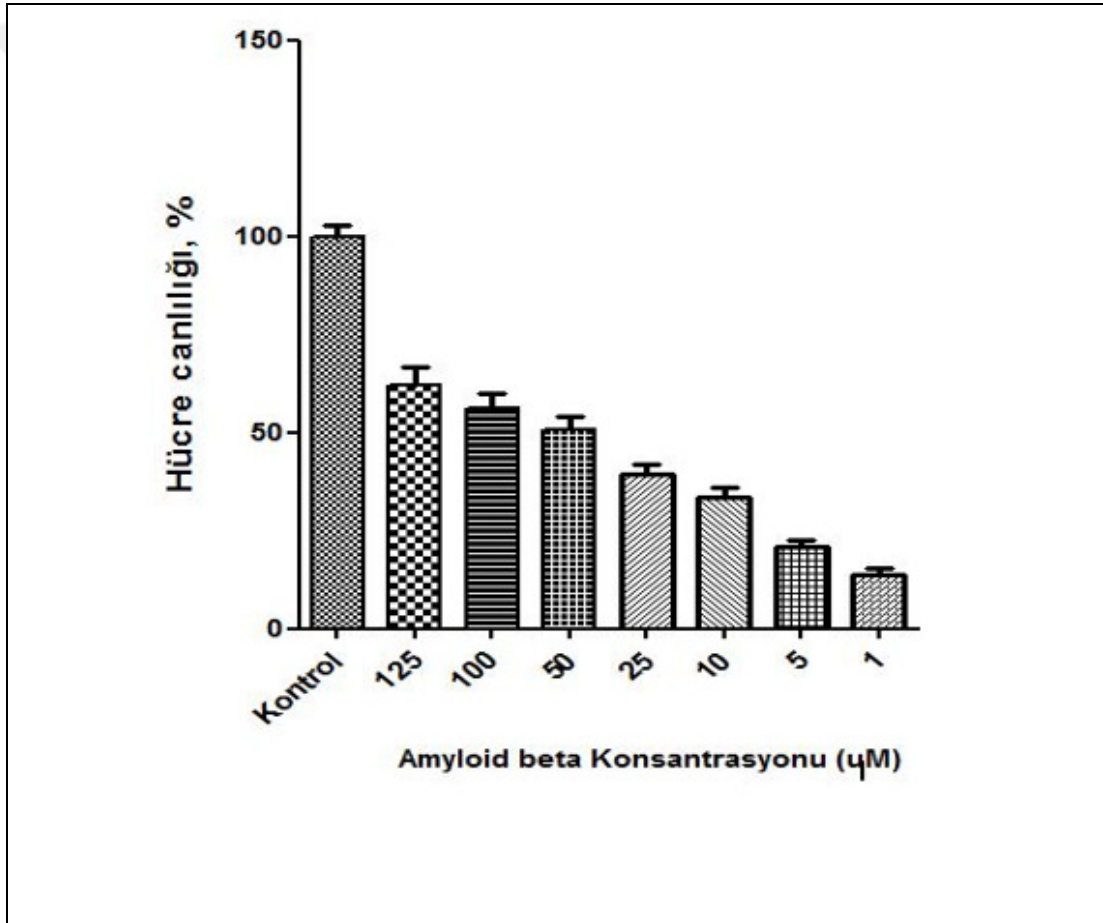
T75 flasklara ekilen SH-SY5Y hücrelerinin nöronal benzeri hücrelere farklılaşması amacıyla RA kullanılmıştır. Farklılaşma süresince hücrelerin morfolojik özellikleri inverted mikroskop altında incelenmiştir. Buna göre SH-SY5Y hücrelerinde belirgin morfolojik değişiklikler gözlemlenmiş olup dendrit ve aksonların uzadığı belirlenmiştir. Nöritler aracılığıyla hücreler arasında fiziksel iletişim ve temasın arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Farklılaşmamış (A) ve farklılaşmış (B) SH-SY5Y hücre kültürlerinin morfolojik görüntüleri

4.1.2. Farklı Konsantrasyonlardaki Amiloid Beta Uygulamasına Karşı MTT Analiz Sonuçları

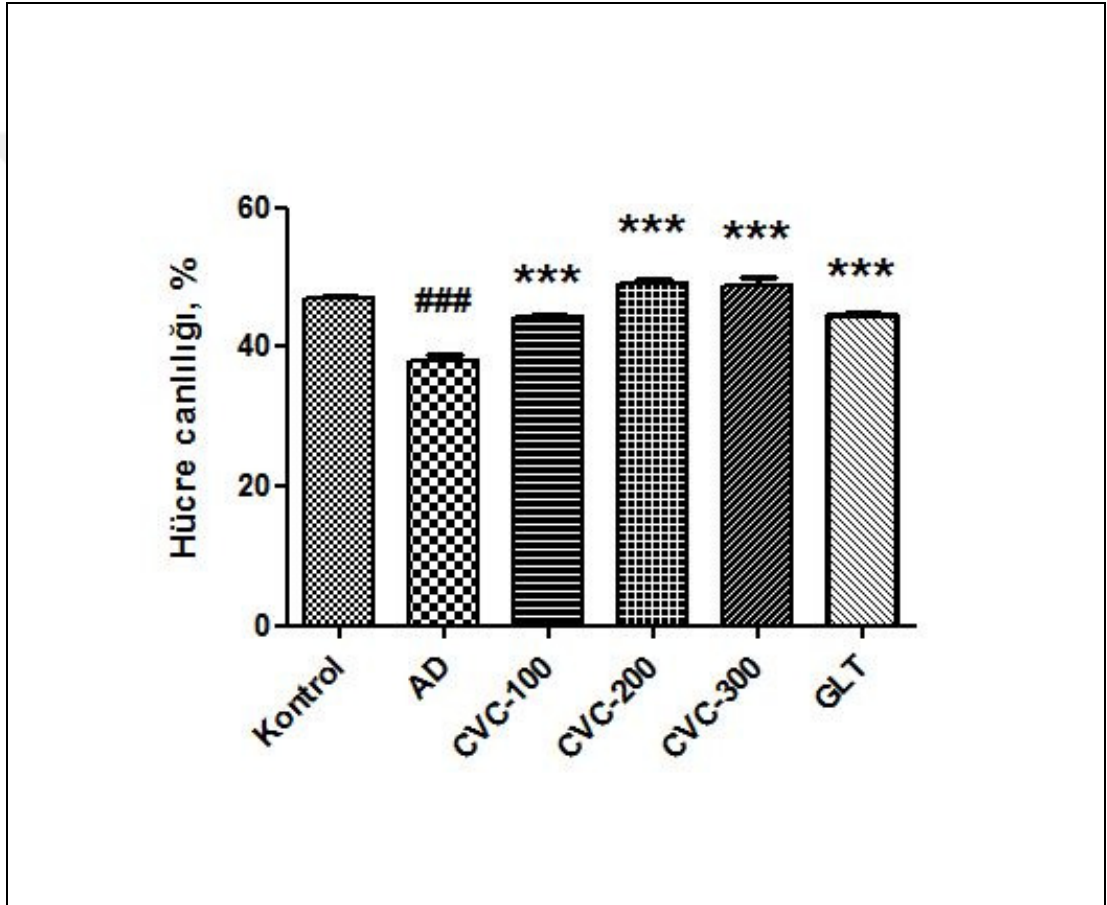
Farklılaşmış olan SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta peptidine karşı IC50 değerlerini belirleyebilmek amacıyla çeşitli konsantrasyonlarda A β 1-42 (1, 5, 10, 25, 50, 100 ve 125 μ M) ile 48 saat süresince inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda hücrelerin % canlılık oranları MTT analizi ile belirlendi. Sonuç olarak 48 saat süresince 50 μ M konsantrasyondaki amiloid beta'nın toplam hücre popülasyonlarının %50,9'ini öldürdüğü tespit edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. SH-SY5Y hücrelerinde 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanan Amiloid- β maruziyetinin hücre canlılığı üzerine etkisi.

4.1.3. Hücre Canlılığı Analiz Sonuçları

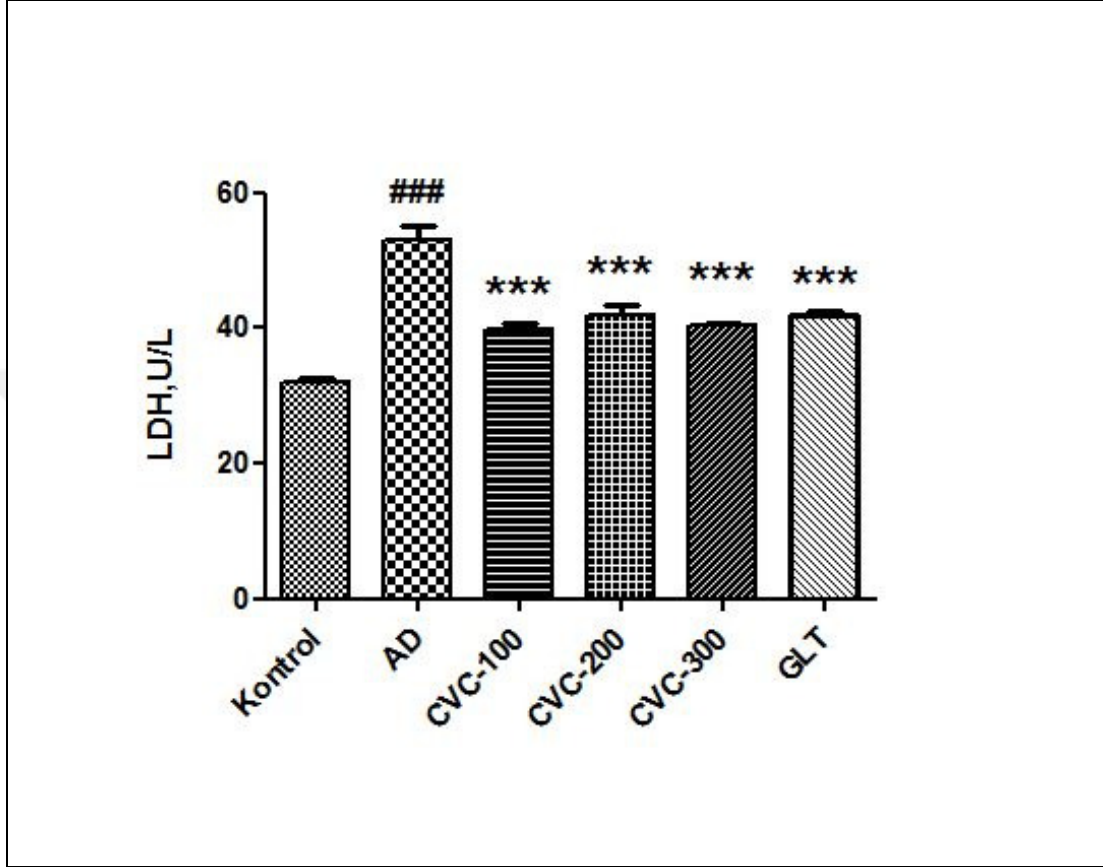
Hücre canlılığını test etmek için yapılan MTT testinin sonuçlarına göre AD oluşturulan hücre hattı grubunda hücre canlılığı kontrol grubuna göre azalmıştır ($p < 0.001$, Şekil 4.3). Hücre canlılığındaki bu azalma karvakrolün her üç dozu (100, 200, 300 μM) ve pozitif kontrol olarak galantamin tarafından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde önlenerek hücre canlılık oranı artmıştır ($p < 0.001$, Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *İn vitro* koşullarda oluşturulan AH modelinde SH-SY5Y hücrelerinde gözlenen hücre canlılığı. (### $p < 0.001$ kontrol grubuyla, *** $p < 0.001$ AD grubuyla karşılaştırıldığında)

Laktat dehidrogenaz enzim konsantrasyonunu test etmek için yapılan LDH testinin sonuçlarına göre AD oluşturulan hücre hattı grubunda hücre kültürü ortamına salınan LDH enzim konsantrasyonu kontrole göre anlamlı derecede artmış olup bunun anlamı AD grubundaki hücre canlılığının kontrole göre azalmasıdır. Çünkü hücre membran bütünlüğü bozulan hücrelerden sitoplazmik içerikteki LDH enzimi ekstrasellüler ortama salınır ($p < 0.001$, Şekil 4.4). Hücre canlılığındaki bu azalma

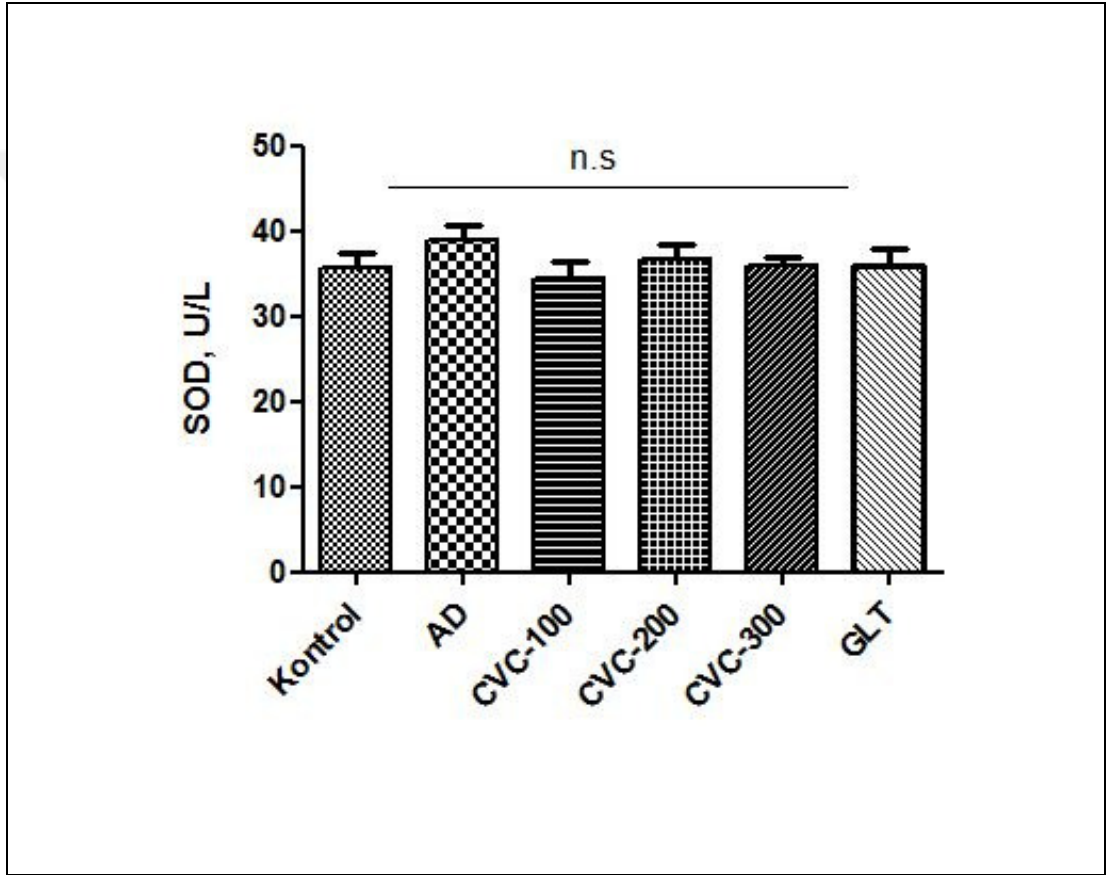
karvakrolün her üç dozu (100, 200, 300 μ M) ve pozitif kontrol olarak galantamin tarafından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde önlenerek hücre canlılık oranı artmıştır ($p < 0.001$, Şekil 4.4).



Şekil 4.4. *İn vitro* koşullarda oluşturulan AH modelinde SH-SY5Y hücrelerinde gözlenen LDH Aktivitesi (### $p < 0.001$ kontrol grubuyla, *** $p < 0.001$ AD grubuyla karşılaştırıldığında)

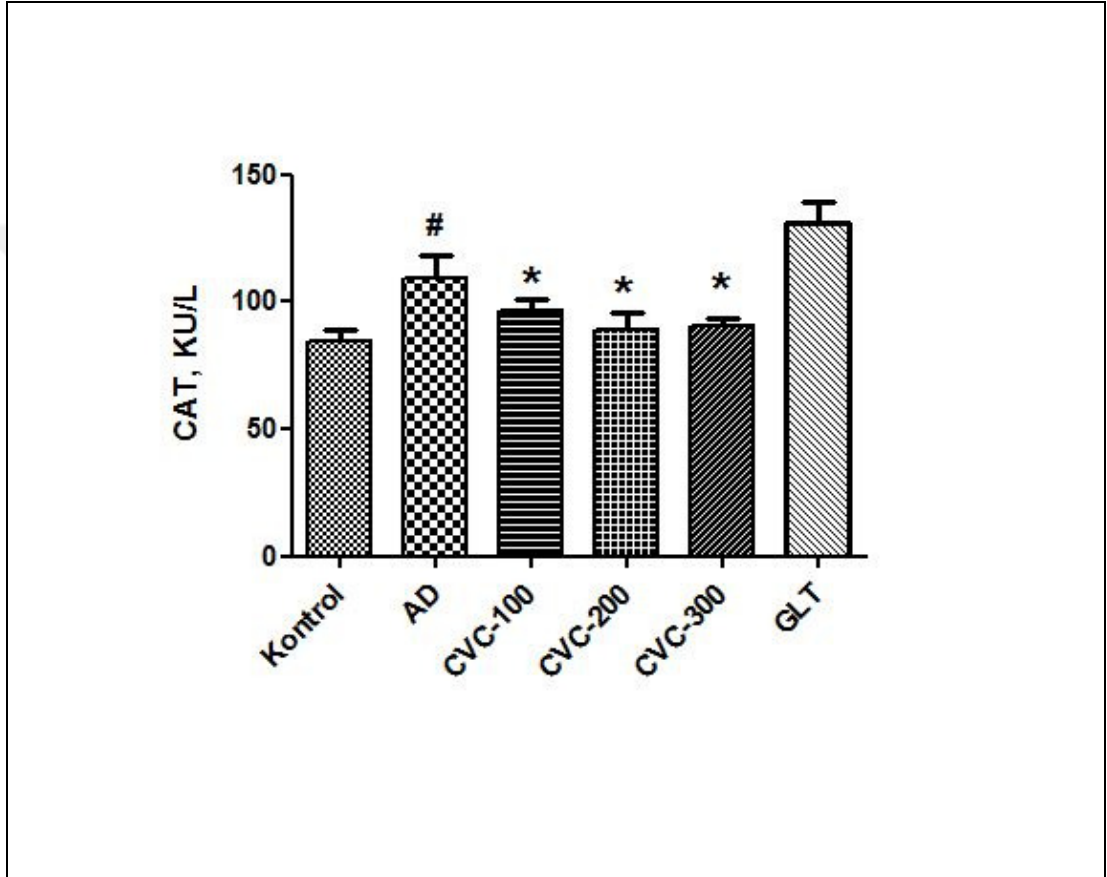
4.1.4. Antioksidan Analiz Sonuçları

SOD antioksidan enzim aktivitesini test etmek için gerçekleştirilen SOD testinin sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir. ($p > 0.05$, Şekil 4.5).



Şekil 4.5. *In vitro* koşullarda oluşturulan AH modelinde SH-SY5Y hücrelerinde süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi değerleri. n.s: $p > 0.05$

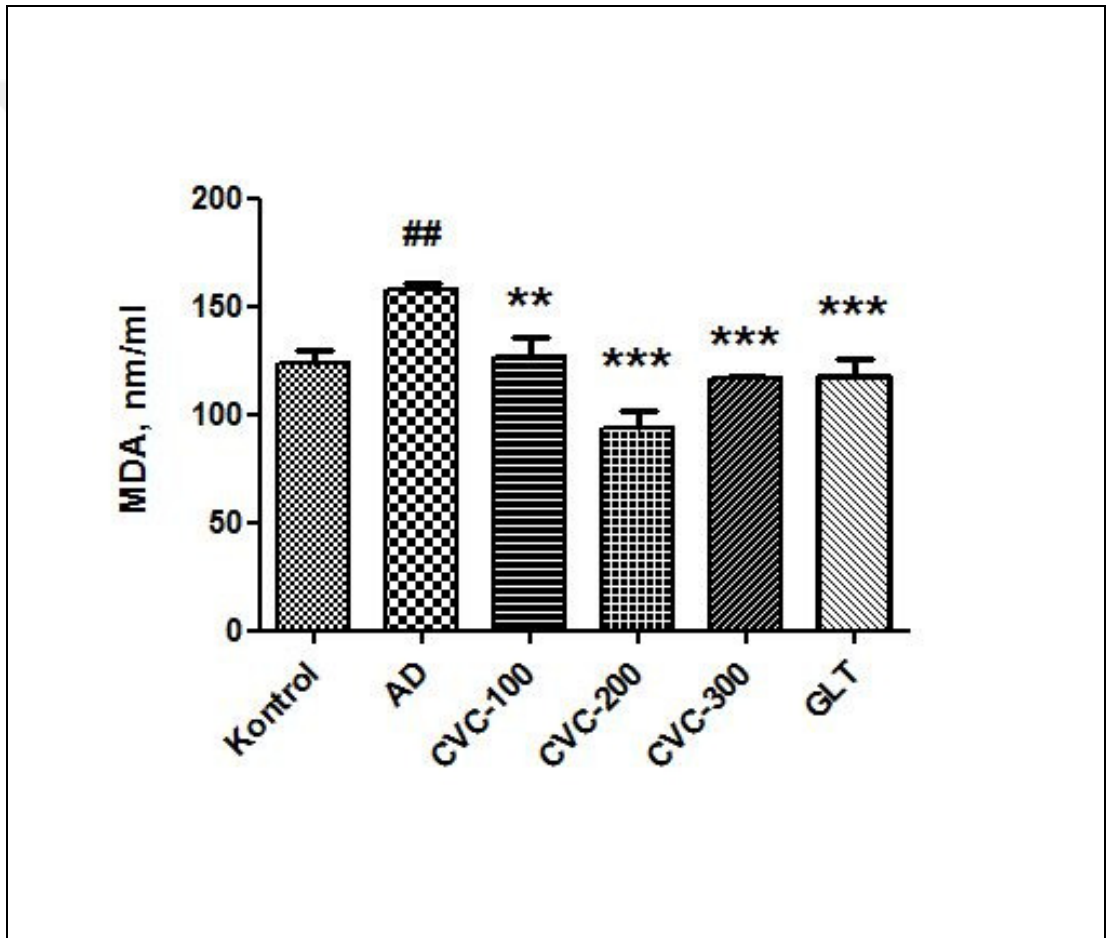
CAT antioksidan ezim aktivitesini test etmek için gerçekleştirilen CAT testinin sonuçlarına göre AD oluşturulan hücre hattı grubunda CAT aktivitesi kontrol grubuna göre artmıştır($p < 0.05$, şekil 4.6). CAT aktivitesindeki bu artma karvakrolün her üç dozu (100, 200, 300 μM) tarafından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltılmıştır ($p < 0.05$, şekil 4.6).



