MONOTERPENLERİN DENEYSEL ALZHEİMER HASTALIĞI MODELİNDE NÖRON KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Abdulkadir METE

Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Mehmet Enes ARSLAN

2025
Her hakkı saklıdır.

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MONOTERPENLERİN DENEYSEL ALZHEİMER HASTALIĞI MODELİNDE NÖRON KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Abdulkadir METE

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mehmet Enes ARSLAN

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2025

Her hakkı saklıdır

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY FORMU

MONOTERPENLERİN DENEYSEL ALZHEİMER HASTALIĞI MODELİNDE NÖRON KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Doç. Dr. Mehmet Enes ARSLAN danışmanlığında, Abdulkadir METE tarafından hazırlanan bu çalışma 30 / 05 / 2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **Oy birliği ile (3/3)** kabul edilmiştir.

Başkan	: Dr. Öğr. Üyesi Cemil BAYRAM	*İmza*	:
Üye	: Doç. Dr. Özlem ÖZDEMİR TOZLU	*İmza*	:
Üye	: Doç. Dr. Mehmet Enes ARSLAN	*İmza*	:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Doç. Dr. Bünyamin ÖZGERİŞ
Enstitü Müdürü

*Bu tez çalışması ……. tarafından ……. nolu proje ile desteklenmiştir.

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

30 / 05 / 2025

İmzası

Abdulkadir METE

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MONOTERPENLERİN DENEYSEL ALZHEİMER HASTALIĞI MODELİNDE NÖRON KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Abdulkadir METE

Erzurum Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet Enes ARSLAN

Alzheimer hastalığı, dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen, nörodejeneratif bir hastalıktır. Mevcut tedaviler, hastalığın semptomlarını hafifletmeye yöneliktir. Bu bağlamda, Alheimer hastalığının patogenezinde rol oynayan moleküler mekanizmaları hedef alan yeni terapötik ajanların keşfi önem taşımaktadır. Monoterpenler, nöroprotektif ve anti-inflamatuar özellikleri ile bilinmektedir. Ancak, bu moleküllerin Alzheimer hastalığının modellerindeki etkinlikleri ve mekanizmaları yeterince anlaşılmamıştır. Bu tez çalışmasında, monoterpenlerin $A\beta_{1-42}$ peptidi ile indüklenen insan mikroglial hücrelerinden türetilmiş HMC-3 hücre hattında etkilerini araştırarak, Alzheimer hastalığının tedavisinde potansiyel yeni yolların keşfedilmesi hedeflenmektedir. Hücre canlılığı (MTT), apoptoz ve nekroz (flow sitometri), antioksidan/oksidan denge (TAS/TOS), asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi ve genotoksisite (Hoechst boyama ve kromozomal aberasyon analizi) gibi çok yönlü biyogüvenlik ve etkinlik testleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, özellikle Isoborneol ve Eucalyptol'un Aβ kaynaklı hücresel hasar, apoptoz, oksidatif stres ve genetik bozulmalar üzerinde anlamlı düzeyde koruyucu etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu çalışma, test edilen doğal bileşiklerin Alzheimer hastalığında rol oynayan çoklu moleküler süreçlere müdahale potansiyeline sahip olduğunu göstermekte ve bu tür bileşiklerin gelecekteki terapötik yaklaşımlarda değerlendirilmesi gerektiğini önermektedir

2025, 90 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, $A\beta_{1-42}$ peptidi, Apoptoz ve nekroz, HMC-3, Monoterpen

ABSTRACT

MS. Thesis

DETERMİNATİON OF THE NEUROPROTECTİVE EFFECTS OF MONOTERPENES İN AN EXPERİMENTAL ALZHEİMER'S DİSEASE MODEL

Abdulkadir METE

Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Enes ARSLAN

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder that affects millions of people worldwide. Current treatments aim to alleviate the symptoms of the disease. In this context, the discovery of new therapeutic agents targeting the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease is of significant importance. Monoterpenes are known for their neuroprotective and anti-inflammatory properties. However, the efficacy and mechanisms of these molecules in Alzheimer's disease models remain insufficiently understood. This thesis aims to investigate the effects of monoterpenes on the HMC-3 cell line, which is derived from human microglial cells and exposed to $A\beta_{1-42}$ peptide, in order to explore new potential therapeutic pathways for Alzheimer's disease. Comprehensive safety and efficacy tests were conducted, including cell viability (MTT), apoptosis and necrosis (flow cytometry), antioxidant/oxidant balance (TAS/TOS), acetylcholinesterase (AChE) activity, and genotoxicity (Hoechst staining and chromosomal aberration analysis). The data obtained revealed that especially Isoborneol and Eucalyptol exhibited significant protective effects against Aβ-induced cellular damage, apoptosis, oxidative stress, and genetic alterations. This study demonstrates that the tested natural compounds possess the potential to modulate multiple molecular processes involved in Alzheimer's disease and suggests that such compounds should be considered in future therapeutic approaches.

2025, 90 Page
Keywords: Alzheimer's disease, $A\beta_{1-42}$ peptide, Apoptosis and necrosis, HMC-3, Monoterpene

TEŞEKKÜR

Başta, tez sürecimin her aşamasında, akademik bilgi birikimi, kıymetli görüşleri, yapıcı eleştirileri ve her daim sabırlı yaklaşımıyla bana rehberlik eden değerli danışman hocam Doç. Dr. Mehmet Enes ARSLAN'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu uzun ve zaman zaman zorlu geçen süreçte, her koşulda yanımda olan, bana duydukları inancı ve verdikleri desteği hiçbir zaman esirgemeyen, sevgi ve sabırlarıyla her daim güç bulduğum kıymetli aileme minnettarlığımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Maddi ve manevi destekleriyle, bu yolculukta attığım her adımda yanımda yer alarak bana güç verdiler. Varlıkları ve desteği benim için her zaman en büyük motivasyon kaynağı olmuştur.

Yalnızca akademik anlamda değil, manevi olarak da yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen, fikir alışverişleriyle katkıda bulunan ve motivasyonumu diri tutmamı sağlayan değerli arkadaşım Oğuzhan ERTÜFEKÇİ'ye teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca tez sürecimde ekip olarak çalıştığım, başta Abdurrahim KADI ve labotatuvar arkadaşlarıma da teşekkür ediyorum.

Tez çalışmam süresince, Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) tarafından düzenlenen 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı ile maddi destek almamı sağlayan, Bilimsel ve Teknoloji Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a teşşekür ediyorum.

Saygılarımla,

Abdulkadir METE
Mayıs 2025

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ vi
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **x**

1. GİRİŞ 1
1.1. Demans 2
1.2. Alzheimer Hastalığı 3
1.2.1. Tarihçesi ve prevalansı 5
1.2.2. Belirtileri ve evreleri 6
1.3. AH Risk Faktörleri 7
1.3.1. Genetik risk faktörleri 8
1.3.2. Çevresel risk faktörleri 10
1.3.3. Sağlık ve yaşam biçimi 11
1.4. AH Patofizyolojisi 12
1.5. AH Oluşum Mekanizmaları 14
1.5.1. Kolinerjik hipotezi 14
1.5.2. Amiloid hipotezi (Kaskad hipotezi) 16
1.5.3. Tau hipotezi 17
1.5.4. Metal iyon hipotezi 18
1.5.5. Nöroinflamasyon hipotezi 18
1. 5. 6. Oksitatif stres hipotezi 19
1.5.7. Bağırsak mikrobiyomundaki dengesizlik 19
1.5.8. Eksitotoksik hipotez 20
1.6. AH Tanısı 22
1.6.1. AH'de tanısal biyobelirteçler 24
1.6.2. AH'de kan biyobelirteçleri 25
1.7. AH İlaç Tedavisi 26
1.7.1. Kolinesteraz inhibitörleri 26

1.7.2. *N-metil* D-aspartat reseptör (NMDAR) antagonistleri 28
1.8. Deneysel AH Modelleri 29
1.8.1. *In Vivo* modeller 30
1.8. 2. *In Vitro* modeller 33
1.9. Terpenler (İzoprenoidler) 36
1.9.1. Monoterpenler 38
2. KAYNAK ÖZETLERİ 40
3. MATERYAL ve YÖNTEM 45
3.1. Materyal 45
3.2. Monoterpenlerin Biyogüvenlik Analizleri 46
3.2.1. Hücre kültürü 46
3. 2. 2 Hücre canlılık analizi 46
3. 2. 3. Nükleer anomali analizi 47
3. 2. 4. Kromozomal aberrasyon testi 47
3. 3. *In Vitro* Anti-Alzheimer Hastalığı Etkilerinin İncelenmesi 48
3. 3. 1. Akış sitometrisi ile apoptoz analizi 49
3. 3. 2. TAS ve TOS analizi 49
3. 3. 3. Asetilkolinesteraz (AchE) aktivitesinin belirlenmesi 49
3. 3. 4. İstatistiksel analiz 50
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 51
4.1. Biyogüvenlik Analizleri 51
4.1.1. Sitotoksisite analizleri 51
4.1.2. Genotoksisite analizleri 55
4.2. *In Vitro* Anti-Alzheimer Analizleri 58
4.2.1. AH modeli sitotoksisite analizleri 58
4.2 2 AH modelinde TAS ve TOS analizi 61
4.2.3. AH modelinde AChE analizi 62
4.2.4. AH modelinde Akış sitometrisi ile apoptoz analizi 63
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 70
5.1. Sonuç 70
5.2. Öneriler 72
KAYNAKLAR **74**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	**Açıklama**
ºC	Santigrat Derece
µM	Mikromolar
α	Alfa
CO2	Karbondioksit
L	Litre
M	Molar
ml	Mililitre

Kısaltmalar

AH	Alzheimer Hastalığı
Aβ	Amiloid beta peptidi
$A\beta_{1-42}$	1'den 42'ye kadar olan amiloid beta peptidi formu
Aβ(40)	40 amino asitli amiloid beta peptidi
Aβ(42)	42 amino asitli amiloid beta peptidi
APP	Amiloid Prekürsör Proteini
NFT	Nörofibriler Yumak (Neurofibrillary Tangle)
PHF	Eşleştirilmiş Sarmal Filament (Paired Helical Filament)
SF	Düz Filament (Straight Filament)
ChAT	Kolin Asetiltransferaz
VAChT	Veziküler Asetilkolin Taşıyıcısı
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
CHT1	Yüksek Afiniteli Kolin Taşıyıcısı
CNS	Merkezi Sinir Sistemi

ROS	Reaktif Oksijen Türleri
NO	Nitrik Oksit
NMDA	N-Metil-D-Aspartat
IL-1β, IL-18	İnterlökin-1 beta, İnterlökin-18 (Proinflamatuar sitokinler)
TLR	Toll-benzeri Reseptör
VKİ	Vücut Kitle İndeksi
DM	Diabetes Mellitus (Şeker Hastalığı)
CNS	Central Nervous System (Merkezi Sinir Sistemi)
Ca^{2+}	Kalsiyum iyonu
α-APP, β-sAPP	APP'nin α veya β-sekretaz ile kesilmesi sonucu oluşan formlar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. (a) sağlıklı beyin ve (b) Alzheimer hastalığı (AH) beyin ve nöronların fizyolojik yapısı..... 4

Şekil 1.2. Beyinde dağılan amiloid plakları 13

Şekil 1.3. İmmünohistokimyasal boyalar ile görüntülenmiş nörofibriler arapsaçı 14

Şekil 1.4. ACh'nin biyolojik süreci 16

Şekil 1.5. Braak evrelendirme. A (0.evreyi gösterir ve tau birikimi yoktur), B (I.evredir ve hastalığın başladığı bölge mor renkle gösterilir),C (II.evre), D (III.evre), E (IV.evre), F (V.evre) ve G (VI.evre) 18

Şekil 1.6. Eksitotoksik yol ile hücre ölümü. Yeşil oklar normal çalışan kanalları, kırmızı oklar ise aşırı uyarılan kanlları temsil eder 22

Şekil 1.7. Geliştirilen Kolinesteraz İnhibitörleri ve moleküler yapıları 27

Şekil 1.8. Memantinin moleküler yapısı 29

Şekil 1.9. Literatüredeki mevcutAH modelleri 30

Şekil 1.10. iPSC'nin farklılaşması ile oluşan beyin hücreleri 35

Şekil 1.11. Başlıca insan beyin hücre tipleri ve AH'de meydana gelen değişiklikler. A: Sağlıklı birey, B: AH birey 36

Şekil 4.1. (–)-Caryophyllene oxide molekülünün HMC-3 hücre hattındaki sitotoksisite analizleri 51

Şekil 4.2. Eucalyptol molekülünün HMC-3 hücre hattındaki sitotoksisite analizleri 52

Şekil 4.3. Isoborneol molekülünün HMC-3 hücre hattındaki sitotoksisite analizleri 53

Şekil 4.4. Linalyl acetate molekülünün HMC-3 hücre hattındaki sitotoksisite analizleri 54

Şekil 4.5. Terpen moleküllerinin HMC-3 hücre hattında, çekirdek anomalisinin Hoechst floresan boyası ile tespiti. A; (–)-Caryophyllene oxide, B; Eucalyptol, C; Isoborneol, D; Linalyl acetate, E; (-) Kontrol, F; Beta amiloid 55

Şekil 4.6. Terpen moleküllerinin HMC-3 hücre hattında, kromozom anomalisinin Giemsa boyası ile tespiti. A; (–)-Caryophyllene oxide, B; Eucalyptol, C; Isoborneol, D; Linalyl acetate, E; (-) Kontrol, F; Beta amiloid 57

Şekil 4.7. Terpen moleküllerinin Aβ1-42 ile oluşturulan AH modeli üzerindeki etkisinin HMC-3 mikroglial hücre hattında MTT testi ile değerlendirilmesi. A; (–)-Caryophyllene oxide, B; Eucalyptol, C; Isoborneol, D; Linalyl acetate 59

Şekil 4.8. Negatif kontrol grubuna ait akış sitometrisi grafiği 64

Şekil 4.9. Aβ grubuna ait akış sitometrisi grafiği 64

Şekil 4.10. Caryophyllene oxide + Aβ grubuna ait akış sitometrisi grafiği 66

Şekil 4.11. Eucalyptol + Aβ grubuna ait akış sitometrisi grafiği 66

Şekil 4.12. Isoborneol + Aβ grubuna ait akış sitometrisi grafiği 67

Şekil 4.13. Linalyl acetate + Aβ grubuna ait akış sitometrisi grafiği 67

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve marka/model listesi 9

Çizelge 3.2. Tez çalışmasında kllanılan kimyasalların listesi 12

Çizelge 4.1. Terpen moleküllerinin HMC-3 hücre hattında 24 saat (10 µM) uygulaması sonucunda incelenen nükleer anomalileri. (MN: Mikro Nükleus, aynı üslü harfler (a ve b) istatistiksel olarak benzer grupları temsil eder 30

Çizelge 4.2. Terpen moleküllerinin HMC-3 hücre hattında 24 saat (10 µM) uygulaması sonucunda incelenen nükleer anomalileri. (Aynı üslü harfler (a ve b) istatistiksel olarak benzer grupları temsil eder 30

Çizelge 4.3. Terpenlerin Aβ kaynaklı oksidatif strese karşı antioksidan etkileri 33

Çizelge 4.4. Terpenlerin Aβ kaynaklı oksidatif strese karşı oksidan etkileri 44

Çizelge 4.5. Terpenlerin Aβ kaynaklı artan AChE seviyesine etkileri 45

Çizelge 4.6. HMC-3 hücrelerinde Aβ ve terpen uygulamalarının ardından akış sitometrisi ile belirlenen canlılık, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları (%). 52

1. GİRİŞ

Dünya üzerinde insan oğlunun yaşamaya başlamasından bu yana hastalıklar her zaman var olmuş ve bu hastalıklar insanlık için hep bir tehdit olarak görülmüştür. Geçen yüzyıllar ve değişen dünya üzerinde bu tehdit ile başa çıkma yolları aransa da, yeni hastalıklar her zaman var olmuş ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilmiştir. Geliştirilen tedavi yöntemleri her zaman olumlu sonuç vermese de, çoğu alanda umut vadeden çalışmalar bulunmaktadır (Dar et al., 2017). Bu çalışmalardan revaçta olanlardan biri demans grubudur. Demans, insanda bir dizi nörolojik bozuklukla ortaya çıkan hastalıkları kapsayan grubun adıdır. Bu nörolojik bozukluklar genel anlamda nöron hücre hasarı, nöron hücre kaybı, plak oluşumu ve oksidatif stres örnek olarak verilebilir. Demans grubu içerisinde en yaygın olarak bulunan hastalık Alzheimer'dır. Alzheimer hastalığı (AH), beyinde tau proteinlerinin sebep olduğu nörofibriler yumaklar ve beta-amiloid plak birikimi ile karakterize edilir. Bu birikim beyni küçülmeye (atrofi) götürürken hücrelerin ölümü kaçınılmaz olur. Alzheimer hastalığının kesin bir tedavisi yoktur. Bununla birlikte, hastalığın semptomlarını azaltmak ve hasta bireylerin yaşam kalitesini artırmak için kullanılan ilaçlar mevcuttur (Breijyeh & Karaman, 2020).

İlk çağ insanları, hastalıklar için şifanın doğada olduğu kanısına varmıştır. Bu sayede insanlık, bitkileri hastalıkların tedavisinde kullanmış ve mevcut durumda da etkisini görmüştür. Her ne kadar günümüz teknolojisi gelişmiş olsa da, hastalıklar için yeni tedavi yaklaşımları genellikle alternatif tıp adı verilen ve bitki temelli tedavi yöntemlerinden faydalanmaktadır. Bitkilerle yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler her zaman olumlu sonuçlar vermese de, piyasada bulunan ilaçların birçoğunda bitkilerden elde edilen etken maddeler kullanılmaktadır (Gezici & Koçum, 2021). Günümüze kadar yapılan bitki çalışmalarıyla bitki içerikleri çözülmüş ve etken maddeleri ortaya konulmuştur. Etken maddeler, bitkilerde bulunan ve bitkinin kendi sentezlediği kimyasallar olarak adlandırılmıştır. Bu kimyasallar, yapılarındaki gruplara, etki ettiği mekanizmalara ve bitkide sentezlendiği bölgeye göre sınıflandırılmaktadır. Sınıflandırılan bu kimyasal gruplardan bir tanesi olan terpenler, bitkilerde bulunan ve organik yapıda olan kimyasallardır (Cox-Georgian et al., 2019). Farklı mekanizmalar ile

bitki tarafından sentezlenirler ve genel olarak uçucu madde şeklinde izole edilirler. (Gershenzon ve Dudareva, 2007).

1.1. Demans

Demans (nörodejeneratif hastalık), bir bireyin günlük yaşam akışında yaptığı bilişsel aktivitelerde (hafıza, düşünme, karar verme vs.) önemli bir bozulma ile tanımlanan ve içerisinde birden fazla hastalık barındıran grubun genel adıdır. Bu bozulma, büyük ölçüde halk sağlığı sorunu oluştursa da sağlık hizmetleri artırılarak bu durumun önüne geçilmeye çalışılmıştır (Elçi, 2024). Ayrıca, yaş ile doğru orantılı olarak 65 yaş üstü bireylerde daha sık görülmektedir (Kulaç Ersen, 2024). Alzheimer hastalığı (AH), Vasküler demans, Lewy cisimcikli demans, Parkinson, ve Multipl Skleroz (MS) demans hastalık grubu içerisinde yaygın olarak görülen hastalıklardır (Prasad Pathak,2018).

Vasküler demans, kan damarlarının beyin fonksiyonlarını bozması ile ortaya çıkmaktadır. Bu durum sonucunda ortaya çıkan ilk belirtiler dil problemleri, bellek kaybı, kaslarda güç kaybıdır. Devamında ise belirtiler şiddetlenerek bilişsel problemler, idrar kaçırma ve uyku problemleri ortaya çıkmaktadır. Yapılan araştırmalar ile hastalık için bazı risk faktörleri belirlenmiştir. Bunlar yüksek tansiyon, şeker hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar ve kolestrol gibi hastalıklardır. Bu hastalıkların ortak sonucu olarak kan damarları etkilenebilir ve çeşitli tıkanıklıklar oluşabilir. Bu durum da vasküler demansı tetikleyebilmektedir. Hastalığın kesin bir tedavisi yoktur. Fakat semptomları azaltıcı ilaçlar, düzenli terapiler ve hastanın yaşam tarzı kalitesini arttırmak için düzenlemeler mevcuttur (Dang et al., 2024). Lewy cisimcikli demans, Alzheimer ve Parkinson hastalığının semptomlarını paylaşan ve sinir sistemi hücrelerinde küçük ve yuvarlak yapıdaki proteinlerin birikmesi ile ortaya çıkan hastalıktır. Haraket ve duruş bozukluğu, denge problemleri hastalık için belirleyici semptomlardır. Henüz hastalığı tetikleyen etmenler net olarak aydınlatılamamıştır. Ayrıca kesin bir tedavisi bulunamamıştır (Prasad Pathak, 2018).

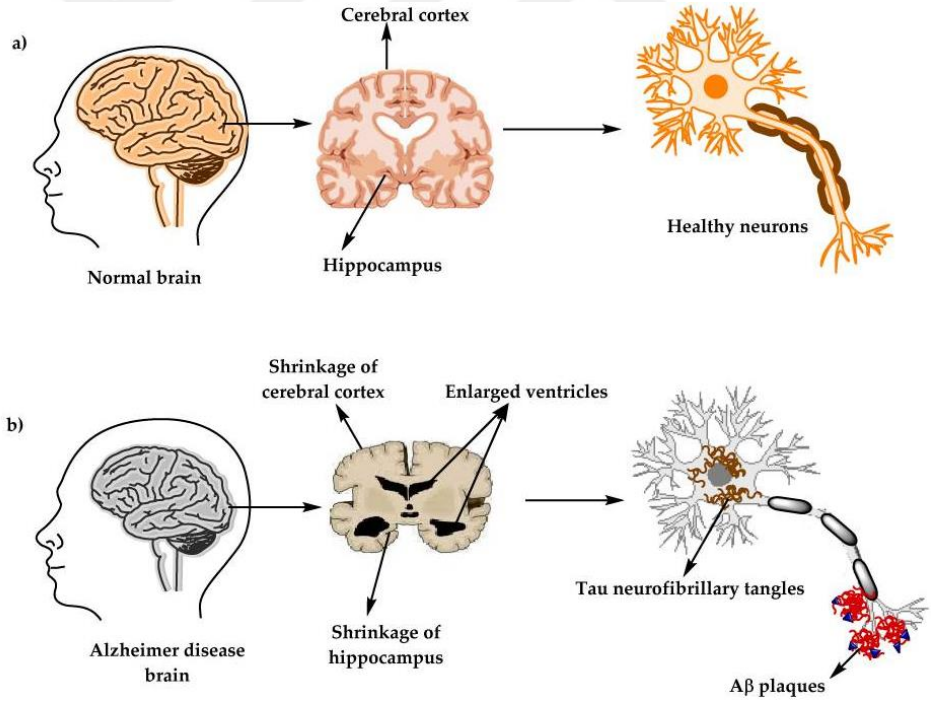
Multipl Skleroz (MS), bağışıklık hücrelerinin beyinde miyelin kılıflara saldırması ile oluşan plaklarla karakterizedir. Oluşan miyelin hasarı beyin ve vücut arasındaki

bağlantıları bozar ve bu durum bir dizi nörolojik bozukluğa sebep olur. Ailesel yatkınlık ve çevresel etmenlerin MS hastalığı için bir tetikleyici olduğu düşünülmektedir (Filippi et al., 2024). Parkinson hastalığı, dopaminerjik nöronların kaybı ile ortaya çıkan motor sistemindeki bozukluklar ile tanımlanmaktadır. Dopamin, nörotransmitter bir maddedir ve bireyin düzgün ve kontrollü haraket etmesini sağlar. Sabit durumda titreme, yutme ve çiğnemede güçlük, konuşmada zorluk ve bağırsak sorunları hastalık için ana belirtileri oluşturmaktadır. Hastalık için kesin bir tedavi mevcut değildir. Tedavi süreci bireyin semptomlarına göre belirlenir (Cramb et al., 2023). Demasn hastalık grubunun en yaygın görülen hastalığı AH'dır. AH sinir sistemi hastalığıdır ve dünya genelinde çok fazla kişiyi etkilemektedir. Mevcut durumda hastalık için kesin bir tedavi yöntemi bulunamamıştır. Fakat bazı semptomlar ve bozuklukları kontrol altına almak ve hafifletmek için kullanılan tedaviler mevcuttur (Zetterberg & Bendlin, 2021).

1.2. Alzheimer Hastalığı

Sağlıklı bir yetişkin beyni milyarlarca nöron barındırır. Bu nöronlar, beyin dokusunu oluşturan ve uzun, dallanmış uzantılara sahip hücrelerdir. Bu uzantıların önemi, nöronlar arasında iletişimi sağlamalarıdır. Uzantılar haberleşme ve iletişim için önemli olsa da, birbirlerine değmezler ve aralarında her zaman bir boşluk bulunur. Bu boşluk, sinaps olarak adlandırılır. Bir mesaj iletileceği zaman, uzantılar arasındaki boşlukta kimyasal sinyaller oluşur ve sinaps, bu işlem için bir bağlantı noktası işlevi görür. Sinapslar sayesinde sinyaller beyinde hızla dolaşır ve bu sinyaller, anılar başta olmak üzere duygular, duyumlar, hareketler ve becerilerin temelini oluşturur. Alzheimer hastalığı (AH), bu işlevleri tersine çevirerek sinyal iletiminde bozulmalara ve aksaklıklara yol açar (Alzheimer's Association, 2024). AH, beyinde nöron hasarı ve kaybıyla sonuçlanan, kademeli, yavaş ilerleyen ve geri dönüşü olmayan nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalık genellikle hipokampus bölgesinde başlar ve zamanla beynin diğer bölgelerine yayılır. Beyindeki değişiklikler incelendiğinde, temel olarak iki yapı dikkat çekmektedir. Birincisi, hücre dışında biriken senil plaklardır (SP). Bu plaklar, amiloid β (Aβ) peptidlerinin anormal birikmesiyle oluşur. İkincisi ise hücre içinde biriken nörofibriler yumaklardır (NFT). Bu yumaklar, hiperfosforile tau proteinleri (pTau) sayesinde oluşmaktadır (Perluigi et al., 2023; Frisoni et al., 2022). Bu yapıların varlığına ilişkin iki temel görüş bulunmaktadır. Birinci görüş, nöropatolojik yapıların AH için

tetikleyici bir etkiye sahip olduğunu savunur. İkinci görüş ise bu yapıların çözülememiş hücresel mekanizmaların bir sonucu olduğunu ileri sürer. Her iki durumda da hücresel düzeyde biriken nöropatolojik yapılar, sinyal iletimini engelleyerek nörodejenerasyona, yani nöron kaybına neden olmaktadır (Everett et al., 2024). Bu iki temel durumun dışında beyinde meydana gelen diğer bazı değişiklikler, zamanla azalan beyin hacmi (atrofi) ve asetilkolin seviyesindeki azalmadır. Atrofi, yaşlı bireylerde gözlemlenebilen ve normal kabul edilen bir durum olsa da, AH olan bireylerde çok daha hızlı ilerlemektedir. Asetilkolin, nöronlar arasındaki iletimi sağlayan bir nörotransmitterdir. Bu molekülün etkisi, asetilkolinesteraz (AChE) enzimi tarafından sonlandırılır. Ancak AH'de AChE seviyesi normalin çok üzerine çıkar ve asetilkolini sürekli olarak parçalar. Bu durumun bir sonucu olarak, nöronlar arasındaki iletişim ciddi şekilde bozulur. Ayrıca, nöronların çalışması için gerekli enerjiyi sağlayan glikoz metabolizması da işlevini yitirmeye başlar ve hücreler ek bir tehlike altına girer (Alzheimer's Association, 2024; Singh et al., 2013).



Şekil1.1. (a) sağlıklı beyin ve (b) Alzheimer hastalığı (AH) beyin ve nöronların fizyolojik yapısı (Breijyeh & Karaman, 2020).

1.2.1. Tarihçesi ve prevalansı

Alzheimer hastalığını klinik olarak ilk tanımlayan kişi Alois Alzheimer'dir. Alois Alzheimer, 14 Haziran 1864 yılında Almanya'da dünyaya gelmiş ve 1888 yılında Tübingen Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun olmuştur (Pérez-Trullén, 2013). Uzmanlığını psikiyatri ve nöropatoloji alanlarında yapmıştır. Akabinde Frankfurt Psikiyatri Hastanesi'nde çalışmaya başlamıştır. Alzheimer, 1901 yılında hastanede yatmakta olan Auguste Deter ile karşılaşmış ve Auguste D.'ye hastaneye yattığı andan itibaren yakından ilgi göstermiştir. Auguste D., bellek ve uyku bozukluğu, paranoyak davranışlar, saldırgan tavırlar ve kafa karışıklığı gibi şikâyetlerle hastaneye başvurmuştur. Semptomlar zamanla ilerlemiş ve şiddetlenmiş, bu nedenle hasta artık bakıma muhtaç hale gelmiştir. Sonunda Auguste D., 1906 yılında hayatını kaybetmiştir (Tagarelli et al., 2006). Auguste D.'nin vefatının ardından Alois Alzheimer, hastanın beynini morfolojik ve histolojik olarak incelemiştir. İnceleme sonucunda, hastanın korteks yapısının normale göre daha ince olduğunu, senil plak birikimi bulunduğunu ve gümüş boyama yöntemiyle nörofibriler yapıların varlığını keşfetmiştir. Elde ettiği bulgulardaki nörofibriler yapılar daha önce hiçbir hastalık için tanımlanmamıştı. Bu nedenle, Alzheimer bu durumun yeni bir hastalıkla ilişkili olduğunu 1907 yılında yayınladığı makalesinde ortaya koymuştur. Alzheimer için bu yeni hastalığın tanımı "Senil Beyin Hasarı" olmuştur (Dar et al., 2017). Ancak 1910 yılında, Alzheimer'in yanında çalışan Emil Kraepelin bu hastalığı "Alzheimer Hastalığı" olarak adlandırmıştır (Tagarelli et al., 2006). Alois Alzheimer, 19 Aralık 1915'te kalp yetmezliğinden hayatını kaybetmiştir. Yaşadığı dönemde yaptığı araştırmalar çok fazla ilgi görmemiş olsa da, vefatının ardından ve günümüzde Alzheimer hastalığı en çok çalışılan nörodejeneratif hastalık haline gelmiştir. Ayrıca Alzheimer'ın keşfettiği bulgular, hâlen hastalığın tanısında belirleyici kriterler olarak kullanılmaktadır (Toodayan, 2016).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2022 yılı verilerine göre, dünya genelinde yaklaşık 55 milyon demanslı hasta bulunmaktadır (Tahami Monfared et al., 2022). Alzheimer hastalığı (AH), demans grubu içerisinde en yaygın görülen hastalıktır. Tüm demans vakalarının yaklaşık %70'ini oluşturmaktadır (Castellani et al., 2010). Önceki veriler incelendiğinde, küresel demans prevalansı 1990 yılında 20,3 milyon iken, bu sayı 2016 yılında 43,8 milyona ulaşmıştır. Bu artış, %116 oranında, yani iki kattan fazla bir

artışa işaret etmektedir. Bu veriler doğrultusunda, 2050 yılı için demanslı hasta sayısının yaklaşık 150 milyon olması öngörülmektedir (Perveen et al., 2022). Alzheimer hastalığı, bazı istisnalar dışında yaşa özgü bir insidans oranına sahiptir. Bu oran, 65 yaş altı bireylerde yıllık yaklaşık %1 iken, 65 yaş ve üzeri bireylerde %10'a, 85 yaş ve üzerindekilerde ise %40'a kadar çıkmaktadır (Qiu et al., 2009). Dünya nüfusu yaklaşık 8 milyar kişiden oluşmaktadır. Bu nüfus içinde yaklaşık 47 milyon kişi Alzheimer hastasıdır. Kabaca bir hesapla, dünya nüfusunun yaklaşık %0,59'u Alzheimer hastasıdır. Ayrıca geçmiş ve güncel veriler karşılaştırıldığında, hastalığın hızla arttığı ve 2030 yılında hasta sayısının yaklaşık 75 milyona, 2050 yılında ise 132 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (Gulisano et al., 2018; Martin Prince et al., 2015). Türkiye'de ise bu durum, 2021 yılında Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) tarafından yayımlanan raporla ortaya konulmuştur. Rapora göre, 2015 yılında Alzheimer hastalığı nedeniyle hayatını kaybeden bireylerin sayısı yaklaşık 12 bin iken, yalnızca dört yıl içinde bu sayı yaklaşık 13.5 bine yükselmiştir (Elçi, 2024).