şekil 4.6. *In vitro* koşullarda oluşturulan AH modelinde SH-SY5Y hücrelerinde katalaz (CAT) aktiviteleri (# $p < 0.05$ kontrol grubuyla, * $p < 0.05$ AD grubuyla karşılaştırıldığında)

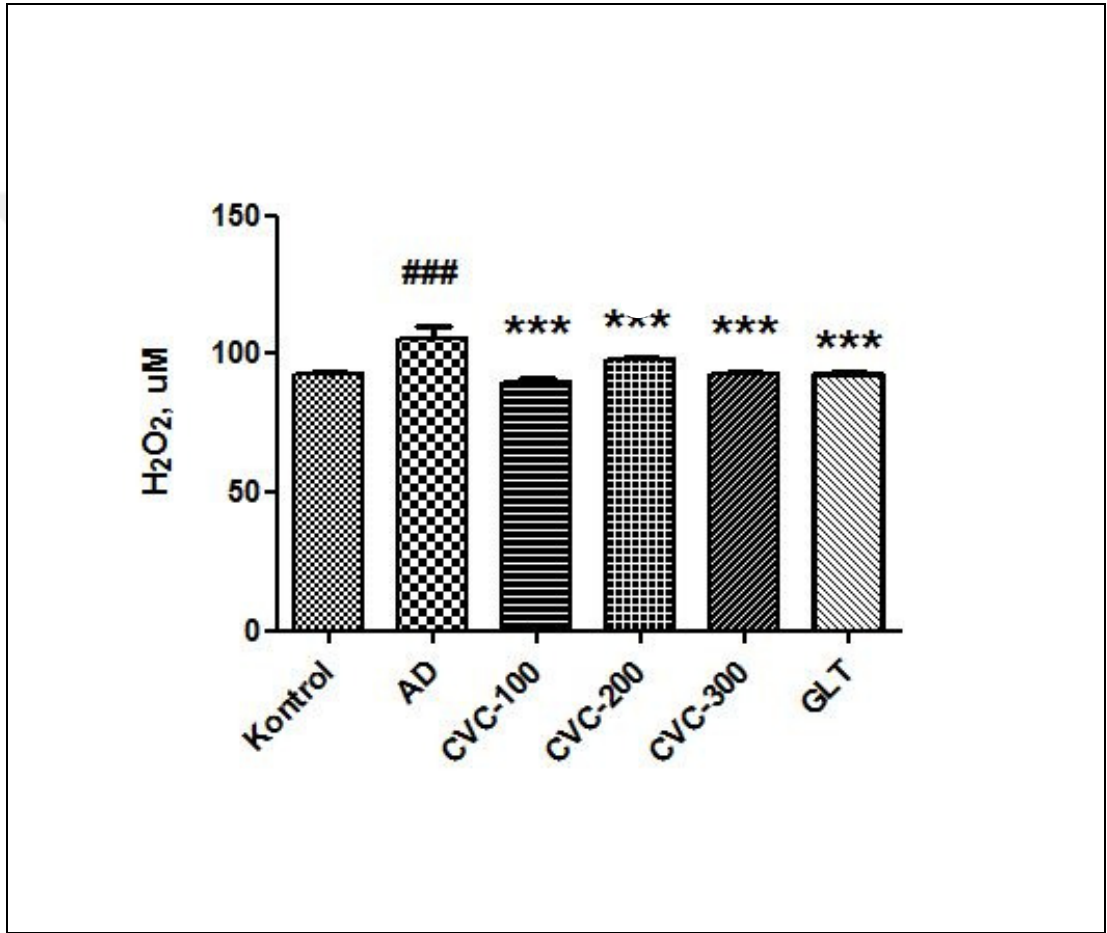
4.1.5. Oksidan Parametre Sonuçları

MDA oksidatif marker konsantrasyonunu test etmek için yapılan MDA testinin sonuçlarına göre AD oluşturulan hücre hattı grubunda MDA aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı artmıştır ($p<0.01$, Şekil 4.7), MDA aktivitesindeki bu artma karvakrolün her üç dozu tarafından ($100, 200$ ve $300 \mu\text{M}$ $p<0.001$, Grafik 4.7) ve pozitif kontrol grubundaki galantamin tarafından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde önlenerek oksidatif stres belirteci azaltılmıştır ($p<0.001$, Şekil 4.7).



Şekil 4.7. *In vitro* koşullarda oluşturulan AH modelinde SH-SY5Y hücrelerinde malondialdehid (MDA) aktivitesi değerleri (## $p<0.01$ kontrol grubuyla, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ AD grubuyla karşılaştırıldığında)

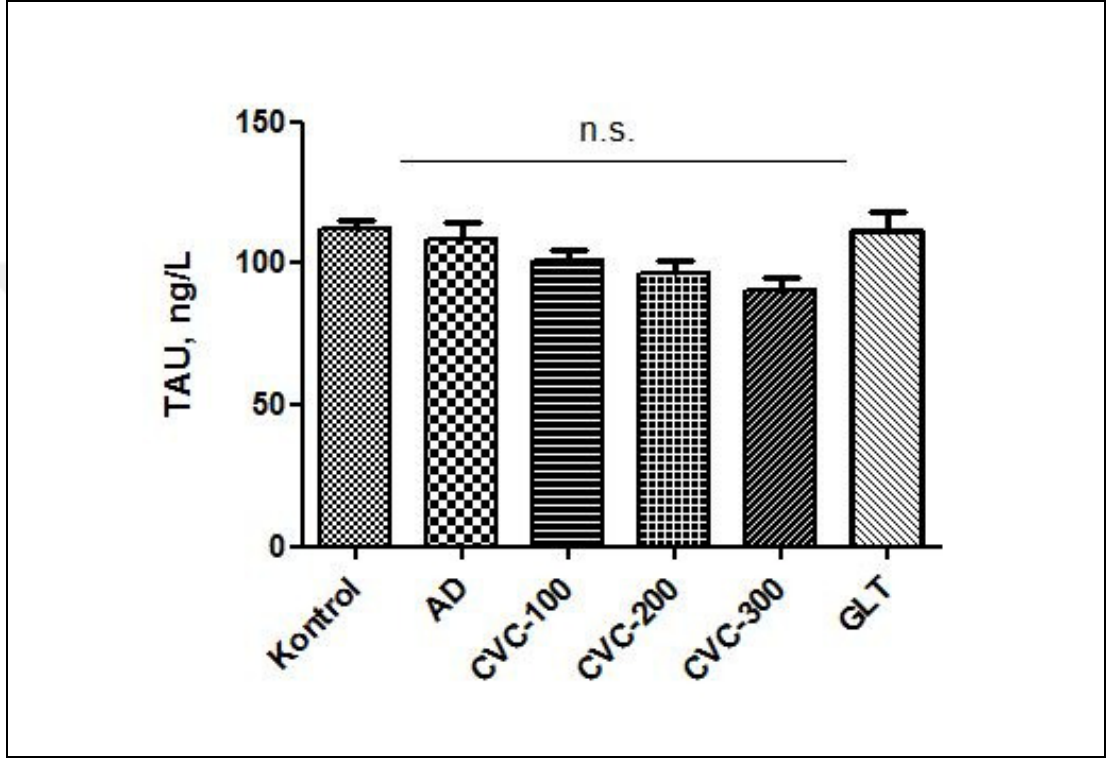
H₂O₂ oksidatif belirteç konsantrasyonunu test etmek için gerçekleştirilen H₂O₂ testinin sonuçlarına göre AD oluşturulan hücre hattı grubunda H₂O₂ düzeyi kontrol grubuna göre artmıştır (p<0.001, Şekil 4.8). H₂O₂ düzeyindeki bu artma karvakrolün her üç dozunda (100, 200, 300 µM) ve pozitif kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde önlenerek oksidatif stres markerı olan H₂O₂ azaltılmıştır (p< 0.001, Şekil 4.8).



Şekil 4.8. *In vitro* koşullarda oluşturulan AH modelinde SH-SY5Y hücrelerinde hidrojen peroksit (H₂O₂) değerleri. (###p<0.001 kontrol grubuyla, **p<0.01 ve ***p<0.001 AD grubuyla karşılaştırıldığında)

4.1.6. Tau Proteini Bulguları

İn vitro deneylerde Tau miktarını test etmek için gerçekleştirilen Tau testinin sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$, Şekil 4.9).



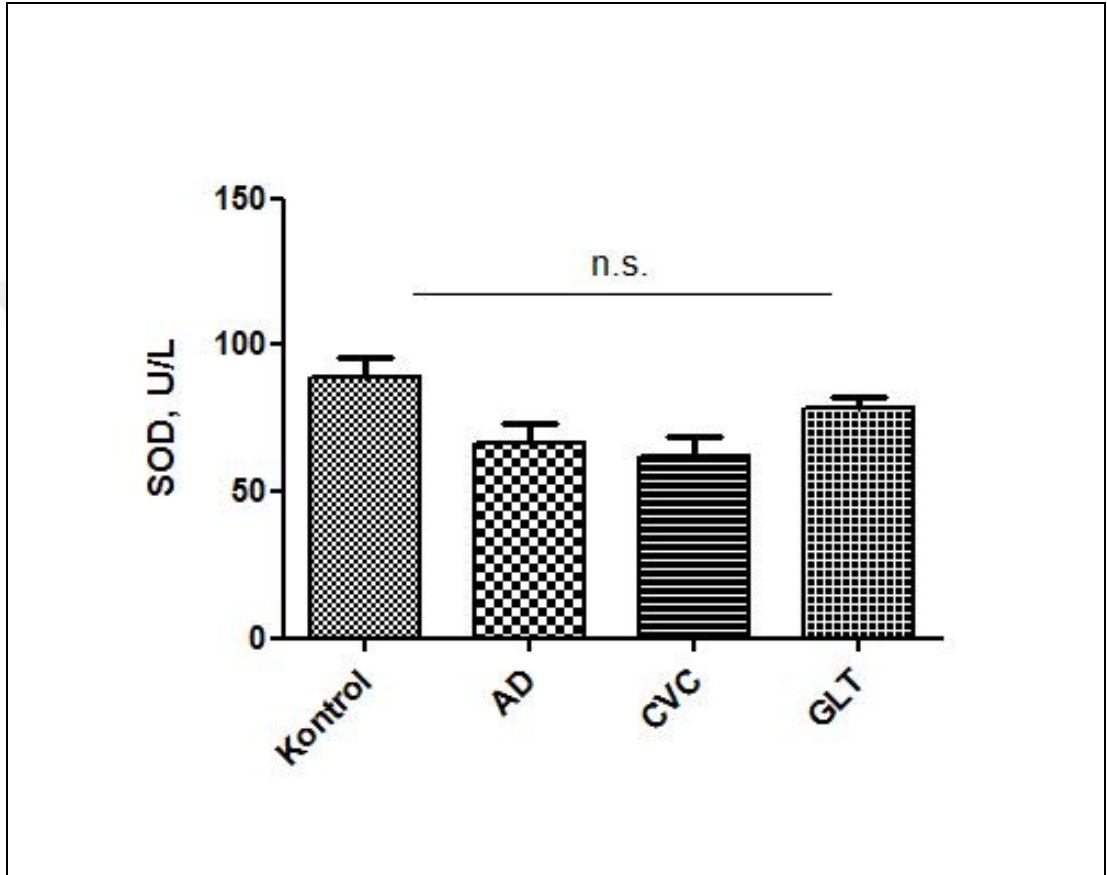
Şekil 4.9. *İn vitro* koşullarda oluşturulan AH modelinde SH-SY5Y hücrelerinde gözlenen Tau proteini seviyesi. n.s: $p > 0.05$.

4.2. *İn Vivo* Koşullarda Oluşturulan AH Modelinde Karvakrolün Etkinliği

İn vivo çalışmalardan elde edilen serum ve hipokampus dokuları homojenatında SOD, CAT, MDA, H_2O_2 ve Tau protein seviyesinin ölçümü yapılmıştır. Bununla birlikte serum örneklerinde $A\beta 1-40$ ve $A\beta 1-42$ peptid seviyelerinin ölçümü de gerçekleştirildi. Ayrıca, hayvanların bilişsel durumlarını değerlendirmek için pasif sakınma testi yapıldı. Histolojik boyama ve değerlendirme amacıyla *in vivo* gruplardan elde edilen hipokampus dokularına Hematoksilen-eozin boyaması gerçekleştirildi.

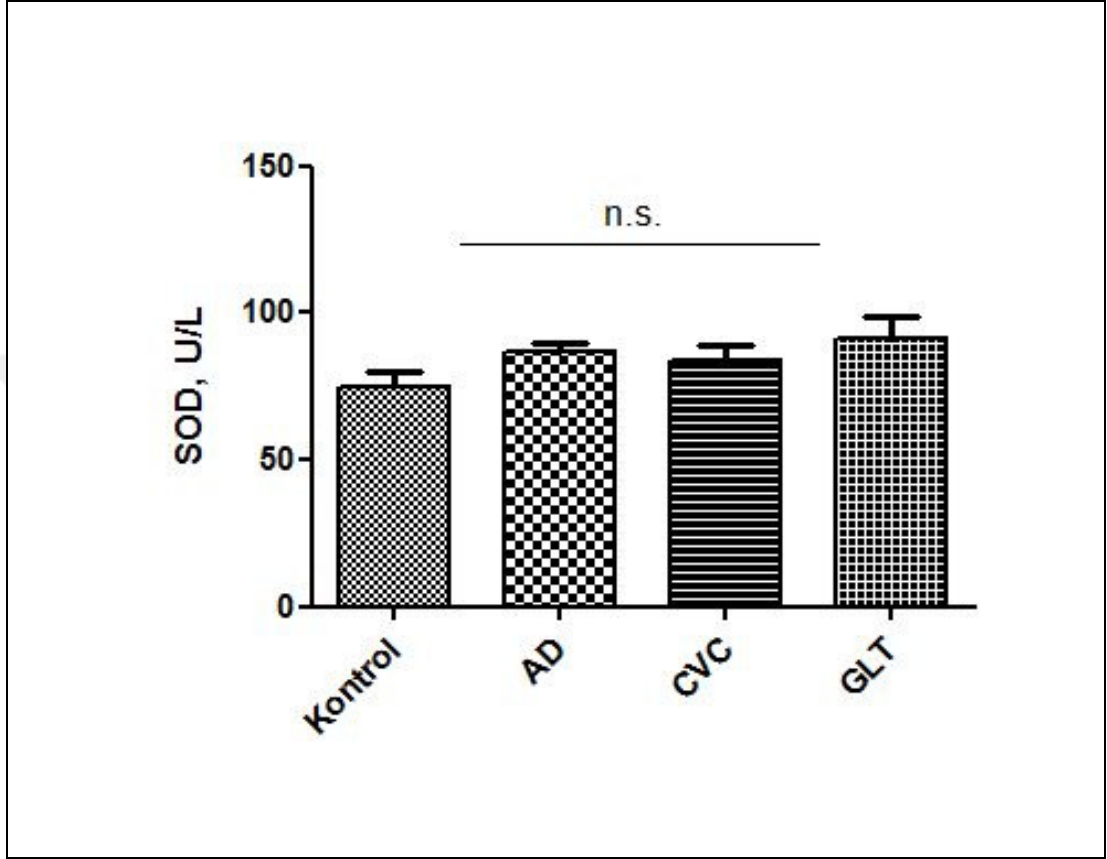
4.2.1. Antioksidan Analiz Sonuçları

Ratların serumlarında SOD antioksidan enzim aktivitesini test etmek için gerçekleştirilen SOD testinin sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$, Şekil 4.10).



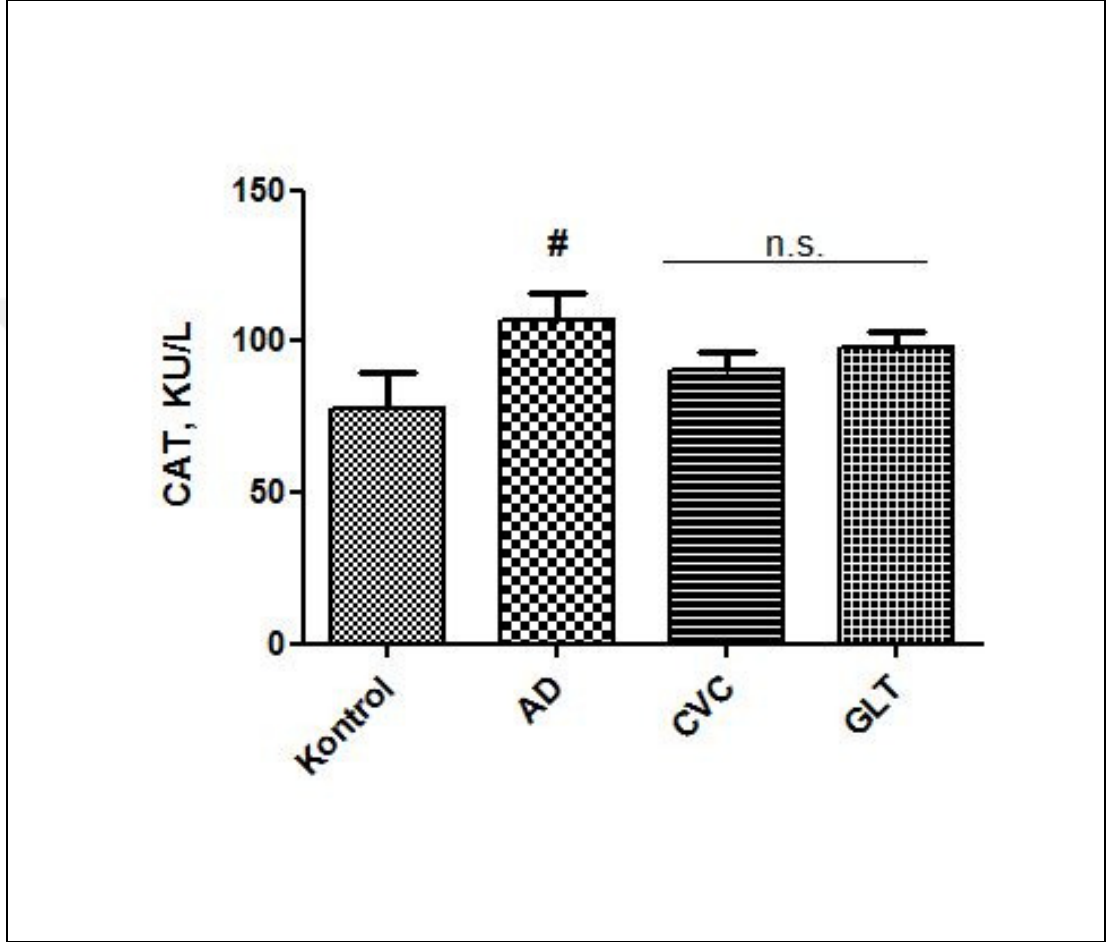
Şekil 4.10. *In vivo* deney grubu hayvanlarının serum Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesi değerleri. n.s: $p > 0.05$.

Ayrıca ratların hipokampuslerinde de SOD antioksidan enzim aktivitesini test etmek için gerçekleştirilen SOD testinin sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$, Şekil 4.11).