1.2.2. Belirtileri ve evreleri

Alzheimer hastalığı (AH), tipik olarak yaşlılık hastalığı şeklinde tanımlanır. Hastalık, genel olarak beyin dokusunun hipokampus, ön beyin ve serebral korteks bölgelerinde meydana gelir. Hastalığın ilk belirgin özelliği olarak yakın tarihli bellek kaybı görülürken, yeni bilgi öğrenme zorluğu da artmaktadır. Bu durumun ardından konuşma güçlüğü, uzak tarihli hafıza kaybı, düşünme ve problem çözme becerilerinde azalma, dikkat eksikliği ve akıl yürütme sorunları da ortaya çıkmaktadır. Bu süreç, bireyin günlük yaşam kalitesini etkileyerek yön bulamama ve tanıdığı insanları hatırlayamama gibi sorunlara neden olur. Tüm bunların sonucunda ise birey, kontrol ve bakıma muhtaç hale gelir. Alzheimer hastalığı; preklinik, erken (hafif), orta ve geç (ileri) evrelerden oluşmaktadır (Kumar et al., 2024).

AH belirtileri, hastalığın hangi evresinde olunduğuna bağlı olarak değişir. Preklinik evrede, birey kısa süreli bellek bozukluğu yaşar. Bu aşamada uzun süreli bellek korunur; ancak birey, hafif de olsa her zaman yürüttüğü işlerde aksama, günlük problemleri çözememe ve motivasyon eksikliği yaşayabilir. Erken evrede ise artık semptomlar artmakta, dil bozuklukları ortaya çıkmakta ve durumun ilerlemesiyle bilişsel

bozukluklar kendini göstermektedir. Birey bu aşamada AH teşhisi alarak hasta olduğunu öğrenir. Hastalığın son evresi olan ilerleyici evrede ise davranış, hareket, uyku ve koku alma bozuklukları görülürken; bu semptomları halüsinasyonlar, idrar kaçırma ve ciddi nöbetler takip eder. Alzheimer hastalığı, "sinsi bir hastalık" olarak tanımlanır; çünkü hastalık oldukça sessiz gelişir ve yavaş ilerler. Çoğu hastada preklinik evrede ortaya çıkan semptomlar genellikle fark edilmez. Bu yüzden tedaviye başlama süreci gecikir. Bir birey hafif semptomlar yaşasa bile, bu durumu yakınlarından yardım alarak atlatmaya çalışır. Alzheimer hastalığı ilerleyici bir hastalık olduğundan semptomlar yavaş da olsa artmaya ve şiddetlenmeye devam eder. Bu durumun ne zaman kötüleşeceği veya ne kadar sürede ilerleyeceği kişiden kişiye değişmektedir. AH ile yaşayan bireyler değişken ruh halleri, kişilik bozuklukları veya davranışlarda ciddi değişiklikler yaşayabilir. Bu nedenle, hasta bireyler kendi başlarına yaşamlarını sürdüremezler (Alzheimer's Association, 2024).

1.3. AH Risk Faktörleri

Alzheimer hastalığı (AH), çoğu durumda yaşa bağlı olarak gelişen bir hastalıktır. Hasta bireyler genellikle 65 yaş ve üzerindedir. Bu yaşın üzerindeki bireylerde gelişen AH için en büyük risk faktörü yaşlanmadır. Ancak hastalığın yalnızca yaşla ilişkili olmadığı, birden fazla faktörden etkilendiği ve yaşlanmanın tek başına hastalığa sebep olmadığı ortaya konmuştur (Breijyeh & Karaman, 2020). Bu faktörlerin sayıca fazla olması nedeniyle genel olarak üç kategori altında sınıflandırma yapılmıştır. İlk olarak, genetik faktörler karşımıza çıkmaktadır. Bu kategoride amiloid öncü proteini (APP), Presenilin 1 ve 2, Trizomi 21 (Down sendromu) ve Apolipoprotein E4 (APOE4) yer almaktadır. İkinci kategori çevresel faktörlerdir; kafa travmaları, ağır metallere maruziyet, hava kirliliği, alkol ve sigara kullanımı bu gruba örnek verilebilir. Üçüncü kategori ise sağlık ve yaşam biçimiyle ilgilidir. Yaşam tarzı, obezite ve diyabet, fiziksel aktivite düzeyi ve kardiyovasküler hastalıklar bu kapsamda değerlendirilmektedir. Bu sınıflandırmalar, AH'yi daha iyi anlamak ve yorumlamak amacıyla yapılmıştır. Genetik faktörler, değiştirilemez risk faktörleri olarak kabul edilir. Diğer risk faktörleri değiştirilebilir olmakla birlikte, hastalık tamamen engellenemez ve durdurulamaz bir süreçtir (Yildirim & Eke, 2024).

65 yaşından önce başlayan AH, "Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı" (EBAH), 65 yaşından sonra başlayan ise "Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı" (GBAH) olarak adlandırılır. Bu iki alt tip, farklı genetik faktörler tarafından etkilenmektedir. EBAH formu için üç gen mutasyonu tanımlanmıştır: amiloid öncü proteini (APP), Presenilin 1 (PSEN1) ve Presenilin 2 (PSEN2). Bu genler sırasıyla 21., 14. ve 1. kromozomlarda lokalizedir (Bateman et al., 2011; Mohsenzadegan & Mirshafiey, 2012). Yapılan çalışmalar, erken başlangıçlı AH'nin tüm Alzheimer vakalarının yaklaşık %10'unu oluşturduğunu ve bu vakalarda genlerde otozomal dominant mutasyonların bulunduğunu göstermektedir. Ancak, bu mutasyonlar erken başlangıçlı vakaların çoğunda tespit edilememiştir (Campion et al., 1999). GBAH ise 19. kromozom üzerinde lokalize olan Apolipoprotein E4 (APOE4) mutasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Her iki form da amiloid plak oluşumuna neden olmakla birlikte, EBAH genellikle daha şiddetli ve agresif seyirlidir (Bateman et al., 2011).

Bu sınıflandırmalar dışında kalan bazı risk faktörleri de mevcuttur. Bunlardan biri cinsiyettir. 2011 yılında Brookmeyer ve arkadaşlarının yaptığı araştırma, Alzheimer hastalığına sahip bireyler arasında kadınların sayıca daha fazla olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgular, 2013 yılında Thies ve Bleiler'in çalışmasıyla desteklenmiştir. Çalışmada, 65 yaş üstü bireylerde Alzheimer'a yakalanma riskinin cinsiyete göre değiştiği belirlenmiştir. Değerlendirmeye göre, her altı kadından biri Alzheimer riski altındayken, bu oran erkeklerde her on bir kişide birdir. Sonuç olarak, cinsiyet faktörü de AH için değiştirilemez bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (Zhao et al., 2015).

1.3.1. Genetik risk faktörleri

Aβ peptidi oluşumunda *amiloid öncü proteini (APP)* önemli bir yere sahiptir. İnsan 21. kromozomun uzun kolunun 21. bölgesinde 3. bant üzerinde bulunan ve 290 kilobaz uzunluğundaki *APP* geni ile kodlanmaktadır (Yoshikai et al., 1990). *APP* geni 18 ekzon içerir ve temel olarak 3 tip izoformu vardır. Bu izoformlar *APP695*, *APP751* ve *APP770*'dir. Tüm dokularda bulunmasına ve ifade edilmesine rağmen beyin dokusunda *APP695* izoformu zengin bir şekilde bulunur. APP büyük bir proteindir ve kesilmeye ihtiyaç duyar. *APP*'nin kesiminde temel olarak 2 enzim görev alır. Bunlar APP'nin farklı şekillerde kesilmesini sağlayan α-sekretaz ve β-sekretaz enzimleridir. Bu enzimler

APP'yi küçük parçalara ayırsa da γ-sekretaz enzimi ile tekrar ikinci bir kesim yapılır. APP'nin birinci kesimi α-sekretaz ile yapılır ise γ-sekretaz ile yapılan ikinci kesimde p3 peptidi oluşur. Bu yol, AH ile ilişkili olan Aβ peptidini oluşturmaz. Eğer APP'nin birinci kesimi β-sekretaz ile yapılırsa γ-sekretaz ile yapılan ikinci kesimde Aβ peptidini oluşturan Aβ40 ve Aβ42 oluşur (Vitória et al., 2022).

PSEN1 geni ve protein yapısı üzerine yapılan çalışmalar, EBAH'ı anlamak ve yorumlamak için önemli bir yere sahiptir. *PSEN1* geni otozomal dominant formda EBAH için en yaygın neden olarak görülmektedir. Gen üzerinde gerçekleşen mutasyonlar otozomal dominant formdaki EBAH vakalarının büyük bir kısmını oluşturmaktadır. *PSEN1*, 14. kromozomun uzun kolunda bulunan 24. bölgenin 2. bandında (*14q24.2*) bulunur. İçerisinde 12 ekzon barındırır ve 200'den fazla mutasyon ile ilişkilendirilir. Yapılan fare çalışmalarda *PSEN1* işlevsiz bırakılmış (genetik nakavt) *PSEN1* proteininin aktivitesi engellenmiştir. *PSEN1*'den yoksun farelerde belirgin bir şekilde bellek bozukluğu ve nörodejenerasyon raporlanmıştır (Dai et al., 2018). Diğer yandan *PSEN1* mutasyonları γ-sekretaz enziminin çalışması ile ilişkilendirilir. Bu ilişki beyinde oluşan Aβ'nın bir çeşidi olan Aβ42'nin artması ile desteklenmiştir (Kelleher & Shen, 2017).

PSEN1 ile yaklaşık olarak %60 homolojiye sahip olan ve EBAH ile ilişkili olan diğer gen *PSEN2*'dir. *PSEN2*, 1. kromozomun uzun kolunda bulunan 42. bölgenin 13. bandında (*1q42.13*) bulunur. İki izoformu vardır ve otozomal dominant formda AH ile ilişkilidir. 12 ekzonu bulunur ve yaklaşık 40 nadir mutasyon ile ilişkilendirilir. Her ne kadar yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar tartışmalı olsa da *PSEN2*'nin apoptozda rol aldığı ve *PSEN2* varlığında canlılığın azaldığı ortaya koyulmuştur. *PSEN1*'e benzer bir şekilde *PSEN2* de γ-sekretaz aktivitesini artırarak Aβ'nın bir çeşidi olan Aβ42'nin artmasına yol açmıştır (Cai et al., 2015; Dai et al., 2018).

GBAH ile ilişkili olan *APOE4*, apolipoprotein E'nin (*ApoE*) 3 yaygın izoformundan biridir. *ApoE* proteini bazı mikroglialar ve astrositlerde (karaciğer ve beyin) yüksek oranda eksprese edilen glikoproteindir. Başta kolesterol olmak üzere lipoproteinler için endositoz ligandı görevi görmektedir. Bu da beynin normal fonksiyonları ve miyelin kılıf üretimi için oldukça önemlidir. *ApoE* geni 19. kromozom üzerinde bulunur ve kodlanan dizide tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP'ler) sebep olduğu 3 izoforma sahiptir. Bu

izoformlar *ApoE2*, *ApoE3* ve *ApoE4*'dür. *ApoE*'nin alt tipi olan *ApoEε4* aleli yaşlanma ile ortaya çıkan Aβ birikiminde rol oynamaktadır (Breijyeh & Karaman, 2020a; J. Kim et al., 2009).

Alzheimer hastalığı %5 ihtimal ile ailesel formda görülmektedir. Erken ve geç başlangıç Alzheimer formları genellikle ailesel yatkınlık ile ilişkilendirilir. *APP*, *PSEN1-2* ve *ApoE* genleri hastalık için her ne kadar kilit bir öneme sahipse de tam olarak aydınlatılamamıştır (Mohsenzadegan & Mirshafiey, 2012). Sözü edilen genler dışında AH için birkaç gen daha tanımlanmıştır. Bu genler; ATP Ciltleme Kaset Taşıyıcı A1 (*ABCA1*), Clusterin (*CLU*), Köprüleme Entegratörü 1 (*BIN1*) ve Östrojen Reseptör Geni'dir (*ESR*) (Breijyeh & Karaman, 2020).

Down sendromu, zihinsel engellilik ile sonuçlanan ve en yaygın görülen kromozomal anomaliktir. 3 farklı genotip çeşidi vardır. Birinci genotip çeşidi en yaygın olarak bilinen 21. kromozomun 3 kopyasının olmasıdır. Bu durum tüm hücrelerde 3 adet tam kopya kromozom barındırdığı için serbest trizomi 21 olarak adlandırılır. İkinci genotip çeşidi, mozaik Down sendromudur. Burada anormallik tüm hücrelerde değil, sadece bazı hücreler 21. kromozom için trizomiktir. Üçüncü genotip çeşidi ise translokasyon trizomidir. Buradaki anormallik ise 21. kromozomun sadece bir kısmının fazla kopya sayısına sahip olmasıdır. Down sendromu, kromozom 21 için uzun kolda bulunan bazı bölgeler ile ilişkilendirilmiştir. Bu bölgelerdeki kopya sayısındaki fazlalık yanlış bölünme kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Zigman et al., 2008). Down sendromlu hasta bireylerin çoğu *EBAH* ile ilişkilendirilir. Çünkü *APP*, AH için kritik bir öneme sahip bir proteindir. Bu protein, AH için ana belirteç olan Aβ birikimi ile doğrudan ilişkilidir. *APP*, 21. kromozomda lokalize olmuştur ve normal bireylerde 2 adet kopya bulunmaktadır. Fakat Down sendromlu bireylerde bu kopya sayısı 3'tür ve yapılan fare çalışmalarında fazla kopya sayısının doğrudan Aβ birikimi ile ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur (Wiseman et al., 2018)

1.3.2. Çevresel risk faktörleri

Hava kirliliği, dikkat edilmesi gereken en yaygın çevresel tehditlerden biridir. Doğal atmosferik özellikleri değiştiren ve insan sağlığı ile refahı olumsuz yönde etkileyen

kirleticilerin havaya karışması ile tanımlanır. Toksisite çalışmalarında elde edilen bulgular, hava kirliliğine uzun süreli maruziyetin koku bölgelerinde hasara yol açtığını göstermektedir. Bu bağlamda en çok zarar gören bölge, frontal kortekstir. Kentsel hava kirliliğine maruz kalan bireylerde, frontal kortekste Aβ birikiminin gözlemlendiği raporlanmıştır. Alzheimer hastalığı (AH), birden fazla faktörün bir araya gelmesiyle gelişmektedir. Ancak hava kirliliği, hastalığın gelişiminde önemli bir risk faktörüdür (Moulton & Yang, 2012).

Sigara ve alkol kullanımı da AH ile ilişkilendirilen faktörler arasındadır. Geçmişte yapılan bazı çalışmalarda, sigaranın hammaddesi olan nikotinin Aβ oluşumunu engellediği ileri sürülmüştür. Ancak bu görüş zamanla sorgulanmış ve yeni çalışmalarla güncellenmiştir. Güncel bulgular, sigara kullanımının kardiyovasküler hastalıklar, kronik akciğer hastalıkları ve çeşitli kanser türleri için güçlü bir risk faktörü olduğunu göstermektedir. Ayrıca, sigara kullanımının beyindeki Aβ birikimi ile doğru orantılı olduğu ve sigara içen bireylerin içmeyenlere kıyasla AH'ye yakalanma riskinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Durazzo et al., 2014; Yıldırım & Eke, 2024). Alkolün kötüye kullanımı da AH başta olmak üzere demans riskini artırmaktadır. Araştırmalar, alkol kullanan bireylerin demansa yakalanma riskinin daha yüksek olduğunu ve bu durumun, alkoldeki nörotoksinlerin beyinde oluşturduğu olumsuz etkilerle ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Zahr, 2024).

1.3.3. Sağlık ve yaşam biçimi

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH), AH ile benzer şekilde yaşla ilişkili olup ortak risk faktörlerini paylaşırlar. Her iki hastalık da dünya genelinde önde gelen ölüm nedenleri arasındadır. KVH'nin temel nedenleri arasında kalp hastalıkları, kalp yetmezliği, hipertansiyon ve inme yer alır (Santos et al., 2017). Bu hastalıklar birbirleriyle bağlantılıdır ve nörodejeneratif etkileri artırmaktadır. Söz konusu etki mekanizmaları ise kısmen aydınlatılmıştır (de Bruijn & Ikram, 2014). Obezite, bireyin ihtiyaç duyduğundan fazla kalori alması sonucu vücutta aşırı yağ birikmesi durumudur ve vücut kitle indeksi (VKİ) kullanılarak değerlendirilir. Orta yaşta gelişen obezite, demansla ilişkilendirilmiştir. Yağ dokularından salgılanan bazı hormonlar demans riskini artırmakta; aşırı vücut yağı ise beyne giden kan akışını azaltmaktadır (Anjum et al., 2018).

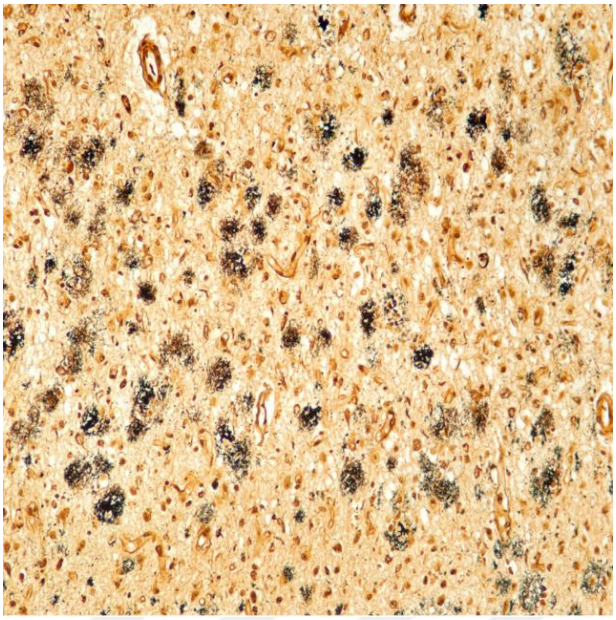
Ayrıca yapılan bir çalışmada, kilo kaybının gerçekleşmediği obez bireylerde beyin atrofisine neden olabileceği gösterilmiştir (Pegueroles et al., 2018). Diyabet (Diabetes mellitus), vücutta yüksek kan şekeri (hiperglisemi) ile karakterize edilen ve insülin hormonunun işlev bozukluğuyla gelişen kronik bir hastalıktır. İnsülin, glukoz homeostazını düzenleyerek normal metabolik dengeyi sağlar (AbuHammad et al., 2023). Fare modelleri, insülinin beynin hipotalamus bölgesinde glukoz sensörü olarak işlev gördüğünü öne sürmektedir. Diyabetin demans riskini artırdığı bilinmektedir; ancak diyabet ile ilişkili demans prevalansı hâlâ net olarak tanımlanmamıştır (Lee et al., 2018).

Diyabet, Tip 1 ve Tip 2 olmak üzere iki ana formda görülmektedir. AH hastalarında gözlenen insülin sinyal bozuklukları, hastalığın bazen "Tip 3 diabetes mellitus" olarak adlandırılmasına neden olmuştur. Klinik ve epidemiyolojik çalışmalar, diyabet hastalarının AH'ye yakalanma olasılığının diyabeti olmayanlara göre daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Tekin et al., 2023).

1.4. AH Patofizyolojisi

Alzheimer hastalığı, patolojik olarak ilk kez Alois Alzheimer tarafından tanımlanmış olup, bu tanımlama 1907 yılına kadar uzanmaktadır (Breijyeh & Karaman, 2020). Patofizyolojik olarak incelendiğinde, Alzheimer hastalığı anormal amiloid plak birikimi ve nörofibriler yumaklarla karakterizedir. Bu patolojik bulgular, genellikle ön beyin ve neokorteks bölgelerinde yer alan kolinerjik nöronların kaybıyla sonuçlanır (Kumar et al., 2015).

Aβ (β-amiloid) peptidi, nöronların hücre zarlarında kolesterol bakımından zengin bölgelerde üretilerek, hücre dışı boşluğa salgılanır. Salgılanan Aβ peptidi çeşitli uzunluklarda bulunmakta olup, bu uzunluk γ-sekretaz enziminin kesim hassasiyetine bağlı olarak değişmektedir. Hem sağlıklı bireylerde hem de Alzheimer hastalarında en yaygın görülen form, 40 amino asitli Aβ(40)'tır. Bunun yanında, 42 amino asitli Aβ(42) formu da sıklıkla gözlemlenir. Bu peptitler zamanla birikme eğilimi gösterir ve çapraz β bağları oluşturarak başta amiloid fibriller olmak üzere çeşitli agregat yapılarla ilişkilendirilir (Friedrich et al., 2010).



Şekil 1.2. Beyinde dağılan amiloid plakları (Castellani et al., 2010)

Tau proteini, nöron hücrelerinde bulunan ve mikrotübül bağlanma özelliği taşıyan bir proteindir. Temel görevi mikrotübüllerin stabilizasyonunu sağlamaktır. Mikrotübüller, nöronlar arasında besin ve sinyal iletiminden sorumludur ve bu nedenle stabil yapıda kalmaları büyük önem taşır. Normal koşullarda tau proteini çeşitli kinazlar tarafından fosforilasyona uğrar; yani protein yapısına fosfat grubu eklenir. Bu süreç, tau proteininin işlevsel düzenlenmesi açısından gereklidir. Ancak, fosforilasyonun anormal derecede artması, nörofibriler yumak (NFT) oluşumunu tetikleyen önemli bir etkendir. Çünkü aşırı fosforile tau, mikrotübüllere bağlanma yetisini kaybeder ve stabilizasyon görevini yerine getiremez (Hamlin et al., 2024). Mikrotübüllerin destabilize olmasının yanı sıra, fosforile tau proteinleri birikmeye başlar. NFT oluşumu üç aşamalı bir süreçte ilerler. İlk aşama olan "pre-tangle" aşamasında, anormal şekilde fosforile tau proteinleri hücre çekirdeğinin çevresinde granüller hâlinde birikir. Bu granüllerin, nöron hücresinin dengesizliğe karşı bir savunma mekanizması olup olmadığı henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Sürecin ilerlemesiyle birlikte, bu granüller olgunlaşır ve ikinci aşama olan "liflere dönüşüm" evresine geçilir. Bu aşamada, granüller daha yoğun bir şekilde birikerek "örgü" yapılarını oluşturur. Oluşan bu yapılar, "arapsaçı" olarak adlandırılır ve hücre içinde birikerek daha fazla hasara neden olur. Mikrotübüllerin artık stabil kalmaması iç yapıyı bozarken, tau proteinlerinden oluşan lifli yapılar nöron hücresinde yayılarak ilave yapısal bozukluklara yol açar (Moloney et al., 2021). Üçüncü aşama, nöron kaybı ve "hayalet arapsaçı" (ghost tangles) olarak tanımlanır. Bu aşamada tau'nun

anormal birikimi devam eder ve hücre içi homeostazı bozar. Artan dengesizlik, nöron hücresinin ölümü ile sonuçlanır; ancak oluşan lifli yapılar hücre ölse bile "hayalet yumak" şeklinde gözlemlenmeye devam eder. Sonuç olarak, tüm bu süreçler tau proteininin anormal birikimi ile tetiklenmekte ve Alzheimer başta olmak üzere diğer nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesi ile ilişkilendirilmektedir (Moloney et al., 2023).

Şekil 1.3. İmmünohistokimyasal boyalar ile görüntülenmiş nörofibriler arapsaçı (Castellani et al., 2010).

1.5. AH Oluşum Mekanizmaları

Alois Alzheimer'den sonra yapılan çalışmalar, hastalığın oluşum mekanizmalarını anlamaya yönelik çeşitli hipotezlerin ortaya atılmasına neden olmuştur. Bu hipotezler birbiriyle ilişkili olup, başlıcaları şu şekildedir (Breijyeh & Karaman, 2020):

1.5.1. Kolinerjik hipotezi

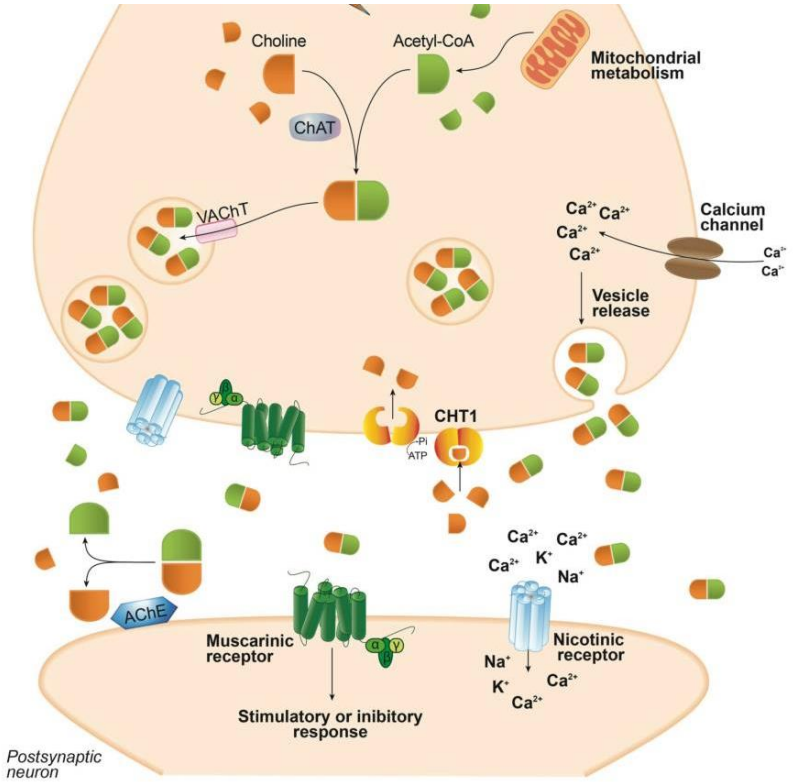
Tanımlanan ilk nörotransmitter madde Asetilkolin (ACh)'dir (Houser et al., 1983). ACh; kolinerjik nöronlar başta olmak üzere, parasempatik ve ganglionik nöronlar gibi birçok nöron tipi tarafından kullanılır. Kolinerjik nöronlar beynin pek çok bölgesinde (örneğin omurilik, arka beyin, bazal ön beyin vb.) yer almakta olup hem periferik hem de merkezi sinir sistemi (CNS) içinde önemli bir role sahiptir (Woolf & Butcher, 2011). Kolinerjik sistem, ACh'nin dahil olduğu bir dizi biyolojik süreci ifade eder. Bu süreçler

arasında hafıza oluşumu ve geri çağırımı, öğrenme, dikkat, stres yanıtı ve uyku düzeni yer almaktadır (Bucci et al., 1998).

Kolinerjik nöronlar, asetilkolini sitoplazmalarında sentezler. Mitokondriden salgılanan asetil-koenzim A (asetil-CoA) ile genellikle diyet yoluyla alınan kolin, kolin asetiltransferaz (ChAT) enzimi aracılığıyla ACh'ye dönüştürülür. Oluşan ACh, veziküler asetilkolin taşıyıcısı (VAChT) tarafından sinaptik veziküllere taşınır. Nöronlar elektriksel olarak uyarıldığında, yani depolarizasyon gerçekleştiğinde, bu veziküller hücre zarına yaklaşarak eksositoz yoluyla ACh'yi sinaptik yarığa salgılar. Salınan ACh, nikotinik ve muskarinik reseptörlere bağlanarak uyarıcı veya inhibitör etkiler oluşturur. Ardından ACh, asetilkolinesteraz (AChE) enzimi tarafından hızla parçalanarak asetat ve kolin bileşenlerine ayrılır. Elde edilen kolin, presinaptik nöron içine yüksek afiniteli kolin taşıyıcısı (CHT1) ile geri alınır (Ferreira-Vieira et al., 2016).

ChAT enzimi, yaklaşık 69 kDa büyüklüğünde olup kolinerjik nöronların sitoplazmasında bulunur (Gill et al., 2003). Enzimin aktivasyonu; nöron depolarizasyonu, Ca^{2+} akışı ve bazı protein kinazların fosforilasyonu ile gerçekleşir. VAChT ve ChAT genleri, DNA dizileri bakımından yapısal benzerlik gösterir; bazı bölgeleri iç içe geçmiş durumdadır. Bu durum, farklı promotörler tarafından bağımsız biçimde düzenlenmeleri ve farklı işlevler kazanmalarıyla açıklanır (Ferreira-Vieira et al., 2016; Holler et al., 1996).

ACh’nin bilişsel işlevlerdeki kritik rolü, Alzheimer hastalığı ile ilgili kolinerjik hipotezin temelini oluşturmuştur. Bu hipoteze göre Alzheimer hastalığında kolinerjik nöronlar zarar görür ve özellikle bellek kaybı gibi bilişsel işlev bozuklukları meydana gelir. Aβ peptidi, kolinerjik nörotransmisyonu olumsuz etkiler. Bu etki; parçalanan kolinin hücre içine alımının ve ACh'nin salınımının azalmasıyla kendini gösterir. ACh ile ilişkili bozulmalar üç temel noktada özetlenebilir: (1) Beyindeki presinaptik nöronlarda ACh sentezinin azalması, (2) uyarı almamış bazal ön beyinde hasar oluşması, (3) kolinerjik antagonistlerin hafızayı olumsuz etkilemesi (Hampel et al., 2018). Bu değişiklikler kolinerjik sistemi bozar ve Alzheimer hastalığının erken evreleriyle ilişkilendirilir (P. Sharma et al., 2019).



Şekil 1.4. ACh'nin biyolojik süreci (Ferreira-Vieira et al., 2016).