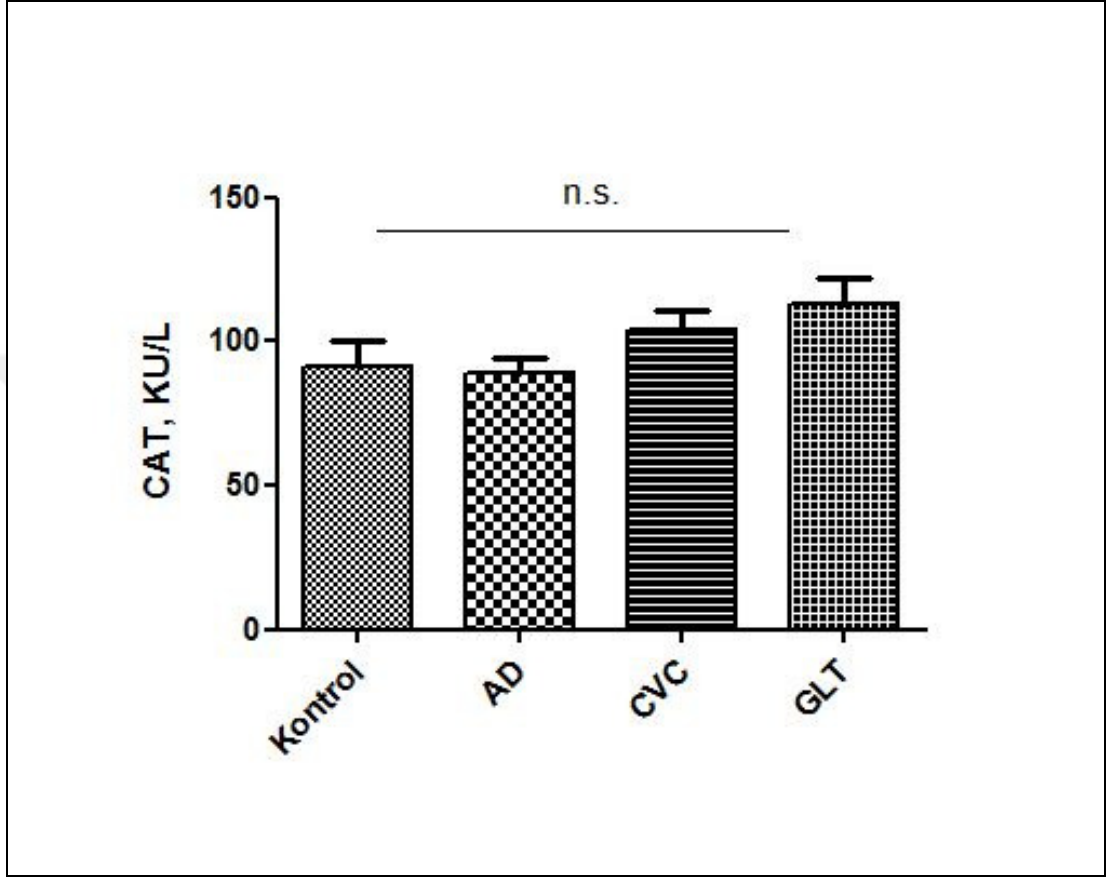
Şekil 4.11. *In vivo* deney grubu hayvanlarının hipokampus dokusu Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesi değerleri. n.s: $p > 0.05$.

Ratların serumlarında CAT antioksidan enzim aktivitesini test etmek için gerçekleştirilen CAT testinin sonuçlarına göre AD oluşturulan grupta CAT aktivitesi kontrol grubuna göre artmıştır ($p<0.05$, Şekil 2.12.) ve diğer gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p<0.05$, Şekil 4.12).



Şekil 4.12. *In vivo* deney grubu hayvanlarının serum Katalaz (CAT) aktiviteleri (# $p<0.05$ kontrol grubuyla karşılaştırıldığında)

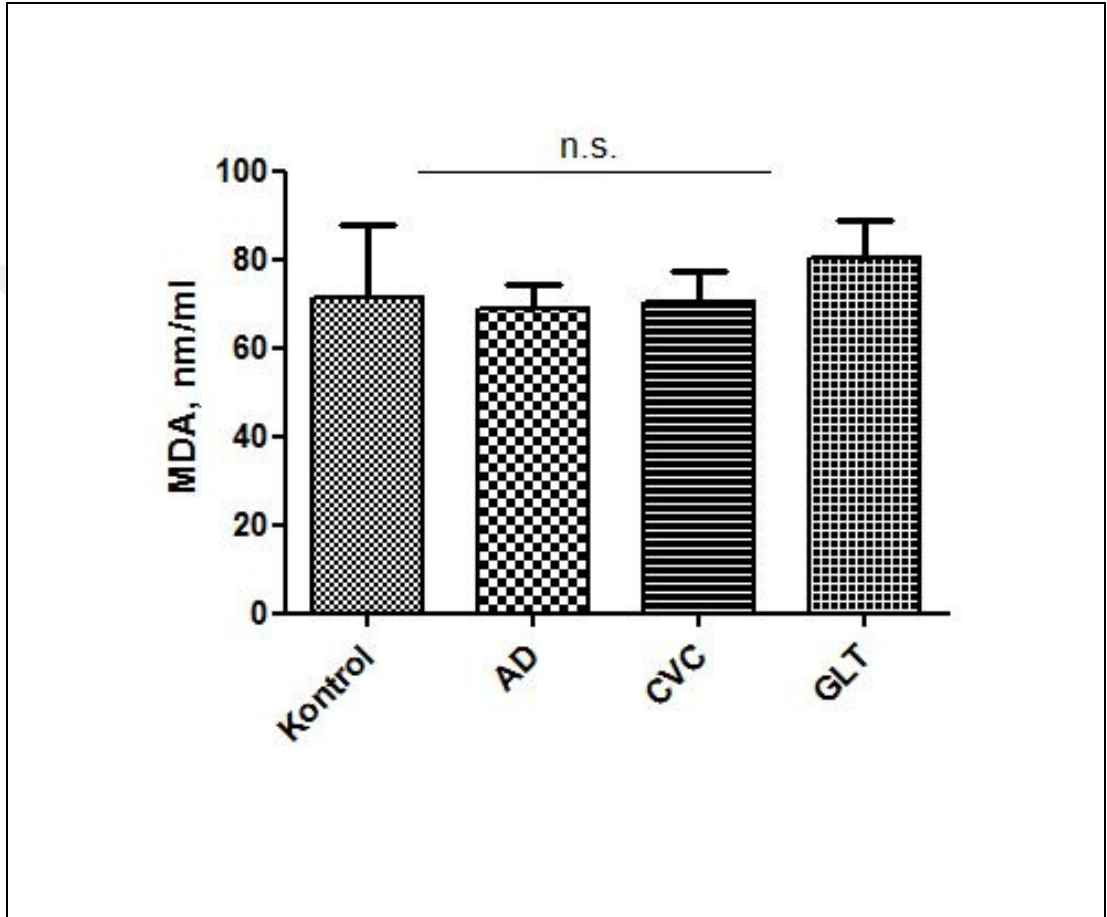
Ratların hipokampus dokularında CAT antioksidan enzim aktivitesini test etmek için gerçekleştirilen CAT testinin sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$, Şekil 4.13).



Şekil 4.13. *In vivo* deney grubu hayvanlarının hipokampus dokusu Katalaz (CAT) düzeyleri. n.s: $p > 0.05$.

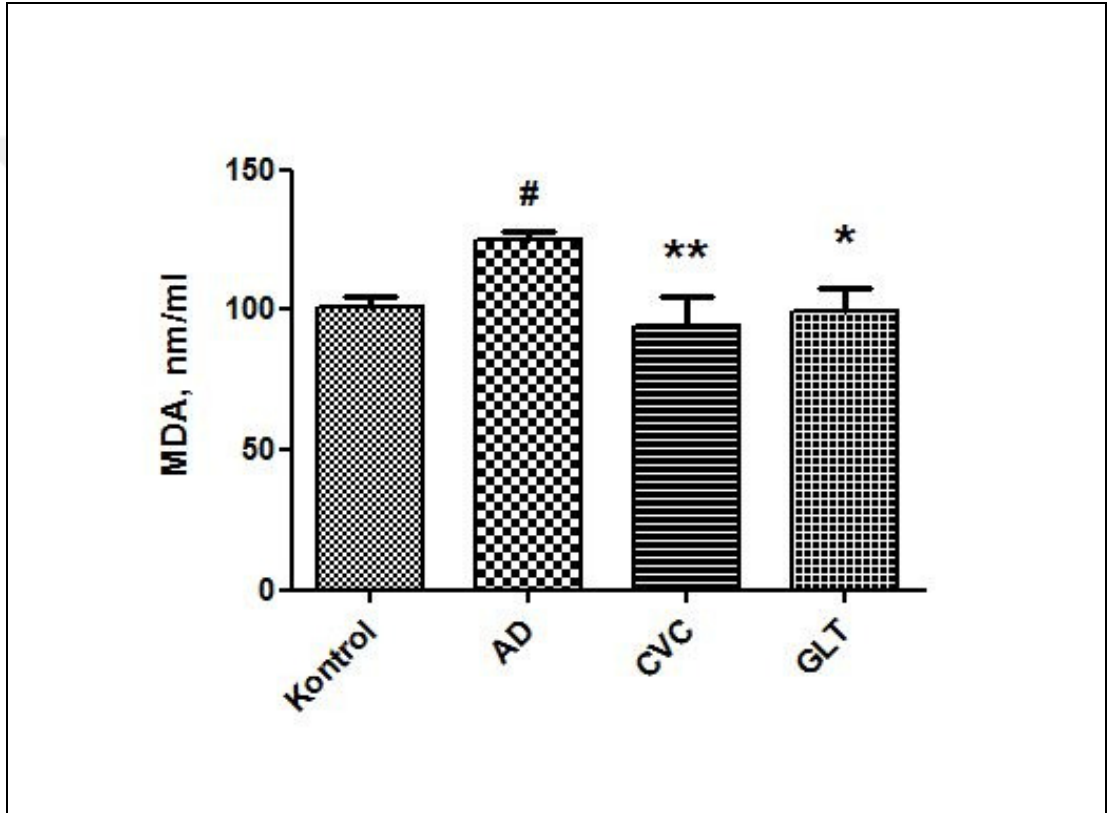
4.2.2. Oksidan Parametre Sonuçları

Ratların serumlarında MDA oksidatif marker konsantrasyonunu test etmek için gerçekleştirilen MDA testinin sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$, Şekil 4.14).



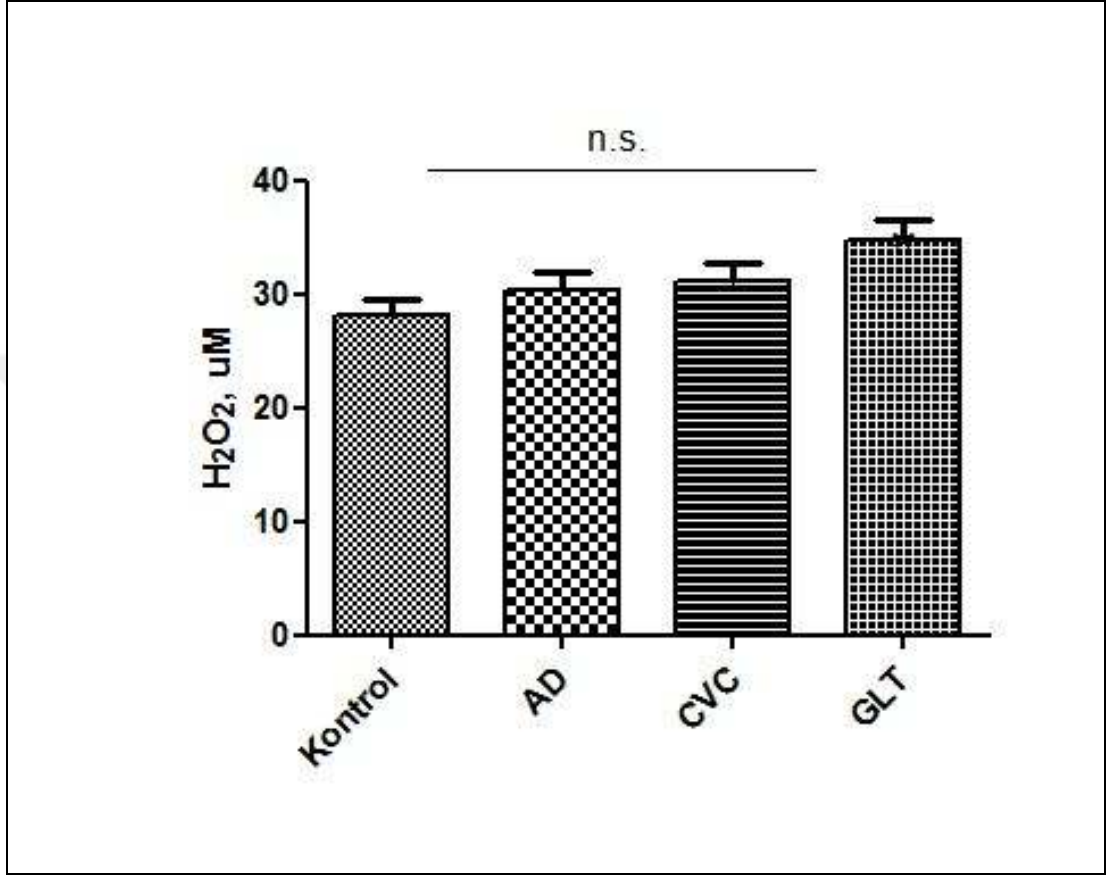
Şekil 4.14. *In vivo* deney grubu hayvanlarının serum Malondialdehid (MDA) düzeyleri. n.s: $p > 0.05$.

Diğer taraftan ratların hipokampus dokularında ise serumun aksine MDA oksidatif marker konsantrasyonunu test etmek için gerçekleştirilen MDA testinin sonuçlarına göre AD oluşturulan grupta MDA düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı artmıştır ($p<0.01$, Şekil 4.15), MDA aktivitesindeki bu artma karvakrol tarafından ($p<0.05$, Şekil 4.15) ve pozitif kontrol olarak galantamin tarafından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde önlenerek oksidatif stres belirteci azaltılmıştır ($p<0.05$, Şekil 4.15).



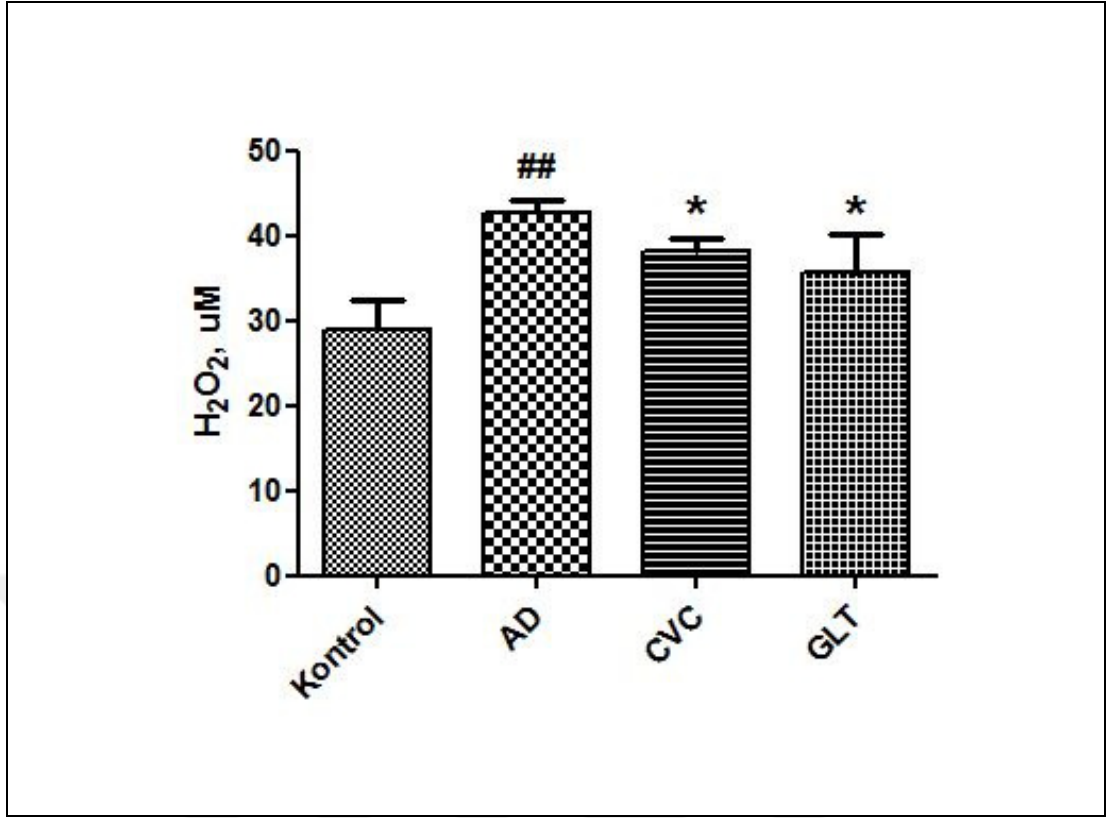
Şekil 4.15. *In vivo* deney grubu hayvanlarının hipokampus dokusu malondialdehid (MDA) düzeyleri (# $p<0.05$ kontrol grubuyla, * $p<0.05$ ve ** $p<0.01$ AD grubuyla karşılaştırıldığında)

Ratların serumlarında H_2O_2 oksidatif belirteç konsantrasyonunu test etmek için gerçekleştirilen H_2O_2 testinin sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir. ($p>0.05$, Şekil 4.16).



Şekil 4.16. *In vivo* deney grubu hayvanlarının serum hidrojen peroksit (H_2O_2) düzeyleri. n.s: $p>0.05$.

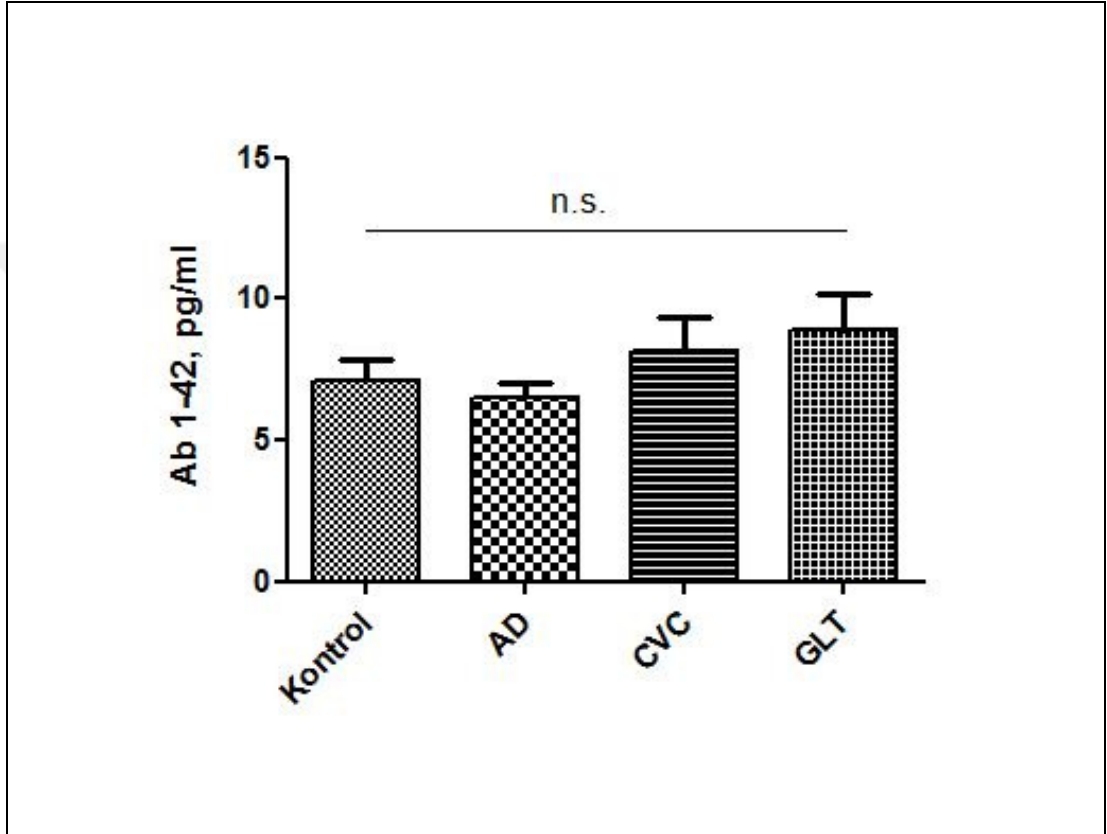
Ratların hipokampus dokularında H_2O_2 oksidatif belirteç konsantrasyonunu test etmek için gerçekleştirilen H_2O_2 testinin sonuçlarına göre AD oluşturulan grupta H_2O_2 düzeyi kontrol grubuna göre artmıştır ($p<0.01$, Şekil 4.17), H_2O_2 düzeyindeki bu artış karvakrol tarafından ($p<0.05$, Şekil 4.17) ve pozitif kontrol olarak galantamin tarafından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde önlenecek oksidatif stres belirteci azaltılmıştır ($p<0.05$, Şekil 4.17).



Şekil 4.17. *In vivo* deney grubu hayvanlarının hipokampus dokusu hidrojen peroksit (H₂O₂) düzeyleri (##p<0.01 kontrol grubuyla, *p<0.05 AD grubuyla karşılaştırıldığında)

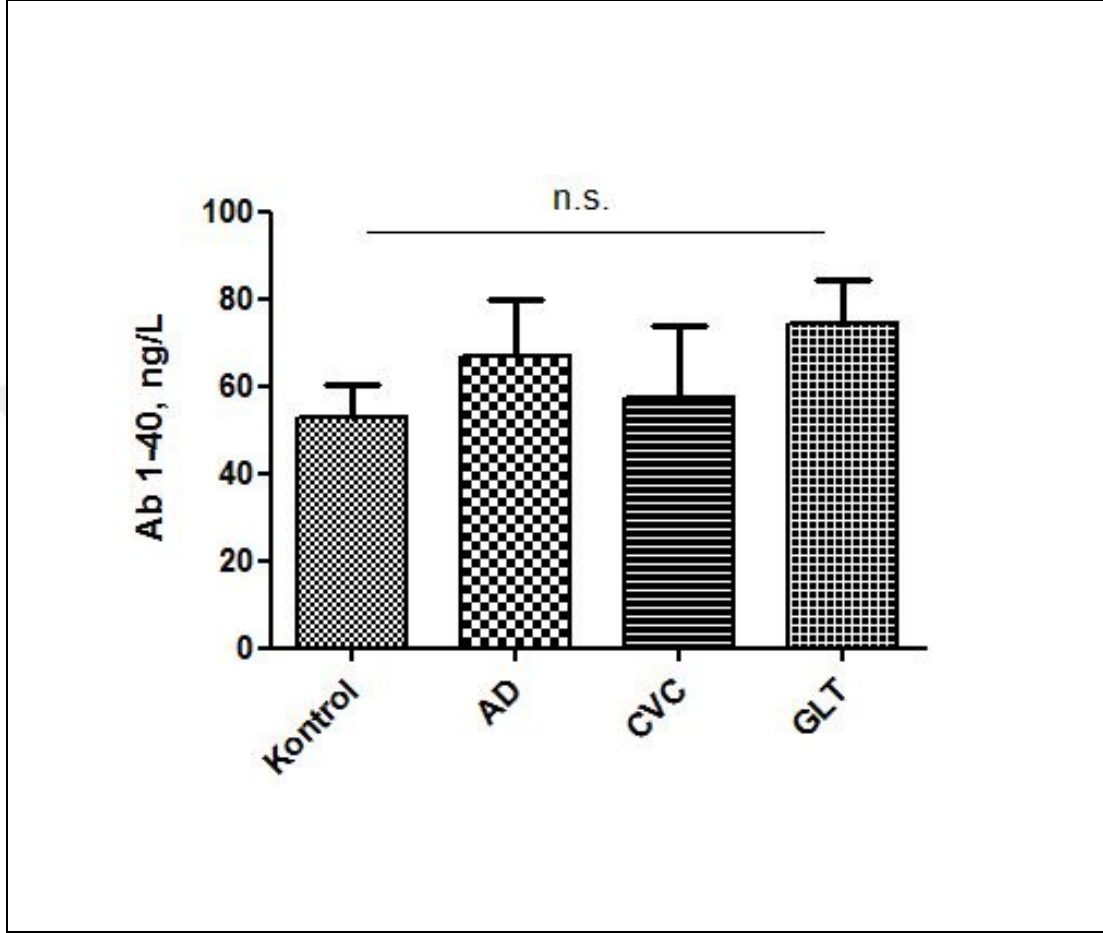
4.2.3. Amiloid Beta Bulguları

Ratların serum A β 1-42 peptid seviyelerini test etmek için gerçekleştirilen A β 1-42 testinin sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$, Şekil 4.18).



Şekil 4.18. *In vivo* deney grubu hayvanlarının serum A β 1-42 peptid seviyeleri. n.s.: $p > 0.05$.

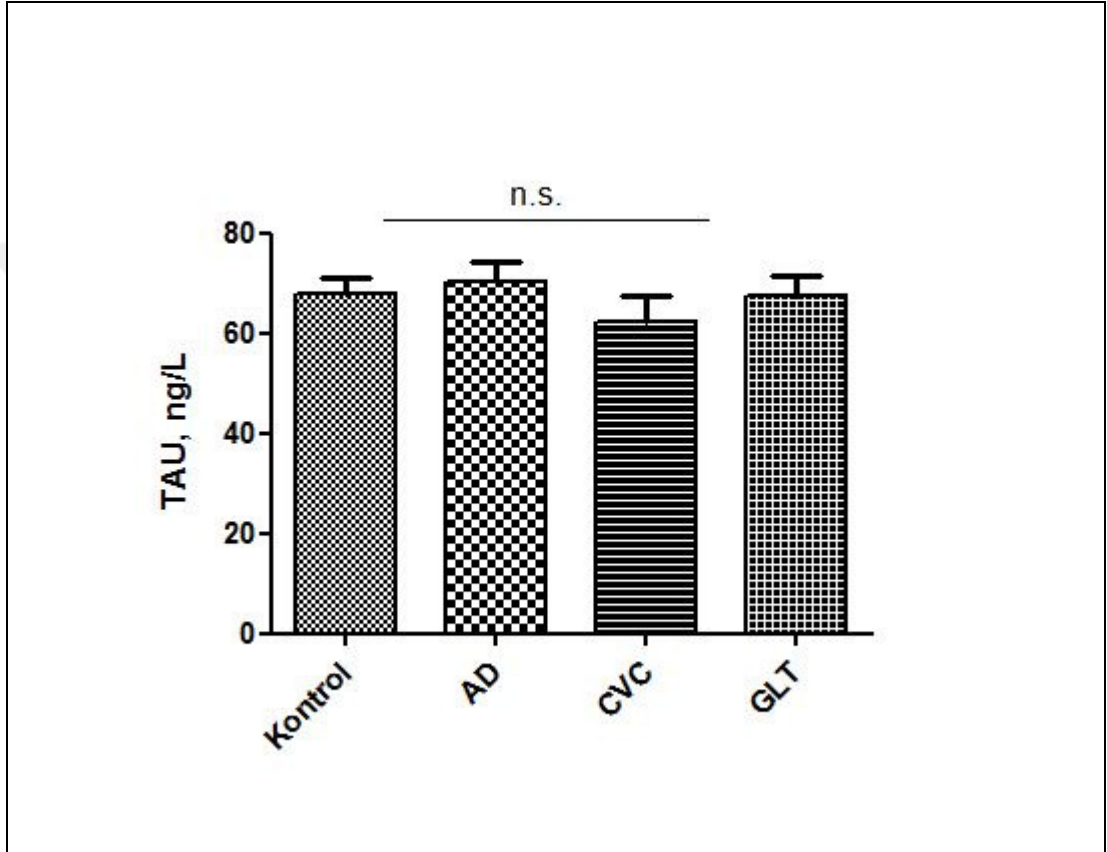
Benzer şekilde ratların serum A β 1-40 peptid seviyelerini test etmek için gerçekleştirilen A β 1-40 testinin sonuçlarına göre de gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p>0.05$, şekil 4.19).



şekil 4.19. *In vivo* deney grubu hayvanlarının serum A β 1-40 peptid seviyeleri. n.s.: $p>0.05$.

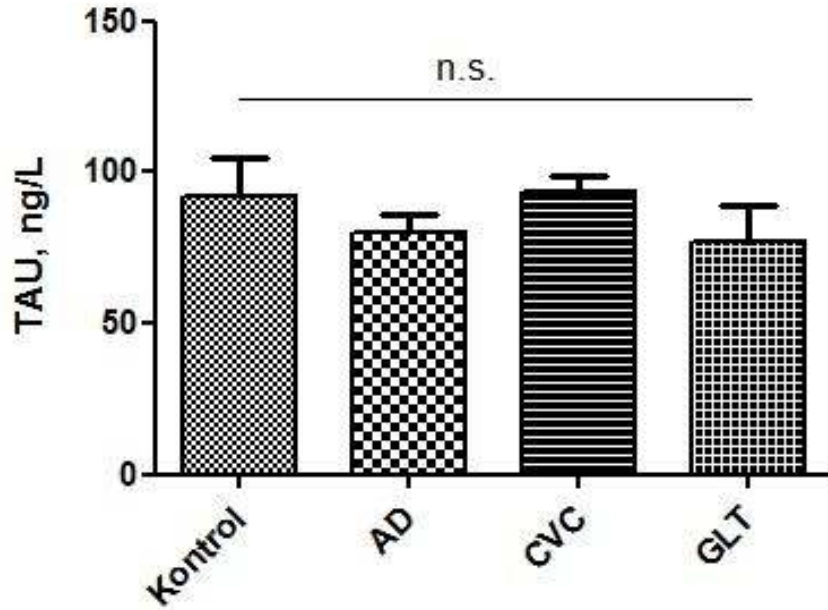
4.2.4. Tau Proteini Bulguları

Ratların serumlarında Tau protein seviyelerini test etmek için gerçekleştirilen Tau testinin sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p>0.05$, Şekil 4.20).



Şekil 4.20. *In vivo* deney grubu hayvanlarının serum Tau protein seviyeleri. n.s.: $p>0.05$.

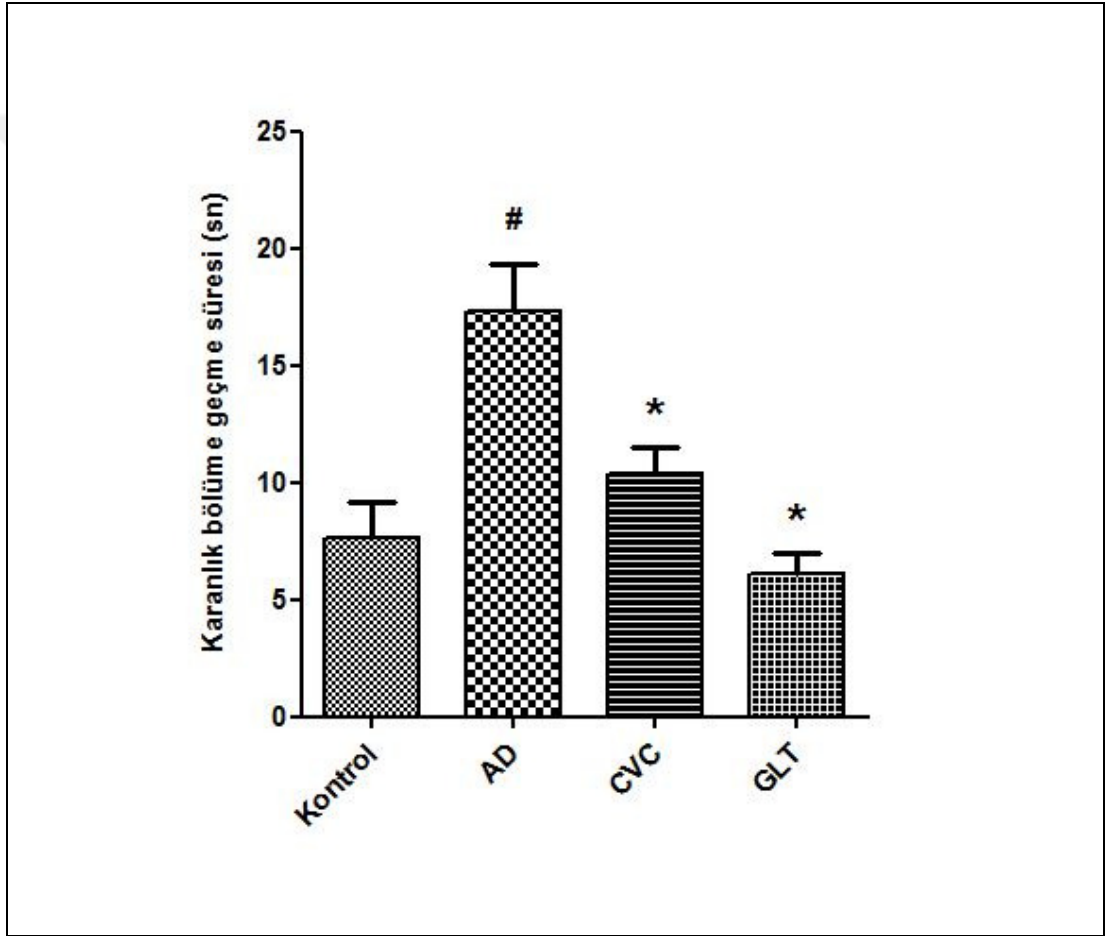
Benzer şekilde ratların hipokampus dokularında Tau protein seviyelerini test etmek için gerçekleştirilen Tau testinin sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$, Şekil 4.21).



Şekil 4.21. *In vivo* deney grubu hayvanlarının hipokampus dokusu Tau protein düzeyleri. n.s.: $p > 0.05$.

4.2.5. Pasif Sakınma Testi Bulguları

İn vivo AH modelinin başarı ile oluşturulduğu öğrenme testi (Pasif sakınma) ile doğrulanmıştır. Kısa süreli belleğin değerlendirilmesi amacıyla yapılan pasif sakınma testine göre AD grubundaki hayvanların karanlık bölüme geçme süresi kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($p < 0.05$, Şekil 4.22), diğer taraftan bu artışlar karvakrol ve galantamin tarafından ayrı ayrı azaltılmıştır ($p < 0.05$, Şekil 4.22).



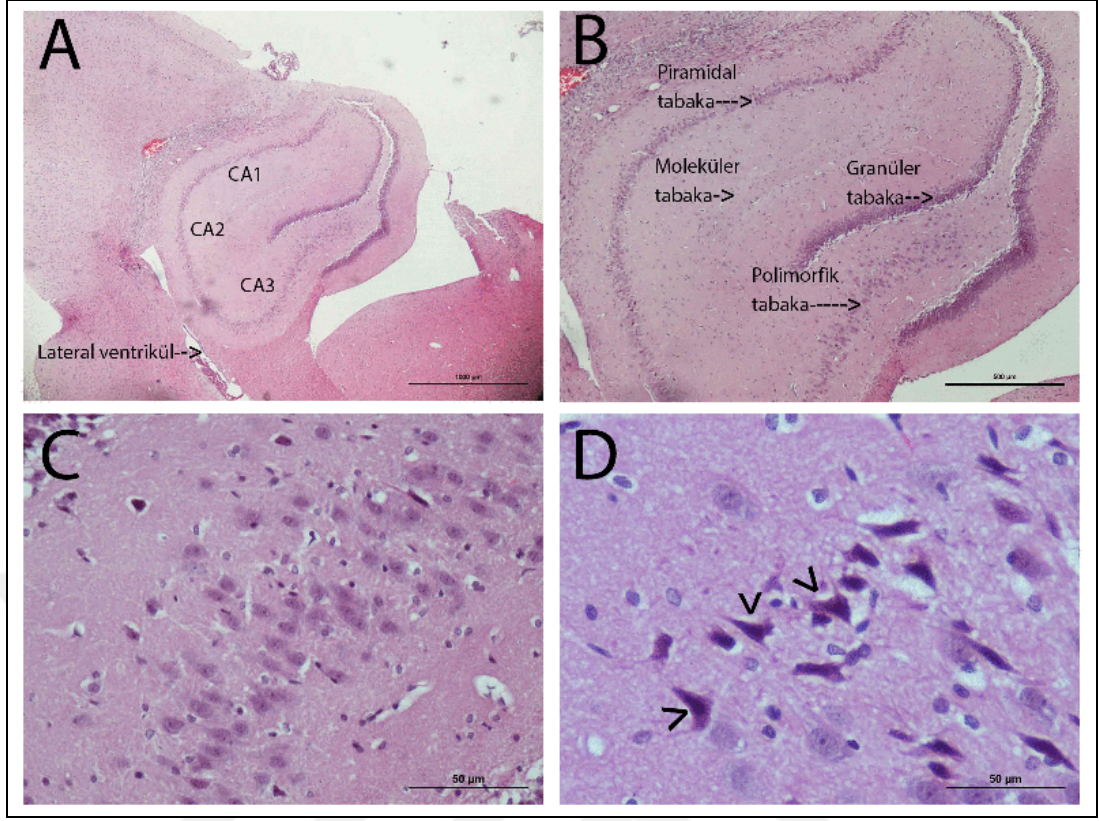
Şekil 4.22. Pasif Sakınma testi sonuçları (# $p < 0.05$ kontrol grubuyla, * $p < 0.05$ AD grubuyla karşılaştırıldığında)

4.2.6. Histopatolojik Bulgular

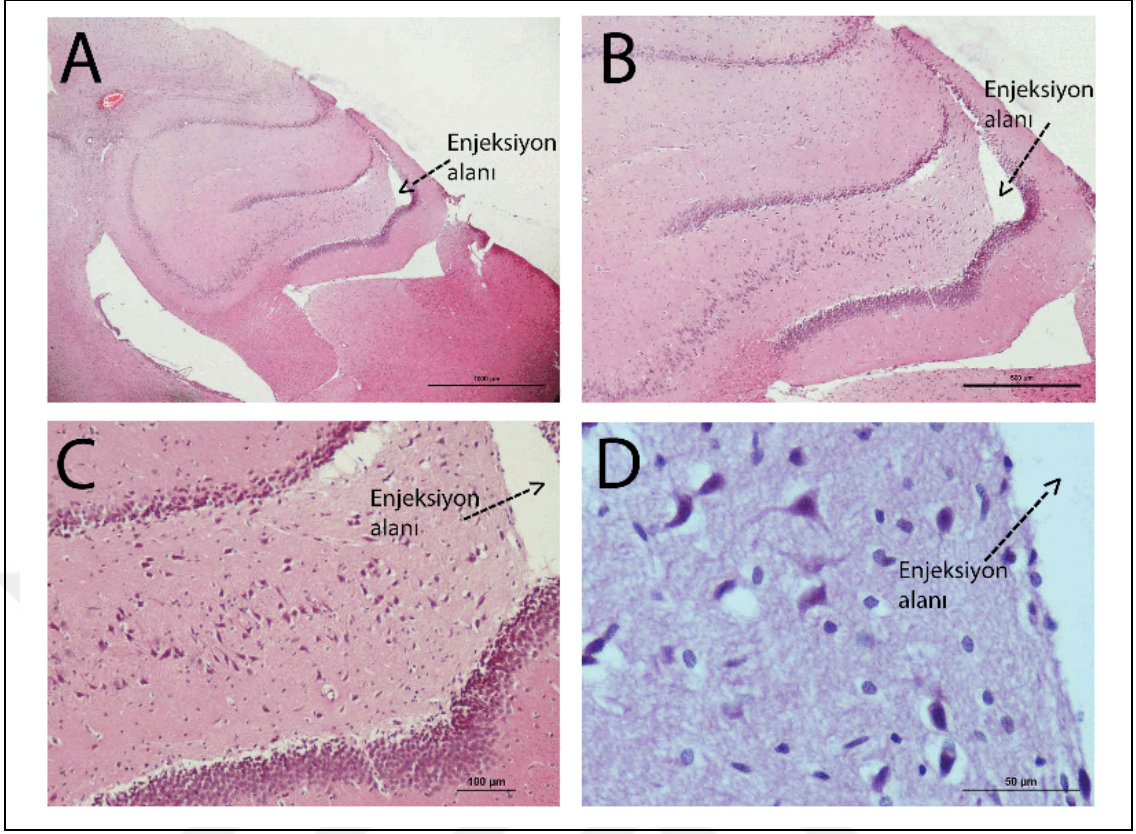
İn vivo gruplardan elde edilen hipokampal kesitler hematoksilen-eozin ile boyanarak histopatolojik değerlendirilmesi yapıldı. Kontrol grubu ratlardan elde edilen hipokampuslerin boyama sonrasında farklı büyütmelemlerle elde edilen görüntülerinde piramidal, moleküler, granüler ve polimorfik tabakalarının normal görünümünde olduğu gözlemlendi. Moleküler tabakada bulunan nöronal hücrelerin sınırları belirgin ve zar bütünlüğü düzgün ve normal görünümde olduğu görüldü (Şekil 4.23 A-D).

Alzheimer sıçan modeli oluşturmak için amiloid beta peptidin hipokampus içine enjekte edildiğini gösteren enjeksiyon alanı Şekil 4.24’de verilmiştir. Enjeksiyon sırasında iğne ucunun hipokampus içine kadar ilerlediğini ve amiloid beta peptidin hipokampal alana enjekte edildiği bu şekilde farklı büyütmelemlerle verilmiştir.