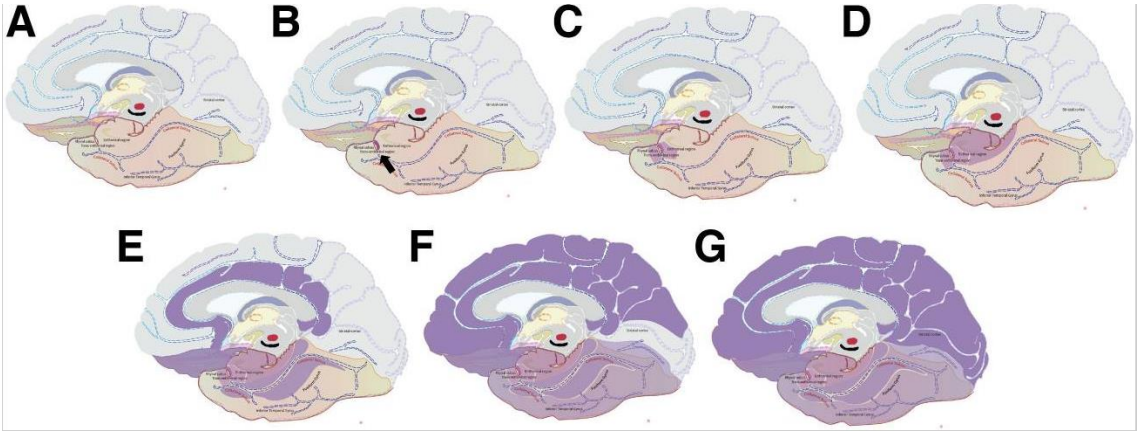
1.5.2. Amiloid hipotezi (Kaskad hipotezi)

Aβ peptidi, yıllar boyunca nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Bu ilişkinin daha iyi anlaşılması amacıyla amiloid hipotezi geliştirilmiştir. Ancak yapılan araştırmalar, Aβ birikiminin yalnızca Alzheimer hastalığında değil, yaşlanmayla birlikte normal beyinlerde de görülebildiğini ortaya koymuştur. Bu durum, Aβ'nın Alzheimer hastalığının başlangıcındaki rolünün sorgulanmasına neden olmuştur (Kametani & Hasegawa, 2018). Bu hipotez, Aβ'yı merkeze alarak amiloid prekürsör proteininin (APP) metabolik yolları üzerine kuruludur. APP iki yoldan metabolize edilir: amiloidojenik olmayan yol ve amiloidojenik yol. Amiloidojenik olmayan yol, α-sekretaz enzimi tarafından gerçekleştirilir. Bu yolla APP'den sinir hücrelerini koruyan α-APP, C83 ve P83 gibi nöroprotektif moleküller oluşur. Bu yol, Aβ birikimine neden olmaz (Schwab et al., 2022). Amiloidojenik yol ise APP'nin β-sekretaz (özellikle BACE1 formu) tarafından kesilmesiyle başlar. Bu kesim sonucunda β-sAPP ve C99-APP fragmanları oluşur. Ardından γ-sekretaz enzimi, bu fragmanları işleyerek Aβ42 peptidini üretir. Aβ42'nin birikimi, nöroinflamasyon ve bağışıklık yanıtlarının yanı sıra diğer patolojik süreçleri de tetikleyebilir (Murphy & Levine, 2010).

1.5.3. Tau hipotezi

Tau, mikrotübülleri stabilize eden bir proteindir. Tau geni, 17. kromozom üzerinde bulunur ve farklı izoformlara sahiptir. Bu izoformlardan en önemlileri, beyindeki nöronlarda bulunan "3R" ve "4R"'dir. İzoformlar mikrotübüllere bağlanma bölgesi bulundurur. Bağlanma bölgesi sayısına göre isimlendirilir. Örneğin "3R", 3 adet bağlanma bölgesi içerir. Tau hipotezi, AH'nin temel sebebinin tau proteini olduğunu savunur. Hipoteze göre, tau proteininin yanlış işlevi sayesinde AH tetiklenir. AH'de hiperfosforile olan 3R ve 4R tau izoformları, yapılarının değişikliği nedeniyle yanlış fonksiyon gösterir. Yapısı değişen tau, eşleştirilmiş sarmal filament (PHF) ya da düz filament (SF) yapılarında gözlemlenir. Oluşan bu yapılar, tau'nun yanlış bir şekilde birikmesine sebep olur. Burada tau'nun birikmesi, NFT olarak adlandırılır. Anormal olarak gelişen tau için Braak ve Braak adında bir evrelendirme sistemi geliştirilmiştir (Kametani & Hasegawa, 2018).

Braak, hiyerarşik şekilde birbirini izleyen 6 evreden oluşmaktadır. I ve II. evre, AH için erken aşama olarak tanımlanır ve sırasıyla beyin dokusunun transentorhinal ve entorhinal korteks bölgeleri hasar görmeye başlar. III. evre, bilişsel aktivitede sorunların ve hafıza kaybının gözlemlendiği evredir. Bu evrede, beyin dokusunun başta hipokampus bölgesi olmak üzere, amigdala ve bazı komşu neokortikal bölgeler hasar görür. Hastalık ilerlemeye devam ederek IV. evreye geçer. Buradaki hasar, neokortikal ile ilişkili alanlarda geniş yayılım gösterir. V. evre, artık hastalığın ciddi bir durumda olduğunu gösterir. Temporal, parietal ve oksipital bölgeler hasar görür. VI. evre ise artık hastalığın ileri bir seviyeye geldiğini gösterir. Tüm evrelerde oluşan hasar dejenerasyon ile sonlanır ve son evrede motor beceriler ile duyusal alanlar hasar görür. Bu evrelendirme, hastalığın yayılması ve şiddetinin belirlenmesi için önemlidir (C. Macedo et al., 2023).



Şekil 1.5. Braak evrelendirme. A (0.evreyi gösterir ve tau birikimi yoktur), B (I.evredir ve hastalığın başladığı bölge mor renkle gösterilir),C (II.evre), D (III.evre), E (IV.evre), F (V.evre) ve G (VI.evre)(C. Macedo et al., 2023).

1.5.4. Metal iyon hipotezi

Dolaylı veya doğrudan hemostaziyi bozan metal iyonlarının anormal çoğalması; oksidatif stres, apoptoz, nekroz, kan-beyin bariyerinin bozulması, nöroinflamasyon, Aβ birikimi ve tau fosforilasyonunu tetikler. Örneğin yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen verilere göre, Fe^{2+}, Cu^{2+} ve Mn^{2+} gibi metal iyonları başta olmak üzere, mitokondri hasarını tetikleyerek Aβ birikimini ve tau fosforilasyonunu destekler. Elde edilen veriler, her ne kadar metal iyonlarının AH için tetikleyici ve ilerletici kofaktör olduğunu ortaya koysa da, altında yatan mekanizmalar henüz tam anlamıyla çözülememiştir. Sonuç olarak, metal iyonlarının hücre içerisine girmesi veya çıkması çeşitli kanallar ve taşıyıcılarla gerçekleşir. Bazı metal iyonlarının hangi kanallardan hücre içerisine girdiği ve aşırı birikmesi sonucunda ROS oluşumunu tetikleyerek AH için kritik bir rol oynadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

1.5.5. Nöroinflamasyon hipotezi

Nöroinflamasyon hipotezi, diğer demans türlerinde olduğu gibi, AH'nin erken evre patogenezinde kritik bir rol oynamaktadır. Bireyin merkezi sinir sisteminde oluşan inflamasyonun, AH için tetikleyici, ilerletici ve şiddetlendirici bir etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Aβ birikimi ile nörotoksik etki artar ve akut inflamasyon zamanla kronik inflamasyona dönüşür. Bu durum sonucunda TLR2, TLR4 ve TLR6 reseptörleri aktive olur. Aktive olan reseptörler Toll benzeri reseptörler (TLR)

olarak adlandırılır ve evrimsel süreçte bağışıklık sistemi için erken yanıt sürecini başlatırlar. Bu yanıt ile bağlantılı olarak mikrogliyalar, Aβ yabancı maddesini algılar. Daha iyi algılama için ko-reseptör görevi gören CD36, CD14 ve CD47, TLR'lerle etkileşime girerek yanıt türünü ve şiddetini belirler. Belirlenen yanıt ile birlikte bağışıklık hücreleri tarafından IL-1β ve IL-18'in de içinde bulunduğu IL-1β ailesine ait proinflamatuar sitokinler salgılanır. Sitokinlerin oluşumu sırasında kaspaz-1 veya kaspaz-8 eksprese edilir (Khan et al., 2020a). Bu durum sonucu beyinde şiddetli bir inflamasyon süreci başlar. Salgılanan sitokinlerle muamele gören nöron ve glia hücreleri, NO sentaz izoformlarını ortama salar. Bu izoformlar ise nitrik oksit (NO) sentezini artırır (Heneka et al., 2015). Nitrik oksit, beyin dokusunda oksidatif stresi artırarak bilişsel aktivitenin azalmasına neden olabilir. Sonuç olarak, salgılanan sitokinlere uzun süreli maruziyet, hiperfosforile tau ve Aβ plağının oluşumunu ciddi düzeyde artırır. Her ne kadar bazı mekanizmalar çözülmüş olsa da, yapılan çalışmalar bazı durumlarda sınırlı etki göstermektedir. Mevcut çalışmalar, kronik inflamasyonu bireyin yaşam tarzı, kronik hastalıkları veya genetik temeller ile ilişkilendirmektedir (Kinney et al., 2018).

1. 5. 6. Oksitatif stres hipotezi

Yapılan çalışmalar sonucunda Alzheimer hastalığı patogenezi, hücre içerisinde ATP üretimi gerçekleştirmek için oksitatif metabolik reaksiyonlar ve oksitatif metabolik reaksiyonlar da genellikle yan ürün olarak oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) önemli bir rol oynamaktadır. Beyinde artan reaktif oksijen türleri sonucunda oksitarif stres oluşur. Oluşan oksitatif stres antioksidan dengeyi bozar ve hücre içerisinde DNA, RNA, lipit ve proteinler oksitlenir. Bu durum birey yaş arttıkça artar ve tölare edilemez. Sonuç olarak artan oksitatif stres AH için başlıca Aβ birikimi, protein ve glikol oksidasyonlar ile ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur (Mohsenzadegan &Mirshafiey,2012).

1.5.7. Bağırsak mikrobiyomundaki dengesizlik

Beyin ve bağırsak birbirine çift yönlü bağlıdır, bu bağlılık metabolik olarak iletişim kurmaya dayanır. Yani, bağırsak florasında meydana gelen her sorun beyin fonksiyonlarını etkileyebileceği gibi beyinde oluşan sorunlar da bağırsak fonksiyonunu etkileyebilir. Yapılan birkaç araştırma ile bağırsak mikrobiyomunda ki bozulma ile AH

ilişkilendirilmiştir. Bozulan bağırsak fonksiyonu, kan beyin bariyerinden geçebilen ve beyinde birikerek apoptoz, ROS oluşumu, iltihaplanma ve nörodejenerasyon gibi sorunlara sebep olabilen ikincil safra asitlerin üretiminin artışını sağlamaktadır (MahmoudianDehkordi et al., 2019). Ayrıca bağırsak mikrobiyomunda oluşan dengesizlik nöroinflamasyon ve insülin direnci gibi sorunlara yol açar (T. Zhang et al., 2018).

Nitrojen oksit (NO), bir nörotransmitterdir. Gulutamat adı verilen kimyasalın N-Metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerini aktif etmesi ile salınımı tetiklenir. NO üretimi, bağırsakta bulunan *Bifidobacteria, Lactobacillus* ve *Streptomyces* gibi bakterilerin ve bağırsak basillerinin doğrudan veya dolaylı olarak nitrit ve nitratı dönüştürmesi ile oluşur. Bu olay bir denge içerisindedir ve her hangi bir bakterinin aktivitesinde ki değişiklik, aşırı NO üretimini tetikleyebilir ve beyinde birçok bozukluğa yol açabilir (Luca et al., 2019).

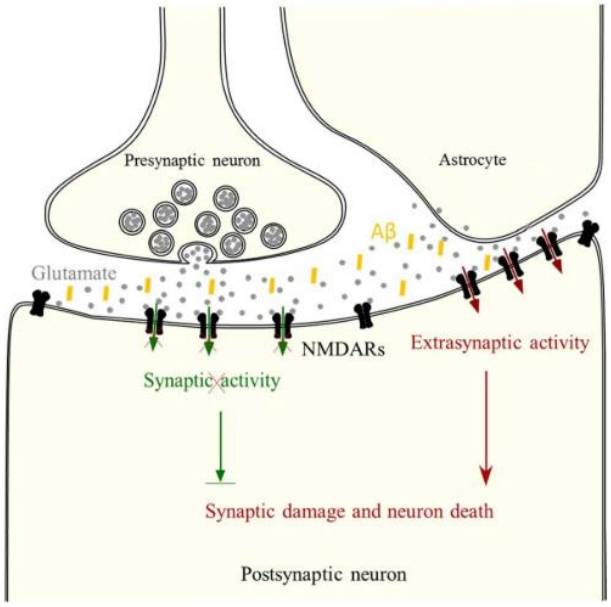
Bağırasakta bulunan bazı mikroorganizmaların değişikliği başta lipopolisakkaritler olmak üzere, immün yanıt tetikleyici bileşikler, amiloid proteinlerin oluşumuna ve beyinde iltihaplanmaya sebep olan prion benzeri proteinlerin oluşumuna yol açabilir. Bu durum beyine yayılır ve AH için tetikleyici veya ilerleyici etkiye sebep olur(Pistollato et al., 2016). Ayrıca *Helicobacter pylori* ve *Chlamydia pneumonia* gibi enfeksiyona sebep olan bakterilerin varlığı Aβ-40 ve Aβ-42oluşumu artırabilmektedir (Angelucci et al., 2019).

1.5.8. Eksitotoksik hipotez

Sinir hücrelerinin aşırı uyarılması ve zarar görmesi Eksitotoksisite olarak adlandırılır. Bu durum nörotransmitter maddelerin aşırı salgılanması ile ortaya çıkar ve hücre ölümüne sebep olacak birkaç faktörü devreye sokar. Bu faktörlere bazı genlerin baskılanması, apoptoz ile ilişkili olan kalpain aktivasyonu, iltihaplanma ve ROS üretimi örnek olarak verilebilir. Oluşan bu anormalliklerin bir araya gelmesi hücrelerde ciddi hasarlar meydana getirirken, başta AH olmak üzere diğer demans hastalıkları ile ilişkilendirilir (Schwab et al., 2022).

Glutamat, beyinde bulunan önemli bir nörotransmitterdir. Bellek, öğrenme ve sinir hücreleri arasındaki bağlantıların güçlenmesi (sinaptik plastisite) sürecinde rol alır (Kocahan & Doğan, 2017). Beyinde hipokampus ve serebral korteks bölgelerinde yaygın olarak bulunur. Merkezi sinir sistemi tarafından birkaç farklı yollarla sentezlenir. Etkisini 2 ana glutamat reseptör ile gösterir. Bunlar iyonotrik ve metabotropik glutamat reseptörleridir. İyonotrik glutamat reseptörleri içerisinde bulunan en önemli reseptör, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleridir. Bu reseptörler bellek oluşumunda kritik bir öneme sahiptir. Bu sayede bu noktada gerçekleşecek olan sorunlar başta bilişsel bozuklar ve AH ile ilişkilendirilir (Ghersi et al., 2015; R. Wang & Reddy, 2017).