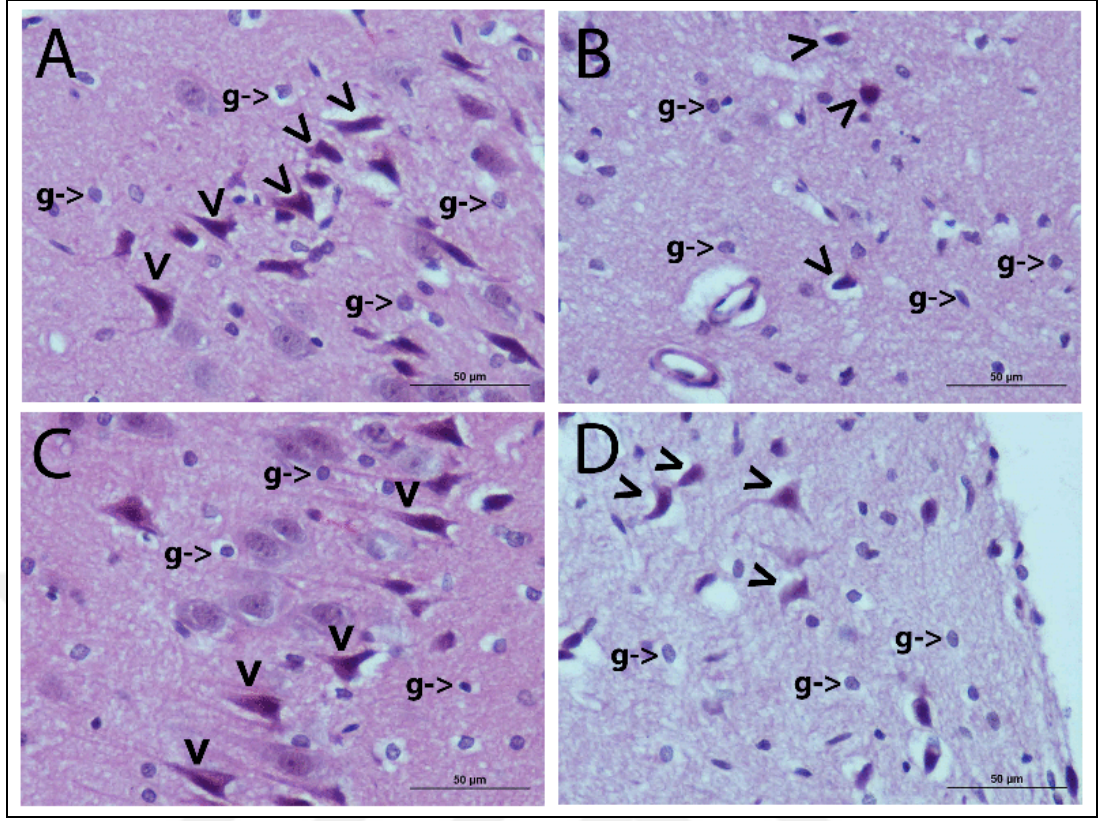
Deney gruplarında hipokampal moleküler tabakada nöronal hücrelerin histopatolojik bulguları Şekil 4.25’te verilmiştir. Buna göre kontrol grubunda sınırları belirgin ve zar bütünlüğü düzgün normal nöronal hücre şekli görülmektedir (Şekil 4.25-A). Alzheimer grubunda nöronal hücrelerde şiddetli büzülme, hücre sınırları bozulmuş, zar bütünlüğü kaybolmuş ve nöron sayısında azalma gözlenmektedir (Şekil 4.25-B). Galantamin grubunda kontrol grubundakine benzer şekilde, sınırları belirgin ve zar bütünlüğü düzgün normal nöronal hücre görünümü saptanmıştır (Şekil 4.25-C). Karvakrol grubunda ise Alzheimer grubuna göre nöronal hücrelerdeki büzülmenin büyük oranda azaldığı, hücre sınırlarının daha belirgin olduğu, zar bütünlüğünün korunduğu görülmüş ve nöron sayısında önemli ölçüde azalmaya rastlanmamıştır (Şekil 4.25-D).



Şekil 4.23. Kontrol grubu hematoksilen-eozin boyaması ile rat hipokampusü. (A) normal görünümde hipokampus ve CA1, CA2 ve CA3 alanları (X20 büyütme), (B) normal görünümde hipokampusün piramidal, moleküler, granüler ve polimorfik tabakaları (X20 büyütme), (C) normal moleküler tabaka görünümü (X200 büyütme), (D) moleküler tabakada normal nöronal hücre görünümü, (X400 büyütme). CA : cornu ammonis, DG: Dentat gyrus. Scale bar: 1000 µm.



Şekil 4.24. Karvakrol grubunda intrahipokampal enjeksiyon alanı (A) X20 büyütme, (B) X40 büyütme, (C) X100 büyütme, (D) X400 büyütme ile gösterilmiştir. Her panelde ok ucu enjeksiyon sırasında hipokampus içinde iğne ucunun hasarladığı alanı göstermektedir. Hematoksilen-eozin boyaması yapılmıştır.



Şekil 4.25. Deney gruplarında hipokampal moleküler tabakada nöronal hücre görüntüleri. (A) kontrol grubu; (B) Alzheimer grubu; (C) galantamin grubu; (D) Karvakrol grubu (X400). Kalın açık ok uçları nöronları, g->gliyal hücreleri göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Alzheimer hastalığı (AH), gittikçe artan hafıza kaybı ve bilişsel işlevlerde azalma ile karakterize ilerleyici ve kronik nörodejeneratif bir hastalıktır (85, 221). Dünya çapında, 46 milyon insanın AH'den muzdarip olduğu tahmin edilmektedir (35). AH'nin etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, hücre dışında amiloid β birikmesi, hücre içinde artmış Tau protein fosforilasyonu ve oksidatif stresin Alzheimer patofizyolojisinde önemli rol oynadığı kabul edilmektedir (86).

Nöron ve mitokondri membranında bulunan amiloid prekürsör proteinin (APP) β -sekretaz ve γ -sekretaz proteolitik enzimleri tarafından parçalanmasıyla amiloid β ($A\beta$) peptitleri oluşmaktadır. Amiloid plaklar ise bu peptitlerin hücre dışı alanda bir araya gelmesiyle oluşmuş yapılardır (9, 10). Sekretaz enzimlerinin APP'yi farklı bölgelerden kesmesiyle farklı sayılarda aminoasit içeren $A\beta$ türlerinin meydana gelmesine neden olmaktadır. Farklı uzunluklarda meydana gelen bu $A\beta$ türlerinden en toksik olanı 42 aminoasit uzunluğunda oluşan $A\beta$ ($A\beta_{42}$)'dir (12). Tübüline bağlı şekilde bulunan ve mikrotübüllerin stabilizasyonunda rol oynayan Tau proteinlerinin kinaz enzimleri tarafından fosforile edilmesiyle hiperfosforile Tau proteinleri oluşmaktadır. Toksik karakterdeki çözünemeyen bu yapılar hücre içinde birikerek Alzheimer'ın ikinci nöropatolojik bulgusu olan nörofibriler yumakların oluşumuna yol açmaktadır (79, 80, 82). Hem $A\beta$ peptidinin aşırı üretimi ve birikimi sonucunda meydana gelen amiloid plaklar hem de hiperfosforile Tau agregatlarının oluşturduğu nörofibriler yumaklar bilişsel fonksiyonlarda işlev bozukluğuna, nöronal toksisiteye ve nörodejenerasyona yol açmaktadırlar (11, 222, 223).

Reaktif oksijen türlerin (ROS) / reaktif nitrojen türlerinin (RNS) üretimi ve antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanan oksidatif stres, Alzheimerin patogenevizinden sorumlu tutulan bir diğer ana faktördür (224). Alzheimer'lı hastaların beyinlerinde meydana gelen redoks durumundaki değişikliklerden dolayı serbest radikallerin aşırı birikmesi, protein oksidasyon ve lipit

peroksidasyon seviyesinin artması AH'nın yaygın patolojik bir özelliği olarak ortaya çıkmaktadır. (7, 85, 107). Bununla birlikte, oksidatif stresin nöronal hücre disfonksiyonuna, A β birikimine, hücre ölümüne ve bilişsel işlev bozukluğuna yol açtığı yapılan çalışmalar sonucu tespit edilmiştir. Bu durum oksidatif stresin AH'nın erken dönemlerinde ortaya çıktığını göstermektedir. Ayrıca A β 'nın beyindeki ROS üretimini artırarak mitokondriyal hasara neden olduğu da bilinmektedir (57, 224, 225). Bu nedenle antioksidan tedavi, AD'nin önlenmesi ve septomatik tedavisinde yeni terapötik bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir (223).

Günümüzde AH tedavisinde geliştirilen terapötik stratejilerden biri, asetilkolinin (ACh) hidrolizinde rol oynayan temel enzim olan asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörlerinin kullanılmasıdır (30). ACh, merkezi sinir sistemindeki sinyal iletiminde önemli rol oynayan bir nörotransmitterdir. Alzheimer'li hastaların beyinlerinde ACh seviyesi büyük ölçüde azalmaktadır. AChE'nin inhibisyonu sonucunda bilişsel fonksiyonlarda gelişme gözlemlendiğinden dolayı hastalığın septomatik tedavisinde FDA onaylı asetilkolin esteraz inhibitör özelliğine sahip olan Galantamin ilaç olarak kullanılmaktadır.

Galantamin gibi bir fitokimyasal bileşik olan karvakrol, *Origanum* ve *Thymus* (kekik) gibi Lamiaceae familyasına ait bitkilerin uçucu yağlarında bulunan fenolik bir monoterpen olup daha önce yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda antioksidan ve asetilkolin esteraz inhibitör aktivitelerine sahip olduğu bildirilmiştir. (25, 26, 226).

Henüz etkin bir tedavisi bulunmayan AH'nın ilerlemesinin durdurulması ve semptomatik tedavisinde, hastalığın patofizyolojisinden sorumlu olan oksidatif stresi, amiloid beta birikimini, kolinerjik kaybı ve Tau fosforilasyonunu azaltabilecek özellikteki yeni terapötik ajanlara gereksinim vardır. Bu gereksinim doğrultusunda, sunulan tez çalışmasında antioksidan ve antikolinesteraz etkinliği bilinen karvakrolün *in vitro* ve *in vivo* deneysel AH modellerinde anti-Alzheimer etkisi araştırılmıştır.

İnsan nöroblastoma (SH-SY5Y) hücreleri, nöronların birçok biyokimyasal ve fonksiyonel özelliklerine sahip olmalarından dolayı A β nörotoksisite

değerlendirmeleri için yapılan *in vitro* çalışmalarda nöronal/hücrese Alzheimer modeli oluşturmak amacıyla kullanılan en genel hücre hattıdır (227).

Sunulan çalışmada *in vitro* bulgularımıza göre AD oluşturulan grupta azalan hücre canlılığının karvakrol tarafından önlenerek canlılık oranının arttığı ve böylelikle karvakrolün nöroprotektif etki gösterdiği tespit edilmiştir. *İn vivo* deneylerdeki pasif sakınma testinde AH modeli hayvanların karanlık bölmeye girme sürelerinin uzaması ve bunun karvakrol tarafından kısaltılması ve ayrıca hipokampal histolojik kesitlerde karvakrolün AH grubunda bozulan nöronal morfolojiyi iyileştirici etkisinin görüldüğü bulgularımız karvakrolün *in vitro* nöroprotektif etkilerini doğrulamıştır. Bu bulgularımızla uyumlu olarak önceki çalışmalarda karvakrolün *in vitro* da nöronlar üzerine sitoprotektif ve nöroprotektif etkileri olduğu bildirilmiştir (228, 229).

Bununla birlikte *in vitro* bulgularımıza göre AH grupta düzeyleri artan oksidatif stres belirteçlerinden H_2O_2 ve MDA'nın karvakrolün her üç konsantrasyonu tarafından da azaltılması karvakrolün nöronal AH modelinde antioksidan etkiler gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca yine *in vitro* AH grupta antioksidan enzim CAT' ın düzeyinin kontrole göre artması ve karvakrol uygulaması ile birlikte azalması, AH'de serbest radikallerin artışına paralel olarak, bu radikallerin toksik etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla enzimatik antioksidan aktivasyonda da bir artışın olduğunun göstergesidir.

AH patofizyolojisinde oksidatif stres önemli bir rol oynamaktadır. Daha önce yapılan deneysel çalışmalarda AH modelinde oksidatif stres belirteçlerinden MDA, ROS, 4-HNE ve TBARS seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (230). Ji ve arkadaşları (231) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, SH-SY5Y hücrelerinin A β ile muamelesi sonrasında hücre içi ROS miktarının ve MDA seviyesinin arttığı ve SOD ile GSH-Px antioksidan enzim düzeyinin azaldığı bildirilmiştir. Yine SH-SY5Y hücrelerinde A β 1-42 kaynaklı sitotoksitenin araştırıldığı bir çalışmada, A β ile oluşturulan Alzheimer grubundaki ROS miktarının kontrol grubuna göre on kat artış gösterdiği tespit edilmiştir (232). Zhang ve arkadaşları (233) tarafından yapılan başka bir çalışmada, A β 1-42'nin intrahipokampal enjeksiyonuyla sıçanlarda oluşturulmuş

olan AH modelinde sıçan beyinlerinden elde edilen dokularda A β 'nın SOD aktivitesini azalttığı ve MDA seviyesini ise artırdığı belirlenmiştir. Kantar Gök ve arkadaşları (234) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise, A β 1-42 uygulanan hayvanlarda oksidatif stres belirteçleri olan 4-HNE ve TBARS seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada A β ile indüklenmiş AH sıçan modelinde antioksidan-oksidan parametrelerin etkinliği araştırılmış olup sıçan kortikal ve hipokampal dokularda CAT, GPx, SOD ve GSH antioksidan enzim aktivitelerinin azaldığı ve MDA oksidan düzeyinin arttığı bulunmuştur (235). Ayrıca, yüksek MDA düzeyi, Alzheimer'da amiloidozlu birçok hayvan modellerinde gözlemlendiği bildirilmiştir (236).

Çalışmamızda, karvakrolün *in vitro* nöronal modelde, hücresel düzeyde oksidatif stres belirteçlerini azaltması ve hücre canlılığını artırması karvakrolün muhtemelen nöronal oksidatif hasarı önleyerek nöroprotektif etkiler gösterdiğini önermektedir. Bu bulgularımız karvakrolün antioksidan etkilerini bildiren daha önceki çalışmalarla da uyumludur. Bu çalışmaların birinde Medhat ve arkadaşları (237) AlCl₃ ile indüklenen *in vivo* AH modelinde karvakrolün antioksidan rolünü araştırmayı amaçlamış ve sonuçta sıçanlardan elde edilen beyin dokularında karvakrolün antioksidan enzim SOD ile GSH aktivitesini arttırdığını ve oksidatif stres göstergesi TBARS ve gelişmiş oksidasyon protein ürünü (AOPP) üretimini inhibe ettiğini bulmuşlardır. Bununla birlikte azalmış olan asetilkolin seviyesini artırarak asetilkolinesteraz inhibitör etki gösterdiği de tespit edilmiştir (237). Yine karvakrolün antioksidan ve asetilkolinesteraz inhibitör etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise, DPPH serbest radikal, süperoksit anyon radikal ve hidrojen peroksit temizleme aktiviteleri, demirli iyon şelatlama, ABTS radikal katyon deklorizasyon ve ferrik tiyosiyanat testlerle antioksidan kapasitesi ve Ellman's metot ile kolinesteraz inhibisyon özelliği değerlendirilmiş olup güçlü bir antioksidan aktiviteye ve AChE inhibitör etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (238). Kaufmann (28) ve ayrıca Orhan ve arkadaşları (29) tarafından *in vitro* çalışmalarda da karvakrolün asetilkolinesteraz inhibitör aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Karvakrolün nöroprotektif ve antioksidan etkilerinin araştırıldığı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, etanol indüklü hipokampal nöronal hasarı azaltarak hücre canlılığını artırdığı ve MDA oksidan seviyesini azaltıp SOD, GSH, GSH-Px ve CAT enzim aktivitelerini

artırdığı belirlenmiştir. Karvakrolün, etanolün neden olduğu nöron hasarı üzerindeki protektif etkisinin yanı sıra oksidatif strese karşıda koruyucu rol oynadığı bildirilmiştir (239). SH-SY5Y insan nöroblastom hücrelerinde H₂O₂ kaynaklı sitotoksositeye karşı karvakrolün nöroprotektif ve antioksidan etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada, karvakrolün, SH-SY5Y hücrelerinde antioksidan kapasiteyi artırarak ve mitokondriyal hasarı azaltarak protektif etki gösterdiği bildirilmiştir (228).

AH patofizyolojisine dair kabul edilen teorilerden taupati'ye göre, her ne kadar nöronal intrasellüler tau proteinlerinin aşırı fosforilasyonu sonucu oluşan tau proteinlerinin patolojik agregasyonunun hastalığın ana nedeni olduğu yönünde genel bir kabul olsa da daha önce yapılan çok sayıda çalışma tau protein agregatlarından ziyade agrege olmamış normal tau proteinlerinin aşırı ekspresyonunun AH'deki nörodejenerasyona ve bilişsel yetilerdeki azalmaya yol açtığını bildirmiştir (240-242). Bu çalışmalardan birinde beş AH' nın, ölümden hemen sonra, alınan hipokampus dokularında tau mRNA düzeylerinin kontrollere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (240). Bolos ve arkadaşlarının (241) yapmış olduğu bir çalışmada, Tau proteininin monomerlerden ve dimerlerden oluşan rekombinant insan Tau izoformunu içeren retrovirüsler aracılığıyla farelere enjekte edilerek çözülebilir Tau'nun AH'deki rolünü araştırmayı hedeflemiş ve sonuçta çözünür Tau'nun fare hipokampal nöronlarında morfolojileri değiştirdiği, plastisiteyi bozduğu ve bunun sonucunda davranışsal fonksiyonlarda bozulmaya yol açtığı bildirilmiştir. Cowan ve Mudher (242) ise, *Drosophila* tauopati modeli kullanarak yüksek oranda fosforile edilmiş çözünür Tau'nun Alzheimerdaki toksisitesini araştırmışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre çözünür hiperfosforile Tau'nun, sito-iskelet sisteminin stabilizasyon bozukluğuna, sinaptik fonksiyon ve aksonal transport disfonksiyonuna yol açarak davranışsal fonksiyonlarda bozulmaya neden olduğunu bildirilmiştir.

Sunulan çalışmada *in vitro* nöronal süperfüzlarda ve *in vivo* deneylerde plazma ve hipokampal dokuda tau protein düzeyleri AH modellerinde ve karvakrol uygulanan gruplarda değişmedi. Bunun muhtemel bir nedeni amiloid beta ile indüklenen AH modelinde tau ekspresyonunun etkilenmiyor olması olabilir. Çünkü

insan hastalıklarını taklit eden deneysel bir model tek başına hastalığa ait tüm patofizyolojik özellikleri taklit edememektedir.

Bulgularımıza göre, elde edilen hem serum hemde hipokampus doku örneklerinde gruplar arasında SOD ve CAT enzim aktiviteleri ile Tau protein seviyelerinde belirgin değişikliğe yol açmamıştır. A β 1-40 ve A β 1-42 peptid seviyelerini değerlendirmek amacıyla serum örneklerinde gerçekleştirilen A β 1-40 ve A β 1-42 analiz sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel açıdan bir farklılık bulunmamıştır. Oksidatif hasar analizi için yapılan çalışmada ise, serum örneklerinin kontrol grupları için tespit edilen MDA ve H₂O₂ seviyelerinin, amiloid beta ve karvakrolün uygulandığı deney gruplarından elde edilen değerler arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık bulunmamıştır. Hipokampus dokularında gerçekleştirilen oksidatif hasar analiz sonuçlarında ise, Alzheimer’li grupta artan MDA ve H₂O₂ seviyelerinin karvakrol tarafından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde önlendiği bulunmuştur.

A β ile indüklenmiş oksidatif stres ve bunlarla ilişkili antioksidan savunma mekanizması Alzheimer’in etiyolojisi ve patogenezinde temel mekanizmalar olarak kabul edilmektedir (233). Antioksidan ve oksidan sistem arasındaki dengenin bozulması sonucunda serbest radikaller ortaya çıkmaktadır. Antioksidan savunma mekanizmasında yer alan endojen kaynaklı enzimlerden SOD, GSH-Px, CAT oluşan bu radikalleri elimine ederek hücreyi oksidatif strese karşı korumaktadır (236). Hücre membranları poliansature yağ asitleri (PUFAs) bakımından zengin olması nedeniyle serbest radikaller ile kolaylıkla etkileşime girebilmektedirler. Bu da lipitleri oksidatif strese karşı daha savunmasız hale getirmektedir. Bu yağ asitlerinin radikaller tarafından oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak adlandırılmaktadır ve bir dizi reaksiyon sonucunda açığa çıkan MDA ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) gibi ürünler oldukça hasar verici olup bu hasar membranı geri dönüşümsüz olarak etkilemektedir. MDA, lipid peroksidasyon tespitinde kullanılan önemli bir biyobelirteçtir (243). Daha önce yapılan çalışmalarda, AH modeli oluşturulmuş transgenik hayvanların korteks ve hipokampuslarında protein ve lipit peroksidasyonunda artışın gözlenmesi bulgularımızla paralellik göstermektedir (230).

Bergenia ciliata bitkisinden elde edilen bir bileşik olan Bergenin'in AH hayvan modelinde nöroprotektif etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, antioksidan, anti-enflamatuar ve kolinesteraz inhibitör aktivitesine sahip bu bileşiğin bilişsel fonksiyonları iyileştirdiği, sıçanların beyin homojenatlarında A β 1-42 ve p-Tau protein seviyelerini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (244). Benzer şekilde çalışmamızda AChE inhibitörü etkisine ve antioksidan etkiye sahip olan karvakrol de bu çalışma ile uyumlu olarak A β 1-42 ile indüklenen *in vitro* ve *in vivo* AH modellerinde antioksidan ve nöroprotektif etkiler göstermiştir. Ayrıca çalışmamızda karvakrolün davranış testinde öğrenmeyi güçlendirici etkileri de hücre, doku ve sistemik seviyelerdeki anti-Alzheimer etkisini doğrulamaktadır.

Daha önce *in vivo* çalışmalarda A β peptitlerinin hayvanlarda AH bulgularına benzer şekilde öğrenme ve bellek fonksiyonlarında kayıplara yol açtığı gösterilmiştir (245). Diğer taraftan, antioksidanlar A β kaynaklı nörotoksisteyi ve hücre ölümünü azaltabilmekte ve böylelikle hafıza ve bilişsel işlevlerdeki Alzheimer'dan kaynaklı bozulmayı azaltabilmektedir (246).

Sunulan çalışmada karvakrolün *in vitro* ve *in vivo* AH modellerindeki sergilediği terapötik etkiler, literatürdeki benzer antioksidan ve anti-AChE özelliğine sahip bitki ekstraktlarının veya etken maddelerin A β ile indüklenen nörotoksiste, öğrenme ve bilişsel işlevlerdeki bozulma üzerine iyileştirici etkilerini bildiren çalışmalarla uyumludur (169, 235, 247, 248).

Bulgularımız *in vivo* AH modelinde karvakrolün, oksidatif stresi azalttığı, öğrenme/belleği artırdığı ve nörodejenerasyona karşı koruyucu etkiler gösterdiğini ortaya çıkarmıştır.

Sonuç olarak, bu araştırma ile *in vitro* ve *in vivo* AH modellerinde A β ile indüklenen nöron kaybı, oksidatif stres ve öğrenmedeki bozulmaya karşı karvakrolün koruyucu etkileri ilk kez ortaya çıkarılmıştır. Alzheimer hastalığında kolinerjik nöron kaybının bir sonucu olarak ortaya çıkan azalmış asetilkolin düzeyi ve düşük kolinerjik reseptör aktivasyonunun öğrenme fonksiyonlarındaki bozulmaya ve hafıza kaybına yol açtığı bilinmektedir. Sunulan bu tez çalışmasında asetilkolin esteraz inhibitör aktivitesine sahip karvakrolün *in vivo* deneysel Alzheimer hastalığı

modelinde intrahipokampal amiloid- β enjeksiyonu ile indüklenen öğrenmedeki bozulmanın karvakrol uygulaması ile azaldığı pasif sakınma testi ile gösterilmiştir. Ayrıca bu davranışsal parametreler hipokampüsün histopatolojik görüntüleri ve beyin dokusundaki oksidatif stres belirteçleri ile doğrulanmıştır. Sunulan çalışmada *in vivo* bulgularımızla uyumlu olarak *in vitro* deneylerden elde ettiğimiz bulgular da hücre düzeyinde karvakrolün nöronlardaki artmış olan oksidatif stresi azaltarak ve hücre canlılığını artırarak nöroprotektif etkiye sahip olduğunu doğrulamaktadır. Böylece çalışmamızda iki farklı deneysel Alzheimer modelinde karvakrolün artmış olan oksidatif stresi ve nöron kaybını azaltarak ve ayrıca öğrenmedeki bozulmayı iyileştirerek protektif etki göstermesi, karvakrolün ileride Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılma potansiyeline sahip olduğunu ve yeni farmakolojik ilaç araştırmalarına yönelik çalışmalara önemli katkılar sağlayabileceğini önermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Retinoik asit uygulaması ile farklılaştırılan SH-SY5Y hücrelerine A β uygulanarak oluşturulan *in vitro* AH modelinde karvakrol hücre canlılığını artırarak nöroprotektif etki göstermektedir.
- *In vitro*'da karvakrol A β uygulaması ile düzeyleri artan oksidatif stres belirteçlerinden MDA ve H₂O₂ artışlarını azaltarak oksidatif strese bağlı nöron hasarını azaltmaktadır.
- Karvakrol *in vivo* AH modelinde A β 'nın yol açtığı hipokampal MDA ve H₂O₂ seviyelerindeki artışları azaltarak ve hipokampal nöronal hasarı önleyerek sistemik düzeyde oksidatif strese ve nöronal hasara karşı koruyucu etkiler göstermektedir.
- *In vitro* ve *in vivo* modellerdeki etkilerinin sonucu olarak karvakrol, pasif sakınma testinde A β uygulaması ile bozulan öğrenmeyi düzeltici yönde etki göstermektedir.
- Sunulan çalışma karvakrolün AH'daki etkilerine dair literatürdeki ilk çalışma olduğundan dolayı ileride AH ile ilgili yapılacak muhtemel çalışmalara öncülük edebilir ve bu konuda çalışan dünya genelindeki araştırmacılara iyi bir literatür desteği sağlayabilir.
- Sunulan çalışmaya ek olarak karvakrolün ileride farklı deneysel AH modellerinde de çalışılması ile AH'daki terapötik etkileri daha fazla doğrulanabilir.
- İleride yapılacak daha fazla deneysel ve klinik çalışma karvakrolün AH'da tedavi edici farmakolojik bir kimyasal olarak kullanılıp kullanılamayacağı konusunda iyi bir fikir verebilir.

7. KAYNAKLAR

- 1) **García-Font N, Günes-Bayir A, Kocyigit A, Güler EM, Bilgin MG, Ergün İS, Dadak A.** Effects of carvacrol on human fibroblast (WS-1) and gastric adenocarcinoma (AGS) cells in vitro and on Wistar rats in vivo. *Mol Cell Biochem*, **2018**. doi:10.1007/s11010-018-3329-5.
- 2) **Reddy PH, Beal MF.** Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med*, **2008**; 14 (2): 45-53.
- 3) **Arber C, Lovejoy C, Wray S.** Stem cell models of Alzheimer's disease: progress and challenges. *Alzheimers Res Ther.*, **2017**; 9(1): 42.
- 4) **Dgachi Y, Sokolov O, Luzet V, Godyn J, Panek D, Bonet A, Martin H, Iriepa I, Moraleda I, García-Iriepa C, Janockova J, Richert L, Soukup O, Malawska B, Chabchoub F, Marco-Contelles J, Ismaili L.** Tetrahydropyranodiquinolin-8-amines as new, non hepatotoxic, antioxidant, and acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease therapy. *Eur J Med Chem.*, **2017**; 126: 576-589.
- 5) **Zuo L, Hemmelgarn BT, Chuang CC, Best TM.** The Role of Oxidative Stress-Induced Epigenetic Alterations in Amyloid- β Production in Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev*, **2015**; 2015: 604658.
- 6) **Dumont M, Beal MF.** Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radical Biology & Medicine*, **2011**; 51: 1014-10026.
- 7) **Prakash A, Dhaliwal GK, Kumar P, Majeed ABA.** Brain biometals and Alzheimer's disease – boon or bane?. *International Journal of Neuroscience*, **2016**; 1-10.
- 8) **Tommonaro G, García-Font N, Vitale RM, Pejin B, Iodice C, Cañadas S, Marco-Contelles J, Oset-Gasque MJ.** Avarol derivatives as competitive AChE inhibitors, non hepatotoxic and neuroprotective agents for Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem*, **2016**; 122: 326-338.
- 9) **Carolindah MN, Rosli R, Adam A and Nordin N.** An Overview Of In Vitro Research Models For Alzheimer's Disease (AD). *Regenerative Research*, **2013**; 2(2): 8-13.
- 10) **Cobb CA, Cole MP.** Oxidative and nitrate stress in neurodegeneration. *Neurobiology of Disease*, **2015**; 84: 4-21.
- 11) **Derf A, Mudududdla R, Bharate SB, Chaudhuri B.** Inhibitors of A β 42-induced endoplasmic reticular unfolded protein response (UPR(ER)), in yeast, also rescue yeast cells from A β 42-mediated apoptosis. *Eur J Pharm Sci*, **2019**; 128: 118-127.
- 12) **Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M.** Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem.*, **2010**; 345(1-2): 91-104.
- 13) **Hettiarachchi N, Dallas M, Al-Owais M, et al.** Heme oxygenase-1 protects against Alzheimer's amyloid- β 1-42-induced toxicity via carbon monoxide production. *Cell Death & Disease*, **2014**; 5(12): e1569.

- 14) **Huang W, Zhang X, ve Chen W.** Role of oxidative stress in Alzheimer's disease (Review). *Biomedical Reports*, **2016**; 4: 519-522.
- 15) **Mao P, Reddy PH.** Aging and amyloid beta-induced oxidative DNA damage and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: Implications for early intervention and therapeutics. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2011**; 1812: 1359-1370.
- 16) **Hureau C.** Coordination of redox active metal ions to the amyloid precursor protein and to amyloid- β peptides involved in Alzheimer disease. Part 1: An overview. *Coordination Chemistry Reviews*, **2012**; 256: 2164-2174.
- 17) **Chen JH, Ke KF, Lu JH, Qiu YH, Peng YP.** Protection of TGF- β 1 against neuroinflammation and neurodegeneration in A β 1-42-induced Alzheimer's disease model rats. *PLoS One*, **2015**; 10(2): e0116549.
- 18) **Reitz C, Mayeux R.** Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol*, **2014**; 88 (4): 640-51.
- 19) **Swomley AM, Förster S, Keeney JT, Triplett J, Zhang Z, Sultana R, Butterfield DA.** Abeta, oxidative stress in Alzheimer disease: evidence based on proteomics studies. *Biochim Biophys Acta*, **2014**; 1842 (8): 1248-57.
- 20) **Mattson MP.** Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, **2004**; 430 (7000): 631-9.
- 21) **Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A, Sofi MA, Ganje SA.** Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed Pharmacother.*, **2015**; 74: 101-10.
- 22) **Resende R, Moreira PI, Proença T, Deshpande A, Busciglio J, Pereira C, Oliveira CR.** Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*, **2008**; 44 (12): 2051-7.
- 23) **Biran Y, Masters CL, Barnham KJ, Bush AI, Adlard PA.** Pharmacotherapeutic targets in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med.*, **2009**; 13(1): 61-86.
- 24) **Eker E.** Alzheimer Hastalığı, Türkiye'de Sık Karşılaşılan Psikiyatrik Hastalıklar Sempozyum Dizisi. **2008**; 62: 85-110.
- 25) **Günes-Bayir A, Kocyigit A, Güler EM, Bilgin MG, Ergün İS, Dadak A.** Effects of carvacrol on human fibroblast (WS-1) and gastric adenocarcinoma (AGS) cells in vitro and on Wistar rats in vivo. *Mol Cell Biochem.*, **2018**; 448(1-2): 237-249.
- 26) **Lins LCRF, Souza MF, Bispo JMM, Gois AM, Melo TCS, Andrade RAS, Quintans-Junior LJ, Ribeiro AM, Silva RH, Santos JR, Marchioro M.** Carvacrol prevents impairments in motor and neurochemical parameters in a model of progressive parkinsonism induced by reserpine. *Brain Res Bull.* **2018**; 139: 9-15.
- 27) **Hotta M, Nakata R, Katsukawa M, Hori K, Takahashi S, Inoue H.** Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPARalpha and gamma and suppresses COX-2 expression. *J Lipid Res.*, **2010**; 51(1): 132-9.
- 28) **Kaufmann D, Dogra AK, Wink M.** Myrtenal inhibits acetylcholinesterase, a known Alzheimer target. *J Pharm Pharmacol.*, **2011**; 63(10): 1368-71.
- 29) **Orhan I, Kartal M, Kan Y, Sener B.** Activity of essential oils and individual components against acetyl- and butyrylcholinesterase. *Z Naturforsch C.*, **2008**; 63 (7-8): 547-53.

- 30) **Jukic M, Politeo O, Maksimovic M, Milos M, Milos M.** In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytother Res.*, **2007**; 21(3): 259-61.
- 31) **Novotny M, Klimova B, Valis M.** Nitrendipine and Dementia: Forgotten Positive Facts? *Front Aging Neurosci*, **2018**; 10: 418.
- 32) **Barkhof F, van Buchem MA.** Neuroimaging in Dementia. In: Hodler J., Kubik-Huch R., von Schulthess G. (eds) Diseases of the Brain, Head and Neck, Spine **2016**.
- 33) **World Alzheimer Report (WAR) - The state of the art of dementia research: New frontiers. 2018.**
- 34) **Maresova P, Klimova B, Novotny M and Kuca K.** Alzheimer's and Parkinson's diseases: expected economic impact on europe-a call for a uniform european strategy. *J. Alzheimers Dis*, **2016**; 54: 1123–1133.
- 35) **Mullane K, Williams M.** Alzheimer's disease (AD) therapeutics - 2: Beyond amyloid - Re-defining AD and its causality to discover effective therapeutics. *Biochem Pharmacol*, **2018**; 158: 376-401.
- 36) **Shen ZX.** Brain cholinesterases: II. The molecular and cellular basis of Alzheimer's disease. *Med Hypotheses*, **2004**; 63 (2): 308-21.
- 37) **Cao Z, Wang F, Xiu C, Zhang J, Li Y.** Hypericum Perforatum Extract Attenuates Behavioral, Biochemical, and Neurochemical Abnormalities in Aluminum Chloride-Induced Alzheimer's Disease Rats. *Biomed Pharmacother*, **2017**; 91: 931-937.
- 38) **Lovell MA, Markesbery WR.** Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Research*, **2007**; 35 (22): 7497-7504.
- 39) **Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, Van der Flier WM.** Alzheimer's disease. *Lancet*, **2016**; 388 (10043): 505-17.
- 40) **Hampel H, Prvulovic D, Teipel S, Jessen F, Luckhaus C, Frölich L, Riepe MW, Dodel R, Leyhe T, Bertram L, Hoffmann W, Faltraco F.** German Task Force on Alzheimer's Disease (GTF-AD). The future of Alzheimer's disease: the next 10 years. *Prog Neurobiol*, **2011**; 95 (4): 718-28.
- 41) **Öztürk GB, Karan MA.** Alzheimer hastalığının fizyopatolojisi. *Klinik Gelişim*, **2009**; 22: 32-46.
- 42) **Kim J, Basak JM, Holtzman DM.** The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*, **2009**; 63 (3): 287-303.
- 43) **Emerit J, Edeas M, Bricaire F.** Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*, **2004**; 58 (1): 39-46.
- 44) **Johannes SC, Saliba SW, Oliveira AC.** Studying neurodegenerative diseases in culture models. *Braz J Psychiatry*. **2013**; 35 (2): S92-100.
- 45) **Blennow K, Mattsson N, Schöll M, Hansson O, Zetterberg H.** Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.*, **2015**; 36(5): 297-309.
- 46) **Gürvit İH.** Demans sendromu, Alzheimer hastalığı ve Alzheimer dışı demanslar. Nöroloji (Editör A. Emre Öge). Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul **2004**: 377-204.

- 47) **Ayton S, Lei P, Bush AI.** Metallostasis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* **2013**, 62: 76–89.
- 48) **Thinakaran G, Koo EH.** Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem*, **2008**; 283 (44): 29615-9.
- 49) **Gao Q, Fang Y, Zhang S, Wong HSH, Chan YE, Wong SSM, Yung KKL, Lai KWC.** Dynamic effect of beta-amyloid 42 on cell mechanics. *J Biomech*, **2019**; 86: 79-88.
- 50) **Barykin EP, Mitkevich VA, Kozin SA, Makarov AA.** Amyloid β Modification: A Key to the Sporadic Alzheimer's Disease? *Front Genet.*, **2017**; 8: 58.
- 51) **Dawkins E, Small DH.** Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *J Neurochem.*, **2014**; 129(5): 756-69.
- 52) **Tiiman A, Palumaa P, Tõugu V.** The missing link in the amyloid cascade of Alzheimer's disease - metal ions. *Neurochem Int*, **2013**; 62 (4): 367-78.
- 53) **Andrew RJ, Fisher K, Heesom KJ, Kellett KAB, Hooper NM.** Quantitative interaction proteomics reveals differences in the interactomes of amyloid precursor protein isoforms. *J Neurochem.*, **2019**; doi: 10.1111/jnc.14666.
- 54) **Nalivaeva NN, Turner AJ.** AChE and the amyloid precursor protein (APP) -Cross-talk in Alzheimer's disease. *Chem Biol Interact*, **2016**; 259 (PtB): 301-306.
- 55) **Nalivaeva NN, Turner AJ.** The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Lett*, **2013**; 587 (13): 2046-54.
- 56) **Folch J, Ettcheto M, Petrov D, Abad S, Pedrós I, Marin M, Olloquequi J, Camins A.** Review of the advances in treatment for Alzheimer disease: Strategies for combating β -amyloid protein. *Neurologia*, **2018**; 33 (1): 47-58.
- 57) **Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F.** Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol*, **2018**; 14: 450-464.
- 58) **Arbor SC, LaFontaine M, Cumbay M.** Amyloid-beta Alzheimer targets – protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores. *Yale J Biol Med.*, **2016**; 89(1): 5-21.
- 59) **Barage SH, Sonawane KD.** Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, **2015**; 52: 1-18.
- 60) **Chen L, Yu P, Zhang L, Zou Y, Zhang Y, Jiang L, Gao R, Xiao H, Qian Y, Wang J.** Methamphetamine exposure induces neuropathic protein β -Amyloid expression. *Toxicol In Vitro*, **2019**; 54: 304-309.
- 61) **Haass C, Selkoe DJ.** Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature reviews*, **2007**; 8: 101-12.
- 62) **Cole SL, Vassar R.** The Alzheimer's Disease β -Secretase Enzyme, BACE1. *Molecular Neurodegeneration*, **2007**; 2(1): 1–25.
- 63) **Pearson HA, Peers C.** Physiological roles for amyloid beta peptides. *J Physiol*, **2006**; 575 (Pt 1): 5-10.
- 64) **Li H, Liu CC, Zheng H, Huang TY.** Amyloid, tau, pathogen infection and antimicrobial protection in Alzheimer's disease -conformist, nonconformist, and realistic prospects for AD pathogenesis. *Transl Neurodegener*, **2018**; 7: 34.

- 65) **Aleksis R, Oleskovs F, Jaudzems K, Pahnke J, Biverstål H.** Structural studies of amyloid- β peptides: Unlocking the mechanism of aggregation and the associated toxicity. *Biochimie*, **2017**; 140: 176-192.
- 66) **Falker C, Hartmann A, Guett I, Dohler F, Altmeyen H, Betzel C, Schubert R, Thurm D, Wegwitz F, Joshi P, Verderio C, Krasemann S, Glatzel M.** Exosomal cellular prion protein drives fibrillization of amyloid beta and counteracts amyloid beta-mediated neurotoxicity. *J Neurochem.*, **2016**; 137(1): 88-100.
- 67) **Awasthi M, Singh S, Pandey VP, Dwivedi UN.** Alzheimer's disease: An overview of amyloid beta dependent pathogenesis and its therapeutic implications along with in silico approaches emphasizing the role of natural products. *J Neurol Sci*, **2016**; 361: 256-71.
- 68) **Thakur A, Chun YS, October N, Yang HO, Maharaj V.** Potential of South African medicinal plants targeting the reduction of A β 42 protein as a treatment of Alzheimer's disease. *J Ethnopharmacol*, **2019**; 231: 363-373.
- 69) **Evin G, Weidemann A.** Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides. *Peptides*, **2002**; 23(7): 1285-97.
- 70) **Ries M, Sastre M.** Mechanisms of A β Clearance and Degradation by Glial Cells. *Front Aging Neurosci*, **2016**; 8: 160.
- 71) **Dhanavade MJ, Sonawane KD.** Insights into the molecular interactions between aminopeptidase and amyloid beta peptide using molecular modeling techniques. *Amino Acids*, **2014**; doi: 10.1007/s00726-014-1740-0.
- 72) **Jalkute CB, Sonawane KD.** Evaluation of a possible role of Stigmatella aurantiaca ACE in A β peptide degradation: a molecular modeling approach. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **2015**; 25: 26-36.
- 73) **Tanzi RE, Bertram L.** New frontiers in Alzheimer's disease genetics, *Neuron*, **2001**; 32 (2): 181-4.
- 74) **Dingwall CA.** Copper-binding site in the cytoplasmic domain of BACE1 identifies a possible link to metal homeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans.*, **2007**; 35(Pt 3): 571-3.
- 75) **Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA.** Alzheimer disease. *Dis Mon.*, **2010**; 56, 484-546.
- 76) **Morgan C, Colombres M, Nunez MT, Inestro NC.** Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, **2004**; 74: 323-349.
- 77) **Nikmahzar E, Jahanshahi M, Elyasi L, Saedi M, Babakordi F, Bahlakeh G.** Human chorionic gonadotropin attenuates amyloid- β plaques induced by streptozotocin in the rat brain by affecting cytochrome c-ir neuron density. *Iran J Basic Med Sci.* **2019**; 22 (2): 166-172.
- 78) **Tochio N, Murata T, Utsunomiya-Tate N.** Effect of site-specific amino acid D-isomerization on β -sheet transition and fibril formation profiles of Tau microtubule-binding repeat peptides. *Biochem Biophys Res Commun*, **2019**; 508 (1): 184-190.
- 79) **Pickhardt M, Tassoni M, Denner P, Kurkowsky B, Kitanovic A, Möhl C, Fava E, Mandelkow E.** Screening of a neuronal cell model of tau pathology for therapeutic compounds. *Neurobiol Aging*, **2019**; 76: 24-34.
- 80) **Chu D, Liu F.** Pathological Changes of Tau Related to Alzheimer's Disease. *ACS Chem Neurosci*, **2019**; 10 (2): 931-944.