Hücrenin iç ve dış kısmı arasında elektireksel potansiyel fark vardır. Bu fark -70mV'dur. Hücre zarında gerçekleşen depolarizasyon sonucunda, magnezyum (Mg^{2+}) iyonlarının engellediği, NMDA reseptörlerinde bulunan kalsiyum (Ca^{2+}) kanalları aktif hale gelerek, hücre içerisine Ca^{2+} alınımını gerçekleştirir. Sinaptik boşlukta glutamatın geri kazanımı düzgün yapılmadığı için NMDA reseptörleri normalden daha fazla uyarılarak hücre içerisine aşırı derecede Ca^{2+} iyonu girer (Lüscher & Malenka, 2012). Bu durumun akabinde artan Ca^{2+} derişimine hassas olan endoplamik retikulum ve mitokondri gibi organeller hasar görür ve hücrenin ölümü kaçınılmaz olur (Dong et al., 2009).



Şekil 1.6. Eksitotoksik yol ile hücre ölümü. Yeşil oklar normal çalışan kanalları, kırmızı oklar ise aşırı uyarılan kanlları temsil eder(R. Wang & Reddy, 2017).

1.6. AH Tanısı

AH tanısında en çok kullanılan ve en yaygın kriterler 1984 yılında, Ulusal Nörolojik ve İletişimsel Bozukluklar ve İnme Enstitüsü (NINCDS) ve Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Bozukluklar Dernekleri (ADRDA) tarafından yayımlanan raporda belirlenmiştir. Raporda tanı kriterleri birkaç başlık altında incelenmiştir. Bu başlıklar, özetle olası tanı kriterleri ve kesin tanı kriterleri olarak ayrılmıştır. Olası tanı kriterleri nöropsikolojik testler, bilişsel fonksiyonlarda ilerleyici bozukluk, mevcut yaş (hastalığın 40 yaşında başladığı düşünülmektedir), depresyon, uyku bozukluğu ve halisinasyon görme gibi durumlala belirlenir. Bu kriterleri destekleyen bazı durumlar vardır. Bunlar ise dil, motor ve algı bozuklukları, günlük yaşam aktivitelerinde ilerleyici bozulmalar, hastalık öyküsü ve ailesel yatkınlık, davranış farklılıkları ve çeşitli alanlarda yapılan test sonuçlarıdır. Rapora göre hastalığın kesin tanısı kriterleri otopsi ve biyopsi sonuçlarına göre yapılır (Guy McKhann, 1984).

1984 yılında belirlenen kriterler AH tanısı için güvenilirdir. Yapılan klinik çalışmalarda ki patolojik bulgular, AH tanısı için kullanılan kriterlerle %81 duyarlılık ve %70 özgüllük raporlanmıştır. Ancak 2011 yılına gelindiğinde, 1984 tanı kriterleri tekrar gözden geçirilmiş ve Ulusal Yaşlanma Enstitüsü ve Alzheimer Derneği (NIA-AA) birkaç revizyona gitmiştir (McKhann et al., 2011). 2018 yılına gelindiğinde ise 1984 ve 2011 yılında yapılan çalışmaları tutarlı bir şekilde birleştirmek ve mevcut durumu güncelleştirmek için NIA-AA tekrar çalışmalar başlatmıştır. Bu çalışmalar ile hastalığın evrelendirilmesi ve bu evrelerin tanı kriterlerini belirleyen klavuz geliştirilmiştir. Mevcut tanı kriterleri için belirtilen semptomlara ek olarak Aβ ve tau yumaklarının varlığı tanımlanmıştır (Jack et al., 2018a).

Tanı kriterleri, yapılan çalışmalar ile artıyor ve gün geçtikçe bazı mekanizmalar ortaya koyuluyordu. AH evrelenmesine yardımcı olacak biyomarkerler tanımlanmış ve hastalığın hangi aşamada olduğunu belirlemede kullanılmıştır. Artık 2023 yılına gelindiğinde ise yeni bir revizyona gidilmiş ve biyomarkerlerın zamansal değişikliklerini daha iyi anlamak için güncel çalışmalar değerlendirilmiştir. Değerlendirme, Aβ plakları ve nörofibriler yumakları AH için en önemli belirteç yapsada nörodejenerasyon hala önemli bir belirteç olarak kabul edilir (Liu et al., 2024).

AH tanısına ilk olarak hastanın tıbbi öyküsü dinlenerek başlanır. Tıbbi öyküler analiz edilirken dikkat edilen bazı noktalar vardır. Bunlara kişinin beslenme düzeni, düzenli olarak kullandığı ilaç ve herhangibi hastalık teşhisi olup olmadığı örnek olarak verilebilir. Ek olarak hastalıktan müzdarip olan herhangi bir akrabası olup olmadığı belirlenir. Eş zamanlı olarak hastanın nörolojik ve psikolojik durumu incelenir. Devam eden teşhis ve değerlendirme için çeşiti tıbbi görüntüleme teknikleri kullanılır ve hasta adayının başta hipokampus olmak üzere kritik öneme sahip beyin bölgelerindeki hacim incelenir. Bu teknikler sonucunda bilişsel bozulmaya sebep olacak yapıların varlığı, beyin dokusunda büzülme ve damar dengesizlikleri tespit edilir (ERGEN & SERTKAYA, 2022). Nörolojide klinik değerlendirmeler kilit bir yere sahiptir. Bilişsel bozukluk, nörolojik olarak en önemli klinik semptomlardan biridir ve değerlendirilmesi bir takım nöropsikolojik testlere dayanır. Özellikle bilişsel aktivitenin kapsamlı ve detaylı bir şekilde incelenmesi, hasta bireyin bilişsel durumu ve özelliklerinin daha iyi anlaşılmasını sağlar. Bu durum ise hastalığı daha iyi analiz edilmesi açısından oldukça önemlidir (Albert et al., 2011; Salmon et al., 2002).

Bilişsel bozukluklar bellek, yönelim, dil, dikkat, görsel ve yürütücü işlevlerde bozulma ile hastalarda ortaya çıkmaktadır. Bu durumu değerlendirmek için klinikte bir takım nöropsikolojik testler vardır. Bunlar 4 katagoride gruplandırılmıştır ve geniş değerlendirme, evreleme, psikiyatrik davranış derecelendirme ve ayırt edici ölçekler olarak adlandırılmıştır. İlk grup, içerisinde Mini-Mental Durum Testi (MMSE), Montreal Bilişsel Değerlendirme (MoCA) ve Hasegawa Demans Ölçeği (HDS) gibi testleri barındırır (Liu et al., 2024). Bu testlerden MMSE, geniş spektrumda bir bilişsel bozukluk için yapılır ve 30 sorudan oluşur. Bireyin normal kabul edilmesi için testten en az 23-24 doğru cevap yapması gerekir. Genel olarak bilişsel aktivitede bozukluk yaşayan hastaların bu testten az doğru yaptığı bildirilmiştir. Ayrıca test kolay ve hızlı uygulanabilir olduğu için diğer testler gibi tecrübe ve deneyim gerektirmez (ÖZ et al., 2022).

AH tanısında tıbbi görüntüleme geçmiş son on yılllar boyunca kullanılmaktadır (J. Wang et al., 2023). Kullanılan görüntüleme yöntemleri gelişmekte ve daha spesifik bir boyuta gelmektedir. AH, normal yaşlanma ile oluşacak bazı sorunları içerisinde barındırır. Bu yüzden görüntülemenin doğru ve destekli yapılması gerekmektedir. Farklı

görüntüleme yönteminin bulunması, hastalık için belirlenen birden fazla faktörü değerlendirmek kullanılır. AH için başlangıçta bilgisayarlı tomografi (BT) olarak adlandırılan görüntüme yöntemi kullanılmıştır. BT ile yapılan görrüntüleme sonucunda beyinde atrofi gözlemlenebilir. Fakat zamanla sonuçların yeterliliği tartışılarak, elde edilen bulguların aslında sağlıklı yaşlılarda da görüldü ortaya atılmıştır. Bu yüzden ilerleyen zamanlarda manyetik rezonas görüntüleme (MRG) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) AH görüntülemesinde kullanılmıştır. MRG ve PET, BT'ye kıyasla daha üstün yapısal ve fonksiyonel bir görüntüme imkanı sunmaktadır. Ayrıca bu görüntüleme yöntemleri daha spesifik bir boyut kazanarak floro-deoksi-d-glukoz (FDG), difüzyon tensör görüntüleme (DTI), arteriyel Spin Etiketleme, Tek Fotonu Emisyonlu Bilgisayarlı Tomografi (SPECT) ve Pittsburgh Comspound-B (PiB) geliştirilmiştir. Bunlar ise beyin dokusunda karakteristlik metabolizma incelemesi yaparak daha tutarlı sonuçlar vermektedir (K. A. Johnson et al., 2012; Khan et al., 2020a; J. Wang et al., 2023).

1.6.1. AH'de tanısal biyobelirteçler

AH için bazı tanısal biyobelirteçler belirlenmiştir. Bu biyobelirteçler hastalığın patolojik süreci hakkında bilgi verirken, hastalığın şiddeti hakkında kesin bir bilgi vermez. Belirlenen bu belirteçler ilgili olduğu 3 katagori ile ilişkilendirilir. Aβ patolojisi için biyobelirteçler beyin omurilik sıvısı (BOS) Aβ42 seviyesi, Aβ ligandları kullanırak yapılan PET görüntülemesi ve ilişkili genlerdeki (APP ve PSEN1-2 vs) mutasyonlar olarak belirlenmiştir. Tau patolojisi için biyobelirteçler BOS'ta fosforile tau (p-tau) seviyesi, tau ligandları kullanırak yapılan PET görüntülemesi ve ilişkili genlerdeki mutasyonlar olarak belirlenmiştir. Nörodejenerasyon patolojisi için biyobelirteçler BOS'ta fosforile tau, total tau (p-tau , t-tau) ve nörofilament hafif zincir (NFL) protein seviyeleri, MRG, FDG PET ve SPECT olarak belirlenmiştir (Cousins et al., 2024; Liu et al., 2024). BOS önemli bir tanı aracı olarak kullanılır. BOS, AH klinik öncesi aşamasında bir biyobelirteç görevi görür. Yani klinik semptomlar başlamadan önce BOS analizi yapılarak AH tespit edilebilir. Fakat bu durum hastalığın şiddeti hakkında kesin bir bilgi vermez. BOS ile yapılan analizlerde birkaç biyobelirteç dikkate alınır. Bunlar Aβ42/40 oranı, fosforile ve total tau'dur (p-tau ve t-tau). AH erken aşamalarında, BOS'ta bulunan Aβ42 seviyesi düşer. Bunun yanında BOS'taki p-tau ve t-tau seviyeleri de artış gösterir (Blennow & Zetterberg, 2018). Belirtilen biyobelirteçler ve tanı yöntemleri her ne kadar

AH teşisinde kullanılsada, doktorlar arasında bu durum görecelidir. Yapılan muayene ve testler ile doktorlar puanlama yapmaktadır. Belirli bir puan skorunun altında kalan hastalara AH teşhisi konulur (Xu et al., 2016).

1.6.2. AH'de kan biyobelirteçleri

Kan, BOS'a göre daha kolay elde edilen ve hastalar tarafından en çok tercih edilen tanı kriteridir. Fakat kan biyomarkerlerinin geliştirilmesi ve saptanması oldukça zordur. Çünkü kan, BOS gibi beynin sıvısı ile sürekli bir bağlantı ve moleküler aktarım içersisinde değildir. Beyinde bulunan proteinelerin çok az bir miktarı kana geçmektedir. Ayrıca kana salınan düşük yoğunluktaki protein miktarı ortamdaki proteazlar tarafından parçalanabilir veya dolaşan kan ile karaciğer ve böbrekte metabolize edilerek temizlenebilirler. Bu durumlar biyomarker geliştirmek için engel olarak karşımıza çıkmaktadır. Fakat bu sorunların dışında, farklı yöntemler kullanılarak yeni çalışmalar yapılmaktadır (Jack et al., 2018).

Aβ (40-42), AH erken aşamaları için biyobelirteç olarak kullanılır. Yapılan transgenik fare deneylerinde, yaşlanan farelerde Aβ seviyesi plazma ve BOS' ta belirli bir artış gösterirken, beyinde amiloid plak birikimi başlamasından itibaren bu durum tersine dönüşmüş ve Aβ seviyesi azalmıştır. Benzer olarak Schupf ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptığı bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada yaşlı bireylerde Aβ seviyeleri ölçülerek öngörücü bir şekilde değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda ise Aβ42 seviyesi yüksek olan bireylerin AH' ye yakalanma riskinin 3 kat fazla olduğu ortaya konmuştur (Schupf et al., 2008). Kanda bulunan bazı beyin lipitleri vardır. Bu lipitler çoğu zaman hücre sinyalizasyonunda görev aldıkları için oldukça önemlidirler. Kolesterol, glukozil seramidler, sfingomyelin ve uzun zincirli yağ asidi türevleri en bol bulunan lipitlere örnek olarak verilebilir. Yapılan çalışmalar da beyin hücrelerinin çoğunda bulunan ve iyi bir iletim için elzem olan sfingolipid seviyesinin, AH' de anlamlı bir oranda düştüğü ortaya konmuştur. Bu durum sonucunda AH teşisi için lipit biyobelirteçlerin, daha az müdahale gerektiren bir işlemle ve daha iyi bir sonuç veren yeni yaklaşımların geliştirilmesine kapı aralamıştır (Khan et al., 2020).

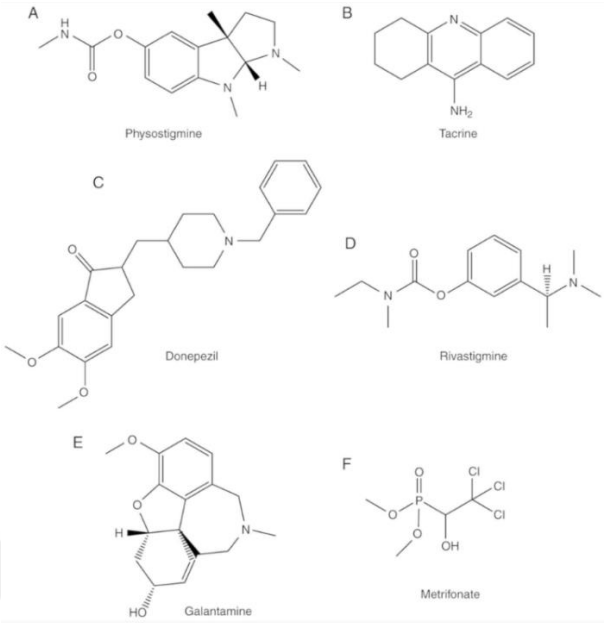
1.7. AH İlaç Tedavisi

AH, dünya genelinde milyonlarca kişiyi etkilemektedir. Güncel vaka sayısının sürekli artış göstermesi, hastalığın gelecek yıllarda daha fazla kişiyi etkileyeceği gerçeğini ortaya koymaktadır. AH her ne kadar halk sağlığı sorunu olsa da günümüzde kesin bir tedavisi yoktur (Breijyeh & Karaman, 2020). Mevcut durumda hastalığı kontrol altına almaya ve belirtilerin şiddetini düşürmeye yönelik semptomatik tedavi mevcuttur. Semptomatik tedavi, AH tedavisinde birinci yaklaşımdır. Fakat ilerleyen hastalık hiçbir zaman geriye dönmemiş, sadece ilerlemesi veya şiddeti hafiflemiştir. AH için onaylanmış ve uzun süredir kullanılan 2 ana farmakolojik ilaç grubu vardır. Bunlardan ilki kolinesteraz inhibitörleridir. İçerisinde hafif, orta ve ileri seviyede olan hastaların kullanılması uygun görülen birkaç ilaç barındırır. İkinci farmakolojik ilaç grubu ise *N-metil* D-aspartat (NMDA) antagonistleri'dir. Bura da ise merkezinde bilinç ve dikkat zorluğu çeken, orta ve ileri seviyedeki hastaların kullandığı memantin bulunmaktadır (Yildirim & Eke, 2024). Daha güncel olarak AH için kullanılan ilaç gruplarıda vardır. Bunlar AH'ye bağlı davranış ve psikolojik semptomları hafifletici ve hastalık modifiye edici ilaç gruplarıdır. AH'ye bağlı davranış ve psikolojik semptomları hafifletmek için psikolojik sıkıntıları hedef alan Brexpiprazol ve AH'nin sebep olduğu uyku bozukluklarını hedef alan Suvorexant ilaçları kullanılmaktadır. İlaçlar sırası ile gıda ve ilaç dairesi (FDA) tarafından 2023 ve 2020 yıllarında kullanım oynayı almıştır. Hastalık modifiye edici ilaçlar ise Aβ yükünü azaltan Aducanumab ve AH'nin patofizyolojisini hedef alan Lecanemab'dır. Bu ilaçlar ise sırası ile FDA tarafından 2021 ve 2023 yıllarında kullanım onayı almıştır (Valadharajan et al., 2023).