- 81) **Pedersen JT, Sigurdsson EM.** Tau immunotherapy for Alzheimer's disease. *Trends Mol Med*, **2015**; 21 (6): 394-402.
- 82) **Nam WH, Choi YP.** In vitro generation of tau aggregates conformationally distinct from parent tau seeds of Alzheimer's brain. *Prion*, **2019**; 13 (1): 1-12.
- 83) **Kjaergaard M, Dear AJ, Kundel F, Qamar S, Meisl G, Knowles TPJ, Klenerman D.** Oligomer Diversity during the Aggregation of the Repeat Region of Tau. *ACS Chem Neurosci*, **2018**; 9 (12): 3060-3071.
- 84) **Sharma P, Srivastava P, Seth A, Tripathi PN, Banerjee AG, Shrivastava SK.** Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer's disease and potential therapeutic strategies. *Prog Neurobiol*, **2019**; 174: 53-89.
- 85) **Aka TD, Rashid MMO, Paul SC, Halim MA.** A review on molecular neuropathology of Alzheimer's disease in association with aging. *J Res Pharm.*, **2019**; 23(1): 1-15.
- 86) **Uddin MS, Mamun AA, Labu ZK, Hidalgo-Lanussa O, Barreto GE, Ashraf GM.** Autophagic dysfunction in Alzheimer's disease: Cellular and molecular mechanistic approaches to halt Alzheimer's pathogenesis. *J Cell Physiol*, **2019**; 234 (6): 8094-8112.
- 87) **Cao YN, Zheng LL, Wang D, Liang XX, Gao F, Zhou XL.** Recent advances in microtubule-stabilizing agents. *Eur. J. Med. Chem.*, **2018**; 143: 806–828
- 88) **Jouanne M, Rault S, Voisin-Chiret AS.** Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents. *Eur J Med Chem*, **2017**; 139: 153-167.
- 89) **Lim S, Haque MM, Kim D, Kim DJ, Kim YK.** Cell-based Models To Investigate Tau Aggregation. *Comput Struct Biotechnol J.*, **2014**; 12 (20-21): 7-13.
- 90) **Chen S, Ge X, Chen Y, Lv, N, Liu Z, Yuan W.** Advances with RNA Interference in Alzheimer's Disease Research. *Drug Design, Development and Therapy*, **2013**; 7: 117–25.
- 91) **Mudher A, Colin M, Dujardin S, Medina M, Dewachter I, Alavi Naini SM, Mandelkow EM, Mandelkow E, Buee L, Goedert M and Brion JP.** What is the evidence that tau pathology spreads through prion-like propagation? *Acta Neuropathol Commun*, **2017**; 5: 99.
- 92) **Flach K, Hilbrich I, Schiffmann A, Gartner U, Kruger M, Leonhardt M, Waschipky H, Wick L, Arendt T, Holzer M.** Tau oligomers impair artificial membrane integrity and cellular viability. *J. Biol. Chem.*, **2012**; 287: 43223–43233.
- 93) **Fontaine SN, Zheng D, Sabbagh JJ, Martin MD, Chaput D, Darling A, Trotter JH, Stothert AR, Nordhues BA, Lussier A, Baker J, Shelton L, Kahn M, Blair LJ, Stevens SM, Dickey CA.** DnaJ/Hsc70 chaperone complexes control the extracellular release of neurodegenerative-associated proteins. *EMBO J.*, **2016**; 35: 1537–1549.
- 94) **Saman S, Kim W, Raya M, Visnick Y, Miro S, Saman S, Jackson B, McKee AC, Alvarez VE, Lee NC, Hall GF.** Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J Biol Chem*, **2012**; 287 (6): 3842-9.
- 95) **DeVos SL, Corjuc BT, Oakley DH, Nobuhara CK, Bannan RN, Chase A, Commins C, Gonzalez JA, Dooley PM, Frosch MP, Hyman BT.** Synaptic Tau Seeding Precedes Tau Pathology in Human Alzheimer's Disease Brain. *Front. Neurosci.*, **2018**; 12: 267.

- 96) **Katsinelos T, Zeitler M, Dimou E, Karakatsani A, Mulle, HM, Nachman E, Steringer JP, Ruiz de Almodovar C, Nickel W, Jahn TR.** Unconventional Secretion Mediates the Trans-cellular Spreading of Tau. *Cell Rep.*, **2018**; 23: 2039–2055.
- 97) **Wu JW, Hussaini SA, Bastille IM, Rodriguez GA, Mrejeru A, Rilett K, Sanders DW, Cook C, Fu H, Boonen RA, Herman M, Nahmani E, Emrani S, Figueroa YH, Diamond MI, Clelland CL, Wray S, Duff KE.** Neuronal activity enhances tau propagation and tau pathology in vivo. *Nat Neurosci*, **2016**; 19 (8): 1085-92.
- 98) **Wischik CM, Schelter BO, Wischik DJ, Storey JMD, and Harrington CR.** Modeling Prion-Like Processing of Tau Protein in Alzheimer's Disease for Pharmaceutical Development. *J. Alzheimer's Dis*, **2018**; 62: 1287–1303.
- 99) **Bolos M, Llorens-Martin M, Jurado-Arjona J, Hernandez F, Rabano A and Avila J.** Direct Evidence of Internalization of Tau by Microglia In Vitro and In Vivo. *J. Alzheimer's Dis.*, **2016**; 50: 77– 87.
- 100) **Poljsak B, Šuput D, Milisav I.** Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*, **2013**; 2013: 956792.
- 101) **Persson T, Popescu BO, Cedazo-Minguez A.** Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? *Oxid Med Cell Longev*, **2014**; 2014: 427318.
- 102) **Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K.** Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int*, **2014**; 2014: 761264.
- 103) **Pisoschi AM, Pop A.** The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2015**; 97: 55-74.
- 104) **Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.*, **2007**; 39 (1), 44-84.
- 105) **Türkez H.** Bazi Bor Bileşiklerinin İn Vitro Şartlarda Periferel İnsan Kani Üzerine Genetik Ve Biyokimyasal Etkileri Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı. **2007**.
- 106) **Doorn JA and Petersen DR.** Covalent adduction of nucleophilic amino acids by 4-hydroxynonenal and 4-oxononenal. *Chemico-Biological Interactions*, **2003**; (143-144), 93–100.
- 107) **Chen Z, Zhong C.** Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull*, **2014**; 30 (2): 271-81.
- 108) **Skoumalova A, Hort J.** Blood markers of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*, **2012**, 16: 2291–2300.
- 109) **Yan MH, Wang X, Zhu X.** Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*, **2013**; 62: 90–101.
- 110) **Greenough MA, Camakaris J, Bush AI.** Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, **2013**; 62: 540–555.
- 111) **Dias-Santagata D, Fulga TA, Duttaroy A, Feany MB.** Oxidative stress mediates tau-induced neurodegeneration in Drosophila. *J Clin Invest* **2007**; 117: 236–245.
- 112) **Lee YJ, Han SB, Nam SY, Oh KW, Hong JT.** Inflammation and Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res*, **2010**, 33: 1539–1556.

- 113) **Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M.** Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol. Sci*, **2017**; 38: 592–607.
- 114) **Anand R, Gill KD, Mahdi AA.** Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*, **2014**; 76 Pt A: 27-50.
- 115) **Kurz A, Perneczky R.** Novel insights for the treatment of Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **2011**; 35 (2): 373-9.
- 116) **Omar SH, Scott CJ, Hamlin AS, Obied HK.** The protective role of plant biophenols in mechanisms of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem*, **2017**; 47: 1-20.
- 117) **Jabir NR, Khan FR, Tabrez S.** Cholinesterase targeting by polyphenols: A therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther*, **2018**; 24 (9): 753-762.
- 118) **Lao K, Ji N, Zhang X, Qiao W, Tang Z, Gou X.** Drug development for Alzheimer's disease: review. *J Drug Target*, **2019**; 27(2): 164-173.
- 119) **Kumar A, Ekavali SA.** A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Rep*, **2015**; 67 (2): 195-203.
- 120) **Vellas B, Sol O, Snyder PJ, Ousset PJ, Haddad R, Maurin M, et al.** EHT0202 in Alzheimer's disease: a 3-month, random-ized, placebo-controlled, double-blind study. *Curr Alzheimer Res*, **2011**; 8: 203-12.
- 121) **Yan R, Vassar R.** Targeting the β -secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *Lancet Neurol*, **2014**; 13: 319-29.
- 122) **Chiang K, Koo EH.** Emerging therapeutics for Alzheimer's disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, **2014**; 54: 381-405.
- 123) **Doody RS, Raman R, Siemers E, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, et al.** A phase 2 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med.*, **2013**; 369: 341-50.
- 124) **Wolfe MS.** γ -Secretase as a target for Alzheimer's disease. *Adv Pharmacol*, **2012**; 64: 127-53.
- 125) **Brahmachari S, Paul A, Segal D, Gazit E.** Inhibition of amyloid oligomerization into different supramolecular architectures by small molecules: mechanistic insights and design rules. *Future Med. Chem.*, **2017**; 9: 797–810.
- 126) **Matlack KE, Tardiff DF, Narayan P, Hamamichi S, Caldwell KA, Caldwell GA, Lindquist S.** Clioquinol promotes the degradation of metal-dependent amyloid- β (A β) oligomers to restore endocytosis and ameliorate A β toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2014**; 111 (11): 4013-8.
- 127) **Aisen PS, Gauthier S, Ferris SH, Saumier D, Haine D, Garceau D, et al.** Tramiprosate in mild-to-moderate Alzheimer's disease--a randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-centre study (the Alphase Study). *Arch Med Sci.*, **2011**; 7: 102-11.
- 128) **Gauthier S, Aisen PS, Ferris SH, Saumier D, Duong A, Haine D et al.** Effect of tramiprosate in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: Exploratory analyses of the MRI sub-group of the Alphase study. *J Nutr Health Aging*. **2009**; 13: 550-7.
- 129) **Nalivaeva NN, Fisk LR, Belyaev ND, Turner AJ.** Amyloid-degrading enzymes as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, **2008**; 5: 212-24.

- 130) **Higuchi M, Iwata N, Saido TC.** Understanding molecular mechanisms of proteolysis in Alzheimer's disease: Progress toward therapeutic interventions. *Biochim Biophys Acta.*, **2005**; 1751: 60-7.
- 131) **Coman H and Nemes N.** New Therapeutic Targets in Alzheimer's Disease. *International Journal of Gerontology*, **2017**; 11 (2017): 2e6.
- 132) **Dai CL, Hu W, Tung YC, Liu F, Gong CX, Iqbal K.** Tau passive immunization blocks seeding and spread of Alzheimer hyperphosphorylated Tau-induced pathology in 3 x Tg-AD mice. *Alzheimer's Res. Ther.*, **2018**; 10: 13.
- 133) **Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, et al.** Clinical effects of A β -immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology*, **2005**; 64: 1553—62.
- 134) **Wiessner C, Wiederhold KH, Tissot AC, Frey P, Danner S, Jacobson LH, et al.** The second-generation active A β immunotherapy CAD106 reduces amyloid accumulation in APP transgenic mice while minimizing potential side effects. *J Neurosci*, **2011**; 31: 9323-31.
- 135) **Panza F, Solfrizzi V, Imbimbo BP, Loggoscino G.** Amyloid-directed monoclonal antibodies for the treatment of Alzheimer's disease: the point of no return. *Expert Opin Biol Ther*, **2014a**; 14: 1465-76.
- 136) **Panza F, Solfrizzi V, Imbimbo BP, Tortelli R, Santamato A, Loggoscino G.** Amyloid-based immunotherapy for Alzheimer's disease in the time of prevention trials: the way forward. *Expert Rev Clin Immunol*, **2014b**; 10: 405-19.
- 137) **Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, et al.** Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, **2014**; 370: 322-33.
- 138) **Doody RS, Thomas RG, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, et al.** Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med.*, **2014**; 370: 311-21.
- 139) **Piton M, Hirtz C, Desmetz C, Milhau J, Lajoix AD, Bennys K, Lehmann S, Gabelle A.** Alzheimer's disease: advances in drug development. *J. Alzheimers Dis*, **2018**; 65: 3–13.
- 140) **Logovinsky V, Satlin A, Lai R, Swanson C, Kaplow J, Osswald G, Basun H, Lannfelt L.** Safety and tolerability of BAN2401—a clinical study in Alzheimer's disease with a protofibril selective A β antibody. *Alzheimers Res. Ther*, **2016**; 8: 14.
- 141) **Jacobsen H, Ozmen L, Caruso A, Narquizian R, Hilpert H, Jacobson B, et al.** Combined treatment with a BACE inhibitor and anti-A β antibody gantenerumab enhances amyloid reduction in APP London mice. *J Neurosci.*, **2014**; 34: 11621-30.
- 142) **Novakovic D, Feligioni M, Scaccianoce S, Caruso A, Piccinin S, Schepisi C, et al.** Profile of gantenerumab and its potential in the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Des Devel Ther*, **2013**; 7: 1359-64.
- 143) **Bohrmann B, Baumann K, Benz J, Gerber F, Huber W, Knoflach F, et al.** A novel human anti-A β antibody demonstrates sustained cerebral amyloid-binding and elicits cell-mediated removal of human amyloid. *J Alzheimers Dis.*, **2012**; 28: 49-69.
- 144) **Engel T, Goni-Oliver P, Lucas JJ, Avila J, Hernandez F.** Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3 β overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J. Neurochem*, **2006**; 99: 1445-1455.

- 145) **Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, Gaynor K, Wang L, LaFrancois J, Feinstein B, Burns M, Krishnamurthy P, Wen Y, Bhat R, Lewis J, Dickson D, Duff K.** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**; 102: 6990e6995.
- 146) **Lovestone S, Boada M, Dubois B, et al.** A phase II trial of tideglusib in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* **2015**; 45: 75–88.
- 147) **Zhang B, Maiti A, Shively S, Lakhani F, McDonald-Jones G, Bruce J, et al.** Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**; 102 (1): 227–31.
- 148) **Brunden KR, Zhang B, Carroll J, Yao Y, Potuzak JS, Hogan A.-M.L.. et al.** Epothilone D improves microtubule density, axonal integrity, and cognition in a transgenic mouse model of tauopathy. *J Neurosci*, **2010**; 30(41): 13861–66.
- 149) **Gozes I.** NAP (davunetide) provides functional and structural neuroprotection. *Curr Pharm Des*, **2011**; 17(10): 1040–4.
- 150) **Hochgrafe, K., Sydow, A., Matenia, D., Cadinu, D., Konen, S., Petrova, O., Pickhardt, M., Goll, P., Morellini, F., Mandelkow, E., and Mandelkow, E. M.** Preventive methylene blue treatment preserves cognition in mice expressing full-length pro-aggregant human Tau. *Acta Neuropathol Commun*, **2015**; 3: 25.
- 151) **Iqbal K, Liu F, Gong CX.** Recent developments with tau-based drug discovery. *Expert Opin. Drug Discovery*, **2018**; 13: 399– 410.
- 152) **Novak P, Schmidt R, Kontseikova E, et al.** Safety and immunogenicity of the tau vaccine AADvac1 in patients with Alzheimer's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet Neurol*, **2017**; 16: 123–134.
- 153) **Gallardo G, Holtzman DM.** Antibody Therapeutics Targeting A β and Tau. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, **2017**; 7(10).
- 154) **Liu W, Ma H, DaSilva NA, Rose KN, Johnson SL, Zhang L, Wan C, Dain JA, Seeram NP.** Development of a neuroprotective potential algorithm for medicinal plants. *Neurochem Int.* **2016**;100:164-177.
- 155) **Kumar NS, Nisha N.** Phytomedicines as potential inhibitors of β amyloid aggregation: significance to Alzheimer's disease. *Chin J Nat Med.* **2014**; 12(11):801-18.
- 156) **Massi A, Bortolini O, Ragno D, et al.** Research progress in the modification of quercetin leading to anticancer agents. *Molecules*, **2017**; 22: 1270.
- 157) **Ademosun AO, Oboh G, Bello F, Ayeni PO.** Antioxidative properties and effect of quercetin and its glycosylated form (Rutin) on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities. *J Evid Based Complementary Altern Med.*, **2016**; 21: NP11-NP17.
- 158) **Omar SH.** Biophenols pharmacology against the amyloidogenic activity in Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother*, **2017**; 89: 396-413.
- 159) **Choi GN, Kim JH, Kwak JH, Jeong C-H, Jeong HR, Lee U, et al.** Effect of quercetin on learning and memory performance in ICR mice under neurotoxic trimethyltin exposure. *Food Chem*, **2012**; 132: 1019–24.
- 160) **Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB.** Curcumin as Curecumin: from kitchen to clinic. *Biochem. Pharmacol*, **2008**; 75 (4):787–809.

- 161) **Abbasi MA, Ilyas M, Aziz ur R, et al.** Curcumin and its derivatives: moderate inhibitors of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and trypsin. *Sci Iran*, **2012**; 19: 1580-1583.
- 162) **Strimpakos AS, Sharma RA.** Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. *Antioxid Redox Signal*, **2008**; 10: 511-545.
- 163) **Xiong Z, Hongmei Z, Lu S, Yu L.** Curcumin mediates presenilin-1 activity to reduce beta-amyloid production in a model of Alzheimer's Disease. *Pharmacol. Rep*, **2011**; 63 (5): 1101–1108.
- 164) **Huang HC, Xu K, Jiang ZF.** Curcumin-mediated neuroprotection against amyloidbeta-induced mitochondrial dysfunction involves the inhibition of GSK-3beta. *J Alzheimers Dis*, **2012**; 32: 981–96.
- 165) **Ringman JM, Younkin SG, Pratico D, Seltzer W, Cole GM, Geschwind DH, et al.** Biochemical markers in persons with preclinical familial Alzheimer disease. *Neurology*, **2008**; 71: 85–92.
- 166) **Oomen CA, Farkas E, Roman V, van der Beek EM, Luiten PGM, Meerlo P.** Resveratrol preserves cerebrovascular density and cognitive function in aging mice. *Front Aging Neurosci*, **2009**; 1: 4.
- 167) **Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekeres T.** Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat Res*, **2008**; 658: 68-94.
- 168) **Baur JA, Sinclair DA.** Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov.*, **2006**; 5: 493-506.
- 169) **Ma T, Tan M-S, Yu J-T, Tan L.** Resveratrol as a therapeutic agent for Alzheimer's disease. *Biomed Res Int*, **2014**; 2014: 350516.
- 170) **Richard T, Poupard P, Nassra M, Papastamoulis Y, Iglésias M-L, Krisa S, et al.** Protective effect of ε-viniferin on β-amyloid peptide aggregation investigated by electrospray ionization mass spectrometry. *Bioorganic & Med Chem*, **2011**; 19: 3152–5.
- 171) **Rivière C, Papastamoulis Y, Fortin PY, Delchier N, Andriamanarivo S, Waffo-Teguo P, et al.** New stilbene dimers against amyloid fibril formation. *Bioorg Med Chem Lett*, **2010**; 20: 3441–3.
- 172) **Wang Q, Ning L, Niu Y, Liu H, Yao X.** Molecular mechanism of the inhibition and remodeling of human islet amyloid polypeptide (hIAPP(1-37)) oligomer by resveratrol from molecular dynamics simulation. *J Phys Chem B.*, **2015**; 119 (1): 15-24.
- 173) **Stockley CS.** Wine consumption, cognitive function and dementias-A relationship? *Nutr. Aging*, **2015**; 3(2-4): 125–137.
- 174) **Rahvar M, Nikseresht M, Shafiee SM, et al.** Effect of oral resveratrol on the BDNF gene expression in the hippocampus of the rat brain. *Neurochem Res*, **2011**; 36: 761-765.
- 175) **Schmatz R, Mazzanti CM, Spanevello R, et al.** Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol*, **2009**; 610: 42-48.
- 176) **Wang J, Ho L, Zhao W, et al.** Grape-derived polyphenolics prevent Aβeta oligomerization and attenuate cognitive deterioration in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, **2008**; 28: 6388-6392.