1.7.1. Kolinesteraz inhibitörleri

Kolinerjik hipoteze göre, beyinde bulunan ve nörotransmitter olan ACh, AH'de ciddi bir azalma gösterir. ACh bir çok beyin fonksiyonunda görev aldığı için üretimindeki azalma bilişsel bozulmaya sebep olabilir. Bu sebeple AH için geliştirilen tedavi yöntemlerinden biri, ACh seviyesini arttırmak yönündedir. Bunun mümkün olması ise AChE seviyesindeki azalmaya bağlıdır (Ferreira-Vieira et al., 2016). AChE enzimi, sinaptik boşluktaki ACh'yi parçalar. Enzimin işlevini kaybetmesini sağlamak doğrudan

veya dolaylı yoldan ACh seviyesini arttıracağından, kolinesteraz inhibitörleri içerisindeki ilaçlar bu enzimi hedef almaktadır(Weinstock, 1999; Yildirim & Eke, 2024).



Şekil 1.7. Geliştirilen Kolinesteraz İnhibitörleri ve moleküler yapıları (Sharma, 2019).

Fizostigmin, bir AChE inhibitörüdür ve 1864 yılında Calabar fasulyesinden izole edilmiştir. Kan beyin bariyerini rahatça geçebilmesine rağmen birkaç dezavantajı yüzünden AH tedavisi için onaylanmamıştır. Bu dezavantajalara yarı ömrünün çok kısa olması, ishal, tükürük bezlerinin aşırı aktivasyonu, mide krampları, ve terleme örnek olarak olarak verilebilir. Metrifonat, uzun süreli etkiye sahip bir AChE inhibitörüdür ve nörotransmisyonu iyileştirme potansiyeline sahiptir. Günde alınacak 1 doz metrifonat, hafif ve orta dereceli AH'li hastaların bilişssel işlevini düzenleyebilir. Fakat her ne kadar tolere edilebilirliği fazla olsa da uzun süreli kullanım sonucunda solunum felci tetikleyicisi gibi ciddi yan etkileri bulunur. Bu yüzden ilacın klinik çalışmaları faz III çalışmaları sırasında durdurulmuştur (Sharma, 2019).

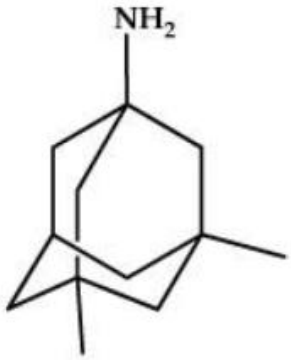
Takrin, ilk üretildiğinde kas gevşetici ve solunum uyarıcı olarak kullanıldı. İlacın etkinliği yüzünden 1980 yıllarında AH için kullanıldı ve 1993' de(Harel et al., 1993; Karis et al., 1966) FDA tarafından ilk kolinesteraz inhibitörü olarak onaylandı. Fakat başta karaciğer hasarı gibi yan etkilere sebep olduğu için klinikte kullanımı uzun süredir durdurulmuştur (Yildirim & Eke, 2024). Donepezil, hafif, orta ve ileri seviyede AH için,

FDA tarafından onay almış (1996), kan beyin bariyerini rahatça geçebilen (Demir & Türkan, 2022) ve en çok reçete edilen ilaçtır. Piperidin türevi olarak AH' de merkez etkili, hızlı ve geri dönüşümlü bir etkiye sahiptir. Etkinliğini AChE'ye bağlanarak gösterir. Bağlanma geri dönüşümlü olsada, ACh hidrolizini inhibe eder. Bu sayede sinaptik boşlukta ACh seviyesinde ve kolinerjik iletimde belirgin bir artış gözlemlenir. Mevcut durumda gastrointestinal sistemde yan etkiler göstermekte ve diğer kullanılan ilaçlar gibi hastalığın ilerlemesini durdurmasa da spesifik semptomları hafiflettiği ortaya konmuştur (Lieberman et al., 2023; Seltzer, 2007). Rivastigmin, FDA tarafından 2000 yılında onaylanan ve hafif, orta ve ileri seviyede AH için kullanılan bir ilaçtır. AChE'ye aktif bölgelerinden psödo geri dönüşümüz bağlanarak, ACh hidrolizini engeller. Bilişsel aktiviteyi düzenler. Fakat ishal, bulantı, net görememe ve kilo kaybı gibi yan etkiler gözlemlenebilir (Kandiah et al., 2017; Valadharajan et al., 2023).

Galantamin, FDA tarafından 2001 yılında onaylanan ve hafif ila orta seviyede AH için kullanılan bir ilaçtır. Hastalarda yaklaşık olarak 6 aylık kullanım sonucunda bilişsel aktivitlerde iyileşmeler göslemlenerek, bakıcı yükünün azaldığı tespit edilmiştir. *Galanthus nivalis* bitkisinden türetilen bir alkaloiddir ve şuanda sentetik bir formülasyona sahiptir. AChE için rekabetçi bir inhibisyona ve geri dönüşümlü etkiye sahiptir. Gastrointestinal sistemle alakalı yan etkiler ilacın kullanımıyla başlayabilir (Breijyeh & Karaman, 2020a; Valadharajan et al., 2023).

1.7.2. *N-metil* D-aspartat reseptör (NMDAR) antagonistleri

NMDAR, sinir hücreleri arasındaki iletişim için önemli yapılardır. Özellikle bilişşsel aktivite ile ilgili hipokampus ve korteks bölgelerinde bulunan piramidal hücrelerde bol miktarda bulunur. Glutamat nörotransmitterini sinir hücrelerine bağlayarak, bellek ila öğrenme gibi işlevlerin çalışmasına aracılık eder. Glutamatın etkinliğini göstermesi ile Ca2+ akışı başlar ve bu durum normal bir işleyişte devam eder. Fakat Ca2+ aşırı salgısı (eksitotoksisite) zamanla sinir hücrelerinin hasarına ve devamında ölümüne, sinaps boşluktaki iletişim güçlüğüne ve AH ile ilişkili bilişsel bozulmaya sebep olur. Glutamatın aşırı uyarısı ile oluşan sorunların önüne geçebilmek için çeşitli ilaçlar geliştirilmeye çalışılmış, AH için bu grupta sadece memantin adlı ilaç onay almıştır(Folch et al., 2018; Liu et al., 2024; Reisberg et al., 2003).

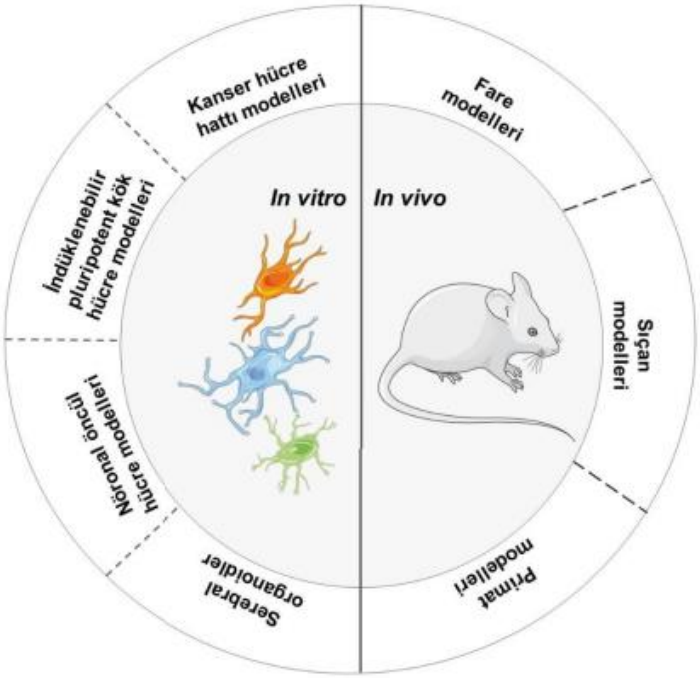


Şekil 1.8. Memantinin moleküler yapısı (Breijyeh & Karaman, 2020b).

Memantin, FDA tarafından 2003 yılında onaylanan ve orta seviyede AH için kullanılan bir ilaçtır. Primer alafatik bir amindir ve adamantinden köken alır. Belirlenen normal dozlardaki oral kullanımı doğrusal farmakokinetik etki sergiler. NMDA reseptörleri aracılığı ile glutamat kaynaklı Ca2+ akışını bloke eder (J. W. Johnson & Kotermanski, 2006). Memantin, güvenli ve tolere edilmesi kolay olan bir ilaçtır. Bununla birlikte sık görülen yan etkilere sahiptir. Bunlar baş dönmesi ve ağrısı, düşme hissi ve ishal gibi yan etkiler olarak rapor edilmiştir (Farlow et al., 2008).

1.8. Deneysel AH Modelleri

Deneysel olarak tasarlanan in vivo ve in vitro AH modelleri, hastalıkta oluşan patolojik durumu ve geliştirilecek olan yeni tedavi yaklaşımlarının klinik öncesi değerlendirmelerinin yapılması için oldukça önemlidir. İlk transgenik AH modelleri 1995 yılında geliştirilmiştir ve günümüzde yaygın bir kullanımı mevcuttur (Games et al., 1995). Her ne kadar transgenik modellerde fareler kullanılsa da, klinikten önce yapılan çalışmalarda alınan sonuçlar klinikteki ile uyuşmamaktadır. Transgenik modellerin kullanıldığı ve başarılı sonuç alındığı durumların çoğunda yapılan klinik değerlendirmeler başarız (~%99,6)olmuştur (Cummings et al., 2014). Bu durumu sonucunda araştırmacılar, kullanılan modellerin geçerliliğini sorgulamış ve gelişmekte olan hücre kültürü teknikleriyle elde edilecek olan kök hücre ve nöronal öncü hücrelerin bu durumun önüne geçeceğine inanmıştır (Schneider et al., 2014).



Şekil 1.9. Literatüredeki mevcutAH modelleri (Aru et al., 2023).

1.8.1. *In Vivo* modeller

AH belirtileri ve semptomları ortaya çıkmadan biyolojik ve moleküler değişiklikler gerçekleşir. İnsanda gerçeleşen bu durumları daha iyi anlamak ve patolojik süreçler hakkında bilgi edinmek için *ın vivo* modeller sıklıkla tercih edilir (Drummond & Wisniewski, 2017). 2022 yılında yayımlanan bir makalede fare, sıçan ve insan olmayan primat modellerinin, AH için 100'den fazla çeşidinin olduğu ve bu modellerden en yaygın olarak kullanılan tercih edileni fare olarak belirlenmiştir. Her ne kadar hayvan modelleri hastalık mekanizmaları ve yeni ilaç tanımlaması için önemli olsa da, bu durum hayal kırıklıkları ile doludur. Çok yönlü ve farklı modelin bulunması veya seçilmesi yapılacak olan çalışmaya ve oluşturulan hipoteze göre değişiklik göstermektedir. Burada seçilen modelin ajantajları ve dejavantajları da kritik bir öneme sahiptir (Chen & Zhang, 2022).

Günümüzde AH araştırmalrında en çok ve en sık kullanılan in vivo model, fare modelleridir. Bu model, AH'nin patogenezinde rol oynayan Aβ peptidi ve plaklarının dinamik özeliklerini anlama ve yorumlamada yardımcı olmaktadır. Geliştirilen fare modelleri için 200'den fazla transgenik soy üretilmiştir. Yapılan çalışmalarda çoğu fare modeli için, insanda yaşa bağlı gelişen Aβ plaklarının varlığı ve daha hızlı bir süreçte

geliştiği gözlemlenmiştir. Fakat insanda gözlemlenen bilişsel bozulma, nispeten az olan Aβ ile bağlantılı iken transgenik farelerde bu durum ilişkilendirilememiştir. Ayrıca kaskad hipotezine göre Aβ oluşumu, AH'nin patolojik sürecine rol oynayan bir değer yapı olan NFT'yi beraberinde getirir. Transgenik farelerde NFT'nin oluşumunda rol alan fosforile tau varlığı saptanırken, NFT ve beraberinde getirdiği nöronal kayıp için literatürde çok az ispat bulunmaktadır. Bu durumu açıklamak için farelerin yaşam süresindeki farklılıklar, Aβ'nın NFT oluşumu için yeterli düzeye gelememesi ve farelerde bulunan tau proteininin yapısındaki değişikliklerden dolayı agregat oluşturmaya eyimli olmadığı gibi farklı düşünceler ortaya atılmıştır (LaFerla & Green, 2012). İnsan NFT yapılarını modellemek için, araştırmacılar, APP mutasyonlarına ek olarak insan tau protenini ifade eden fare soyları geliştirmiştir. AH için bu multigenik soylar, insanda bulunan NFT'leri taklit etmiş ve taunun Aβ ile ilişkisini anlamaya yardımcı olmuştur. Bu durum, Aβ peptidi ve anormal tau'nun sebep olduğu gen ve protein değişikliklerine de kapı aralamıştır. AH'de gelişen nöroinflamasyon Aβ peptidi ve anormal tau'nun bir etkileşimi sonucunda gerçekleşir. Fakat insan ve fare modelleri arasındaki farklılıklar neticesinde nöroinflamasyon tam olarak modellenememiş olsada Aβ peptidi'nin nöroinflamasyon, ROS oluşumu ve tau patolojisine katkıda bulunduğu ortaya konmuştur (X. Li et al., 2016).

İnsanda olduğu gibi yaşlanarak gelişsen hafıza kaybı, tüm in vivo modellerde de gözlemlenir. Bu bilgi doğrultusunda yaşlı model organizmaların potansiyel bir demans modeli olabileceği öngörülür. Yaşlı hayvanlarda spontane gelişen AH patolojisi ve devamında gözlemlenen bilişsel bozulmalar, dışarıdan bir müdehale gerektirmeden oluşan doğal ptogenezi anlamak için eşsiz bir fırsat niteliği taşımaktadır(Aru et al., n.d.). En yaygın olarak kullanılan transgenik fareler, geliştirilirken bazı mutasyonlar veya modifikasyonlar hedef alınır. Mutasyonlardan bazıları APP ve PSEN1'i hefef alan V717F, K670N, M671L ve M146V'dir. Bu mutasyonlar transgenik farelerde bir tane olabileceği gibi birden fazlada bulunabir (Drummond & Wisniewski, 2017).

Sıçan modelleri her ne kadar fare modellerine kıyasla daha az tecih edilse de, insan için daha yakın fizyolojik, morfolojik ve genetik özelliklere sahiptir. Sıçan modelleri, beyin yapılarının büyük olması ve görüntüleme kolaylığı, BOS analizi için temin kolaylığı ve komples testler için zengin bir fenatipe sahip olmalarıyla ön plana çıkarlar.