- 177) **Giri BR, Roy B.** Resveratrol and α -viniferin induced alterations of acetylcholinesterase and nitric oxide synthase in *Raillietina echinobothrida*. *Parasitol Res.* **2015**; 114: 3775-3781.
- 178) **Biasibetti R, Tramontina AC, Costa AP, Dutra MF, Quincozes-Santos A, Nardin P,** et al. Green tea (–)epigallocatechin-3-gallate reverses oxidative stress and reduces acetylcholinesterase activity in a streptozotocin-induced model of dementia. *Behav Brain Res*, **2013**; 236: 186–93.
- 179) **Bu XL, Rao PP, Wang YJ.** Anti-amyloid aggregation activity of natural compounds: implications for Alzheimer's drug discovery. *Mol. Neurobiol*, **2016**; 53 (6) : 3565–3575.
- 180) **Lee JW, Lee YK, Ban JO, Ha TY, Yun YP, Han SB,** et al. Green tea (–)epigallocatechin-3-gallate inhibits beta-amyloid-induced cognitive dysfunction through modification of secretase activity via inhibition of ERK and NF-kappaB pathways in mice. *J Nutr*, **2009**; 139: 1987–93.
- 181) **Caleja C, Barros L, Barreira JCM, Ciric A, Sokovic M, Calhelha RC, Beatriz M, Oliveira PP, Ferreira ICFR.** Suitability of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract rich in rosmarinic acid as a potential enhancer of functional properties in cupcakes. *Food Chem.*, **2018**; 250: 67-74.
- 182) **Habtemariam S.** Molecular Pharmacology of Rosmarinic and Salvianolic Acids: Potential Seeds for Alzheimer's and Vascular Dementia Drugs. *Int J Mol Sci.*, **2018**; 19(2): pii: E458.
- 183) **Senol FS, Ślusarczyk S, Matkowski A, Pérez-Garrido A, Girón-Rodríguez F, Cerón-Carrasco JP, den-Haan H, Peña-García J, Pérez-Sánchez H, Domaradzki K, Orhan I.E.** Selective in vitro and in silico butyrylcholinesterase inhibitory activity of diterpenes and rosmarinic acid isolated from *Perovskia atriplicifolia* Benth. and *Salvia glutinosa* L. *Phytochemistry*, **2017**; 133: 33-44.
- 184) **Demirezer LÖ, Gürbüz P, Kelicen Uğur EP, Bodur M, Özenver N, Uz A, Güvenalp Z.** Molecular docking and ex vivo and in vitro anticholinesterase activity studies of *Salvia* sp. and highlighted rosmarinic acid. *Turk J Med Sci.*, **2015**; 45(5): 1141-8.
- 185) **Shan Y, Wang DD, Xu YX, Wang C, Cao L, Liu YS, Zhu CQ.** Aging as a Precipitating Factor in Chronic Restraint Stress-Induced Tau Aggregation Pathology, and the Protective Effects of Rosmarinic Acid. *J Alzheimers Dis*, **2016**; 49 (3): 829-44.
- 186) **Alkam T, Nitta A, Mizoguchi H, Itoh A, Nabeshima T.** A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by Abeta(25-35). *Behav Brain Res*, **2007**; 180 (2): 139-45.
- 187) **Aioldi C, Sironi E, Dias C, Marcelo F, Martins A, Rauter AP, Nicotra F, Jimenez-Barbero J.** Natural compounds against Alzheimer's disease: molecular recognition of Abeta1-42 peptide by *Salvia sclareoides* extract and its major component, rosmarinic acid, as investigated by NMR. *Chem. Asian J.*, **2013**; 8(3): 596–602.
- 188) **Taguchi R, Hatayama K, Takahashi T, Hayashi T, Sato Y, Sato D, Ohta K, Nakano H, Seki C, Endo Y, Tokuraku K, Uwai K.** Structure-activity relations of rosmarinic acid derivatives for the amyloid β aggregation inhibition and antioxidant properties. *Eur J Med Chem*, **2017**; 138: 1066-1075.
- 189) **Lin L, Huang QX, Yang SS, Chu J, Wang JZ, Tian Q.** Melatonin in Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci.*, **2013**; 14(7): 14575-93.
- 190) **Ling ZQ, Tian Q, Wang L, Fu ZQ, Wang XC, Wang Q, Wang JZ.** onstant illumination induces Alzheimer-like damages with endoplasmic reticulum involvement and the protection of melatonin. *J. Alzheimers Dis.* **2009**; 16, 287-300.

- 191) **Zhu LQ, Wang SH, Ling ZQ, Wang DL Wang JZ.** Effect of inhibiting melatonin biosynthesis on spatial memory retention and tau phosphorylation in rat. *J. Pineal Res.* **2004**, 37,71–77.
- 192) **Wang SW, Wang YJ, Su YJ, Zhou WW, Yang SG, Zhang R, Zhao M, Li YN, Zhang ZP, Zhan DW, Liu RT.** Rutin inhibits β -amyloid aggregation and cytotoxicity, attenuates oxidative stress, and decreases the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines. *Neurotoxicology*, **2012**; 33 (3): 482-90.
- 193) **Jimenez-Aliaga K, Bermejo-Bescos P, Benedi J, Martin-Aragon S.** Quercetin and rutin exhibit antiamyloidogenic and fibril-disaggregating effects in vitro and potent antioxidant activity in APPswe cells. *Life Sci.*, **2011**; 89 (25–26): 939–945.
- 194) **Yu XL, Li YN, Zhang H, Su YJ, Zhou WW, Zhang ZP, Wang SW, Xu PX, Wang YJ, Liu RT.** Rutin inhibits amylin-induced neurocytotoxicity and oxidative stress. *Food Funct*, **2015**; 6 (10): 3296-306.
- 195) **Lopez-Lazaro M.** Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin, *Mini Rev. Med. Chem*, **2009**; 9 (1): 31–59.
- 196) **Churches QI, Caine J, Cavanagh K, Epa VC, Waddington L, Tranberg CE, Meyer AG, Varghese JN, Streltsov V, Duggan PJ.** Naturally occurring polyphenolic inhibitors of amyloid beta aggregation. *Bioorg Med Chem Lett*, **2014**; 24 (14): 3108-12.
- 197) **Spohr L, Soares MSP, Oliveira PS, da Silveira de Mattos B, Bona NP, Pedra NS, Teixeira FC, do Couto CAT, Chaves VC, Reginatto FH, Lisboa MT, Ribeiro AS, Lencina CL, Stefanello FM, Spanevello RM.** Combined actions of blueberry extract and lithium on neurochemical changes observed in an experimental model of mania: exploiting possible synergistic effects. *Metab Brain Dis*, **2019**; 34 (2): 605-619.
- 198) **Tan L, Yang H, Pang W, Li H, Liu W, Sun S, Song N, Zhang W, Jiang Y.** Investigation on the Role of BDNF in the Benefits of Blueberry Extracts for the Improvement of Learning and Memory in Alzheimer's Disease Mouse Model. *J Alzheimers Dis*, **2017**; 56 (2): 629-640.
- 199) **Huang Y, Ren J, Qu X.** Nanozymes: Classification, Catalytic Mechanisms, Activity Regulation, and Applications. *Chem Rev.*, **2019**; 119 (6): 4357-4412.
- 200) **Yang B, Chen Y, Shi J.** Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. *Chemical Reviews*, **2019**; 119 (8): 4881-4985.
- 201) **Perez-Conesa D, Cao J, Chen L, McLandsborough L and Weiss J.** Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms by micelle-encapsulated eugenol and carvacrol. *J. Food Prot*, **2011**; 74: 55–62.
- 202) **Chaillot J, Tebbji F, Remmal A, Boone C, Brown GW, Bellaoui M, Sellam A.** The Monoterpene Carvacrol Generates Endoplasmic Reticulum Stress in the Pathogenic Fungus *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, **2015**; 59(8): 4584-92.
- 203) **Sánchez C, Aznar R, Sánchez G.** The effect of carvacrol on enteric viruses. *International Journal of Food Microbiology*, **2015**; 192: 72–76.
- 204) **Cacciatore I, Di Giulio M, Fornasari E, Di Stefano A, Cerasa LS, Marinelli L, Turkez H, Di Campli E, Di Bartolomeo S, Robuffo I, Cellini L.** Carvacrol codrugs: a new approach in the antimicrobial plan. *PLoS One*, **2015**; 10(4): e0120937.
- 205) **Cho S, Choi Y, Park S. Park T.** Carvacrol prevents diet-induced obesity by modulating gene expressions involved in adipogenesis and inflammation in mice fed with high-fat diet. *J. Nutr. Biochem.*, **2012**; 23: 192–201.

- 206) **Melo FH, Moura BA, de Sousa DP, de Vasconcelos SM, Macedo DS, Fonteles MM, Viana GS, de Sousa FC.** Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. *Fundam Clin Pharmacol*, **2011**; 25 (3): 362-7.
- 207) **Suntres ZE, Coccimiglio Alipour JM.** The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Crit Reviews Food Sci Nutr*, **2015**; 5 (3): 304–318.
- 208) **Trabace L, Zotti M, Morgese MG, Tucci P, Colaianna M, Schiavone S, Avato P, Cuomo V.** Estrous cycle affects the neurochemical and neurobehavioral profile of carvacrol-treated female rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. **2011**; 255 (2): 169-75.
- 209) **Kovalevich J, Langford D.** Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol*. 2013; 1078: 9-21.
- 210) **Bittencourt Pasquali MA, de Ramos VM, Albanus RDO, Kunzler A, de Souza LHT, Dalmolin RJS, Gelain DP, Ribeiro L, Carro L, Moreira JCF.** Gene Expression Profile of NF- κ B, Nrf2, Glycolytic, and p53 Pathways During the SH-SY5Y Neuronal Differentiation Mediated by Retinoic Acid. *Mol Neurobiol.*, **2016**; 53(1): 423-435.
- 211) **Lee M, McGeer E, McGeer PL.** Activated human microglia stimulate neuroblastoma cells to upregulate production of beta amyloid protein and tau: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiol Aging*. **2015**; 36 (1): 42-52.
- 212) **Azizi Z, Ebrahimi S, Saadatfar E, Kamalinejad M, Majlessi N.** Cognitive-enhancing activity of thymol and carvacrol in two rat models of dementia. *Behav Pharmacol.*, **2012**; 23(3): 241-9.
- 213) **Wu Y, Luo X, Liu X, Liu D, Wang X, Guo Z, Zhu L, Tian Q, Yang X, Wang JZ.** Intraperitoneal Administration of a Novel TAT-BDNF Peptide Ameliorates Cognitive Impairments via Modulating Multiple Pathways in Two Alzheimer's Rodent Models. *Sci Rep.*, **2015**; 5: 15032.
- 214) **Sohanaki H, Baluchnejadmojarad T, Nikbakht F, Roghani M.** Pelargonidin Improves Passive Avoidance Task Performance in a Rat Amyloid Beta25-35 Model of Alzheimer's Disease Via Estrogen Receptor Independent Pathways. *Acta Med Iran*, **2016**; 54 (4): 245-50.
- 215) **Xu P, Wang K, Lu C, Dong L, Gao L, Yan M, Aibai S, Yang Y, Liu X.** Protective effects of linalool against amyloid beta-induced cognitive deficits and damages in mice. *Life Sci*, **2017**; 174: 21-27.
- 216) **Lewandowski L, Kepinska M, Milnerowicz H.** Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase activity by selected environmental xenobiotics. *Environ Toxicol Pharmacol*. **2018**; 58: 105-113.
- 217) **Glorieux C, Calderon PB.** Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem.*, **2017**; 398(10): 1095-1108.
- 218) **Bertolín JR, Joy M, Blanco M.** Malondialdehyde determination in raw and processed meat products by UPLC-DAD and UPLC-FLD. *Food Chem.*, **2019**; 298: 125009.
- 219) **Bouayed J, Soulimani R.** Evidence that hydrogen peroxide, a component of oxidative stress, induces high-anxiety-related behaviour in mice. *Behav Brain Res*. **2019**; 359: 292-297.
- 220) **Gu Y, Ma LJ, Bai XX, Jie J, Zhang XF, Chen D, Li XP.** Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 protects PC12 cells from amyloid beta-induced neurotoxicity. *Neural Regen Res.*, **2018**; 13(10): 1842-1850.

- 221) **Farajdokht F, Amani M, Mirzaei Babil F, Alihemmati A, Mohaddes G, Babri S.** Troxerutin protects hippocampal neurons against amyloid beta-induced oxidative stress and apoptosis. *EXCLI J.* **2017**; 16: 1081-1089.
- 222) **Parnetti L, Chipi E, Salvadori N, D'Andrea K, Eusebi P.** Prevalence and risk of progression of preclinical Alzheimer's disease stages: a systematic review and meta-analysis. *Alzheimers Res Ther.* **2019**; 11 (1): 7.
- 223) **Ni J, Wu Z, Meng J, Zhu A, Zhong X, Wu S, Nakanishi H.** The Neuroprotective Effects of Brazilian Green Propolis on Neurodegenerative Damage in Human Neuronal SH-SY5Y Cells. *Oxid Med Cell Longev.* **2017**; 2017: 7984327.
- 224) **Farzaei MH, Bahramsoltani R, Abbasabadi Z, Braidy N, Nabavi SM.** Role of green tea catechins in prevention of age-related cognitive decline: Pharmacological targets and clinical perspective. *J Cell Physiol.* **2019**; 234 (3): 2447-2459.
- 225) **Liu W, Ma H, DaSilva NA, Rose KN, Johnson SL, Zhang L, Wan C, Dain JA, Seeram NP.** Development of a neuroprotective potential algorithm for medicinal plants. *Neurochem Int.* **2016**; 100: 164-177.
- 226) **Aazza S, Lyoussi B, Miguel MG.** Antioxidant and anticholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules.* **2011**; 16(9): 7672-90.
- 227) **Zafeer MF, Firdaus F, Ahmad F, Ullah R, Anis E, Waseem M, Ali A, Hossain MM.** Perillyl alcohol alleviates amyloid- β peptides-induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in SH-SY5Y cells. *Int J Biol Macromol.* **2018**; 109: 1029-1038.
- 228) **Chenet AL, Duarte AR, de Almeida FJS, Andrade CMB, de Oliveira MR.** Carvacrol Depends on Heme Oxygenase-1 (HO-1) to Exert Antioxidant, Anti-inflammatory, and Mitochondria-Related Protection in the Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells Line Exposed to Hydrogen Peroxide. *Neurochem Res.* **2019**; 44 (4): 884-896.
- 229) **Zengin Kurt B, Durdagi S, Celebi G, Ekhteiari Salmas R, Sonmez F.** Synthesis, anticholinesterase activity and molecular modeling studies of novel carvacrol-substituted amide derivatives. *J Biomol Struct Dyn.* **2019**; 1-19.
- 230) **Gandhi S, Abramov AY.** Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* **2012**; 2012: 1-11.
- 231) **Ji S, Li S, Zhao X, Kang N, Cao K, Zhu Y, Peng P, Fan J, Xu Q, Yang S, Liu Y.** Protective role of phenylethanoid glycosides, Torenoside B and Savatiside A, in Alzheimer's disease. *Exp Ther Med.* **2019**; 17 (5): 3755-3767.
- 232) **Hur J, Pak SC, Koo BS, Jeon S.** Borneol alleviates oxidative stress via upregulation of Nrf2 and Bcl-2 in SH-SY5Y cells. *Pharm Biol.* **2013**; 51 (1): 30-5.
- 233) **Zhang X, Wang X, Hu X, Chu X, Li X, Han F.** Neuroprotective effects of a Rhodiola crenulata extract on amyloid- β peptides (A β (1-42)) -induced cognitive deficits in rat models of Alzheimer's disease. *Phytomedicine.* **2019**; 57: 331-338.
- 234) **Kantar Gok D, Hidisoglu E, Ocak GA, Er H, Acun AD, Yargicoglu P.** Protective role of rosmarinic acid on amyloid beta 42-induced echoic memory decline: Implication of oxidative stress and cholinergic impairment. *Neurochem Int.* **2018**; 118: 1-13.
- 235) **Lin LW, Tsai FH, Lan WC, Cheng YD, Lee SC, Wu CR.** Steroid-Enriched Fraction of Achyranthes bidentata Protects Amyloid β Peptide 1-40-Induced Cognitive Dysfunction and Neuroinflammation in Rats. *Mol Neurobiol.* **2019**; 56 (8): 5671-5688.

- 236) **Postu PA, Sadiki FZ, El Idrissi M, Cioanca O, Trifan A, Hancianu M, Hritcu L.** Pinus halepensis essential oil attenuates the toxic Alzheimer's amyloid beta (1-42)-induced memory impairment and oxidative stress in the rat hippocampus. *Biomed Pharmacother*, **2019**; 112: 108673.
- 237) **Medhat D, El-Mezayen HA, El-Naggar ME, Farrag AR, Abdelgawad ME, Hussein J, Kamal MH.** Evaluation of urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine level in experimental Alzheimer's disease: Impact of carvacrol nanoparticles. *Mol Biol Rep*, **2019**; 46 (4): 4517-4527.
- 238) **Özbek H, Güvenalp Z, Özek T, Sevindik HG, Yuca H, Yerdelen KÖ, Demirezer LÖ.** Chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activities of the essential oil of *Origanum rotundifolium* Boiss. from Turkey. *Records of Natural Products*, **2017**; 11 (5): 485.
- 239) **Wang P, Luo Q, Qiao H, Ding H, Cao Y, Yu J, Liu R, Zhang Q, Zhu H, Qu L.** The Neuroprotective Effects of Carvacrol on Ethanol-Induced Hippocampal Neurons Impairment via the Antioxidative and Antiapoptotic Pathways. *Oxid Med Cell Longev*, **2017**; 2017: 4079425.
- 240) **Barton AJ, Harrison PJ, Najlerahim A, et al.** Increased tau messenger RNA in Alzheimer's disease hippocampus. *Am J Pathol*, **1990**; 137 (3): 497–502.
- 241) **Bolos M, Pallas-Bazarra N, Terreros-Roncal J, Perea JR, Jurado-Arjona J, Avila J, et al.** Soluble tau has devastating effects on the structural plasticity of hippocampal granule neurons. *Transl Psychiatry*, **2017**; 8: 1267.
- 242) **Cowan CM, Mudher A.** Are tau aggregates toxic or protective in tauopathies? *Front Neurol*, **2013**; 4: 114.
- 243) **Çelik Topkara K.** Çinko-Oksit Nanotabanlı Partikülleri Tarafından Uyarılan Nanotoksositeye Karşı Bazı Antioksidanların Koruyucu Rollerinin Araştırılması. **2018**. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, doktora tezi.
- 244) **Barai P, Raval N, Acharya S, Borisa A, Bhatt H, Acharya N.** Neuroprotective effects of bergenin in Alzheimer's disease: Investigation through molecular docking, in vitro and in vivo studies. *Behav Brain Res.*, **2019**; 356: 18-40.
- 245) **Nakamura S, Murayama N, Noshita T, Annoura H, Ohno T.** Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide, *Brain Res*, **2001**; 912 (2): 128-36.
- 246) **Komaki H, Faraji N, Komaki A, Shahidi S, Etaee F, Raoufi S, Mirzaei F.** Investigation of protective effects of coenzyme Q10 on impaired synaptic plasticity in a male rat model of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull.*, **2019**; 147: 14-21.
- 247) **Mehdizadeh M, Hashem Dabaghian F, Shojaee A, Molavi N, Taslimi Z, Shabani R, Soleimani Asl S.** Protective Effects of *Cyperus Rotundus* Extract on Amyloid β -Peptide (1-40)-Induced Memory Impairment in Male Rats: A Behavioral Study. *Basic Clin Neurosci.* **2017**; 8 (3): 249-254.
- 248) **Asadbegi M, Yaghmaei P, Salehi I, Komaki A, Ebrahim-Habibi A.** Investigation of thymol effect on learning and memory impairment induced by intrahippocampal injection of amyloid beta peptide in high fat diet- fed rats. *Metab Brain Dis.*, **2017**; 32(3): 827-839.
- 249) **Chonpathompikunlert P, Han J, Toh K, Isoda H, Nagasaki Y.** TEMPOL protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against β -amyloid-induced cell toxicity. *Eur J Pharmacol*, **2011**; 650 (2-3): 544-9.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kübra ÇELİK TOPKARA 1988 yılında Erzurum’da doğdu. 2005 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi, Biyoloji bölümünden 2009 yılında mezun oldu. Öğretim Üyesi Yetiştirme (ÖYP) programından 05.02.2013 tarihinde Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atandı. ÖYP kapsamında 2547 sayılı YÖK kanununun 35. maddesi uyarınca 09.10.2014 tarihinden itibaren Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görev yapmış olup 2019’da mezun oldu.

9. ORJİNALLİK RAPORU

 T.C. BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU	
02/12/2019	
AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne	
Öğrencinin Adı Soyadı:	Kübra ÇELİK TOPKARA
Numarası:	146206102
Anabilim Dalı:	FİZYOLOJİ
Lisansüstü Eğitim Düzeyi:	Yüksek Lisans ☐ Doktora ☒
Tez Başlığı:	Karvakrolün in-vitro ve in-vivo deneysel modellerde Alzheimer hastalığı üzerine olası koruyucu etkilerinin araştırılması
Yukarıda başlığı yazılı olan tez çalışmasının kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç bölümlerinden oluşan 128 sayfalık kısmına ilişkin 02/12/2019 tarihinde tarafımdan/tez danışmanıma <i>Turnitin</i> intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı "alıntılar hariç" yapıldığında % 10 "alıntılar dahil" yapıldığında ise % 10 olarak tespit edilmiştir. <i>Uygulanan Filtrelemeler:</i> 1- Kaynakça Hariç, 2- Alıntılar Hariç / Dahil 3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç. "AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması Ve Kullanılması Uygulama Esasları"nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini, aksinin tespit edileceği durumda her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim. Bilgilerinize arz ederim. Kübra ÇELİK TOPKARA <i>Kübra</i> Öğrencinin Ad Soyad ve İmza EK: 1 adet tezin tam başlığını öğrencinin ad soyad bilgisini ve tezin toplam sayfa sayısını gösterecek şekilde raporlama işlemi bittikten sonra alınmış ekran görüntüsü eklenecektir.	
TEZ DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR 02.12.2019 <i>Elees</i> Doç. Dr. Erkan KILINÇ	