Transgenik sıçan ve fare modelleri fenotipik olarak oldukça benzerdir ve her iki grup içinde ailesel AH mutasyonaları promotör taradından belirlenebilir. Ayrıca literatürde yaygın olarak kullanılan 17 farklı sıçan AH modeli mevcuttur (Do Carmo & Cuello, 2013; Drummond & Wisniewski, 2017). Sıçan modelleri, geliştirilirken bazı mutasyonlar veya modifikasyonlar hedef alınır. Bu hedeflere APP için KM670/671NL, APP V717F ve E693G PSEN1 için M139T, L166P, L435F ve deltaE9 örnek olarak verilebilir. Bu mutasyonlar sıçan modellerinde bir tane olabileceği gibi birden fazlada bulunabilir (Aru et al., n.d.). Literatürde bulunan sıçan modellerinde, genel olarak yüksek oranda Aβ peptit ve plak birikimi gözlemlenir. Fakat APP için KM670/671NL ve PSEN1 için deltaE9 mutasyonu bulunduran, TgF344-AD sıçan modeli ile yapılan çalışmada, 16.ayda NFT'nın varlığı raporlanmıştır (Cohen et al., 2013).

İnsan olmayan primatlar, insana olan biyolojik yakınlıkları, kompleks davranışları, BOS analizi için temin kolaylığı ve görüntüleme çalışmalarına yatkınlıklarıyla AH nöropatolojisini en iyi yansıtan modellerdir. Yaygın olarak nörobilim çalışmalarında kullanılırlar ve Aβ ile mükemmel bir homolojiye (%100 sekans benzerliği)sahiptirler. Ayrıca yeni dünya primatları olarak adlandıran ve görsel ila işitsel duyuları ile iletim kurma becerisine sahip olan Marmosetlerde, 7.yaşına geldiğinde Aβ peptidi birikimi gözlemlendiği için artan yaş ile beraberinde gelen hastalıklar için mükemmel bir model statüsündedir (Brok et al., 2007; Burm et al., 2016). Ek olarak diğer hayvan modellerine kıyasla bağışıklık ve metabolik fonksiyonları daha çok insana benzemektedir (Camilli et al., 2016; Hart, 2019). Eski dünya primatları olarak adlandırılan ve bu grupta yer alan rhesus maymunları, AH nöropatolojisi için yaygın olarak kullanılırlar. Bu maymunlarda 25.yaşından sonra Aβ birikimi gözlemlenir. Tau protein sekansları insanla yüksek benzerlik gösterir. Fakat tau patolojisine ratlanmaz. Babunlar ise yaş artıkça tau ve Aβ birikimi gözlemlenirken NFT gözlemlenemez. Ayrıca nadirde olsa 30 yaşama süreleri nedeniyle verlet maymunlarıda AH mdoellerinde kullanılırlar.benzer şekilde yaş artıkça Aβ birikimi gözlemlenirken, NFT oluşumu rapor edilmemiştir (Drummond & Wisniewski, 2017).

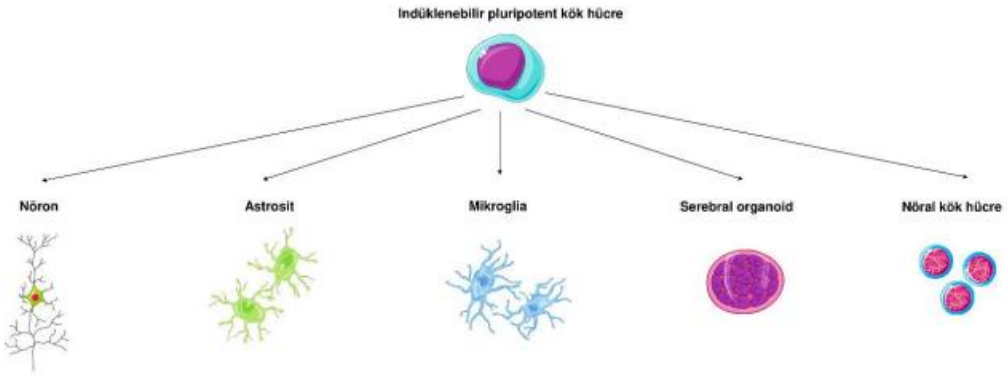
1.8. 2. *In Vitro* modeller

In vitro modeller , in vivo modellere kıyasla genel olarak daha hızlı sonuç ve pratik uygulamalar sunar. Hücresel düzeyde hastalığın nöropatolojik durumu hakkında bilgi edinmeyi sağlar. Ayrıca daha düşük maliyet, ortam kontrolü, az iş yükü ve basit uygulama gibi avantajlara sahiptir. Ancak farmakokinetik verileri güvenilirlik açısından in vivo modellerden azdır (Blaikie et al., 2022).

2000'li yılların başından beri AH modellemesi için insan kökenli nöroblastoma hücre hatları kullanılmaktadır. Bu hücre hatları çeşitli nörotropinlerle (retinoik asit, forbol ester vs) muamele edildiğinde nöronal hücre tipine dönüşebilir. SH-SY5Y, nöronal hücre tipine dönüştürülen ve en yaygın kullanılan hücre hattıdır. Retinoik asit ile kültürlenmesiyle yetişkin nöron hücresi oluşturulur (Agholme et al., 2010; Shipley et al., 2016). Ayrıca modelleme için kullanılan diğer bir hücre hattı, PC-12'dir. Sinir büyüme faktörü (NGF) ile kültürlenmesiyle yetişkin nöron hücresi oluşturulur(Sierra-Fonseca et al., 2014). SH-SY5Y, 4 yaşındaki bir kız çocuğunun kemik iliğinden türetilmiş, epitel morfolojide olan ve in vitro ortamda nöron benzeri hücrelere dönüştürülebilen nöroblastoma hücrelerdir. L. Biedler tarafından 1970 yılında ATCC (Amerikan Tipi Hücre Koleksiyonu)'ye verilmiştir (Xicoy et al., 2017). Hücre hattı, retinoik asit uygulamasından sonra farklıklaşır ve nörotoksinlerle yapılacak olan tedavi için moleküler mekanizları açığa çıkaramak için imkan sağlar. AH'de tau nöropatolojisi ve Aβ'nin oluşturduğu nöronal toksisite araştırmalarında yaygın olarak kullanılır (Chiu et al., 2021). PC-12, feokromasitoma tümöründen türetilmiş, in vitro ortamda NGF muamelesiyle nöron benzeri hücrelere dönüştürülebilen hücre hattıdır. 1970'li yıllarda Greene ve Tischler tarafından oluşturulmuştur. Dönüştürüldükten sonra sempatik nöronların özelliklerini yansıtırlar ve bundan dolay Aβ'nin oluşturduğu nöronal toksisite ve altında yatan mekanizmalar, hücreler arası sinyal iletimi, hücre yaşam ve ölümü araştırmaları için benzersiz bir araç haline gelmiştirler (Ghiasvand et al., 2024; Solana-Manrique et al., 2025).

İndüklenebilir pluripotent kök hücreler (iPSC), 2007 yılında tanımlanmıştır. Başta beyin hücresi olmak üzere birçok somatik hücreye farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Bu

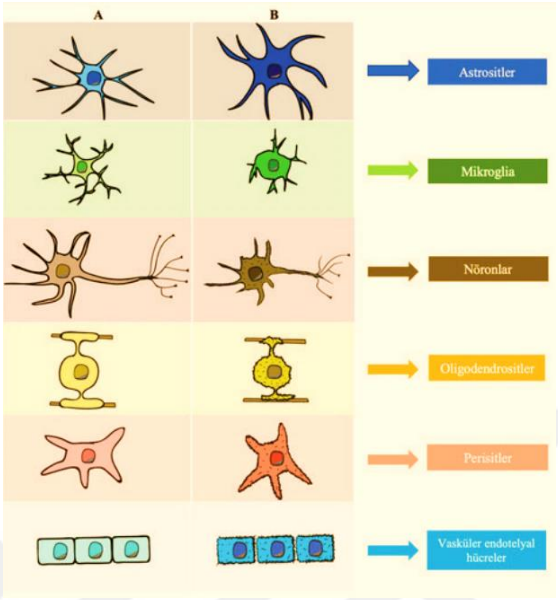
farklılaşmalar için literatürde zengin bir protokol havuzu bulunmaktadır. Hasta kökenli elde edilen iPSC'nin en büyük avantajı, hastalık nöropatolojisini yansıtmak için ne genetik manipülasyonlara nede Aβ ile kültürlenmeye ihtiyacı olmamasıdır. Her ne kadar bazı dezavantajlara sahip olsa da, AH mekanizmalarını anlamak için katkıları büyüktür ve gelecekte olması planlanan kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarına oldukça yatkıntır. Ayrıca ailesel AH'ye sahip bireylerin, fibroblast, kan ve idrar epitel hücreleri alınarak beyin hücresine farklılılaştırılabilir. Bu yöntem sayesinde önemli bir in vitro AH modeli oluşturulabilir (Drummond & Wisniewski, 2017; Penney et al., 2020).



Şekil 1.10. iPSC'nin farklılaşması ile oluşan beyin hücreleri (Aru et al., 2023).

Nöronal öncü hücreler (NPC), iPSC'lerden köken alan ve olgun nöronlar gibi davranabilen hücrelerdir. Yapılan çalışmalar olgun nöronların AH modellemesi üzerine olsa da fenotipik olarak, davranışları ve moleküler düzeyde ki etkinlikleri belirlenmelidir. NPC'ler ile ilk çalışma 2012 yılında Koch ve arkadaşları tarfından yapılmıştır. Bu çalışma, insandan elde edilen embronik kök hücrelerden farklılaştırılan NPC'ler ile yapılmıştır. Ailesel AH için kritik öneme sahip olan PSEN1 mutasyonları, farklılaştırılan NPC'lere lentiviral transdüksiyon ile eklenerek incelenmiştir. Çalışmanın sonucu ise, NPC'nin olgunlaşma süreçlerinde APP ve Aβ salınım seviyelerinin değiştiğini, yani hücreler farklılaştıkça AH için öneme sahip proteinlerin seviyelerideki değişiklikleri ortaya koymuşlardır (Koch et al., 2012). PSEN1 mutasyonları ve Aβ üretimi üzerine, 2014 yılında yapılan başa bir çalışmada, PSEN1 mutant NPC'ler kontrol grubuna kıyasla daha yüksek Aβ42/Aβ40 oranına sahip olduğu ortaya konmuştur. Daha güncel bir çalışmada ise sağlıklı ve hasta bireylerden alınan iPSCL'ler kıyaslanmıştır. Çalışma , her

guruptan alınan NPC'lerin ortak özellik sergilediğini ve olgun nöronlara etkili biçimde farklılaştığını ortaya koymuştur (Choi et al., 2014; D'Souza et al., 2021).



Şekil 1.11. Başlıca insan beyin hücre tipleri ve AH'de meydana gelen değişiklikler. A: Sağlıklı birey, B: AH birey (Gezici & Sekeroglu, 2022).

AH modellemesinde iki boyutlu (2D) kültürler her ne kadar mekanizları aydınatmak için kullanılıyor olsa da, bazı durumlarda yetersiz kalabiliyor. Bu durumlara başlıca; hastalık varlığında farklı hücre tipleri ve bağışıklık hücreleri arasındaki iletişim ve etkileşim, Aβ ila NFT'nin doku benzeri karmaşık bir ortamda durumlarının değerlendirilmesi ve nöronal etkişeşimin farklı popülasayonlarda analizi örnek verilebilir. Yetersiz kalan 2D modelleri, 3D modellerin gelişmesime kapı aralamıştır. 3D modelleri, insan multipotent kök hücrelerinden temin edilir ve fetal beyin dokusunu yansıttığı için AH çalışmalarına yeni bir boyut kazanadırmıştır. Asıl ilgi çekici durum ise modellenmek istenen dokuda bulunan tüm hücre tiplerini içerisinde barındırabilmesidir (Barak et al., 2022; Kelava & Lancaster, 2016; Lancaster et al., 2013). Beyinle ilgili organoidlerin oluşturulması çeşitli protokollere dayanır. Bu protokoller kök hücrelerin bir araya gelerek bir yapı oluşturması ve beyin nöronlarına dönüşmesi temeline dayanır. Günümüz araştırmalarında, kültür ortamına eklenen beyin belgelerine spesifik ve özel büyüme ila farklılaşma faktörleri ile beyin organoidleri oluşturulmaktadır. Bu süreçte çeşitli inhibitörler kullanılarak ortam kontrolü sağlanmaktadır. Ortam kontrolünün yapılması ile artık oluşan organoid, belirli spesifik bölgeyi taklit eder ve o bölgeye özgü davranabilir.

Ayrıca organoidler, in vitro ve in vivo modeller arasındaki boşluğu doldurmaktadır (Qian et al., 2019).

1.9. Terpenler (İzoprenoidler)

Terpen, terimsel olarak ilk kez 1866 yılında Dumas tarafından ortaya atılmıştır. Ortaya atılan bu kelime, çam ağacından elde edilen ve Latince'de 'terebentin' (Balsamum terebinthinae) olarak adlandırılan bir özüttür. Terpenler, diğer adı olan izoprenoidler olarak adlandırılırlar ve doğada bulunan çok büyük ve çeşitli (yaklaşık olarak 55.000 çeşit) bileşik grubunu oluştururlar. Bileşikler, halkalı yapıda olabileceği gibi düz zincirli hidrokarbonlardan da oluşabilirler. Bu farklı yapıdaki bileşiklere, oksijen ve hidrojen eklenmesi veya çıkarılması kimyasal değişikliklere yol açar ve artık terpenoid olarak adlandırılmasını sağlar. Bitkilerle sınırlı olmayan terpenler, bazı hayvan türlerinde steroller ve skualen gibi bileşikler olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Bitkilerin çevresel etkileşimi için önemli olan terpenler, bitkinin nasıl kokacağını, vereceği tadı ve oluşturacağı pigmentini belirlerler (Ninkuu et al., 2021; Yang et al., 2012).

Terpenlerin yapısal sınıflandırılması, içerdikleri izopren sayısına ve bu izoprenlerin nasıl organize olduklarına bağlıdır. İzopren (C_5H_8), terpenelerin yapı taşıdır ve gaz halde bulunan hidrokarbondur. Bu hidrokarbon bileşiğinin farklı şekillerde düzenlenmesiyle terpenler oluşur. Oluşan terpenler ise bitkilerde farklı kullanım alanlarına sahiptirler. Bunlar sıcaklık koruyan, sinyal işlevi olan, pigment üretimi yapan, tatlandırıcı özellekte, çözücü işlevi gören terpenler olarak örneklendirilebiler. Ayrıca bazı terpen bileşikleri, yüksek buhar basıncına sahip oldukları için uçucu terpenler olarak adlandırılırlar. Bunlar arasında hemiterpenler, monoterpenler ve seskiterpenler bulunur. Uçucu özelliği olmayan yada yarı uçucu özellikte bulunan terpen gruplarıda vardır. Bunlar arasında ise diterpenler, triterpenler ve tetra terpen grupları vardır (Loreto et al., 2014).

Hemiterpen, tek izoprenden oluşan (yani 5 C'li), en basit ve en küçük terpen grubunu oluşturur. En yaygın olarak bilinen üyesi izoprendir. İzoprenin oksijen içeren türevleri diğer hemiterpenleri oluşturur ve potansiyel olarak biyoyakıt adaylarıdırlar(Abdallah & Quax, 2017). Monoterpenler, iki izoprenden oluşan (C_{10}) ve

çenekli bitkiler,mantarlar, bakteriler ve açık tohuma sahip bitkilerde bulunurlar (Magnard et al., 2015). Çok çeşitli bir terpen grubu olan monoterpenler, çiçek ve meyvenin kokusuna katkıda bulunur ve bazı bitkilerde patojen veya zararlı böcek türlerine karşı savunma görevini üstlenirler. Yapısal olarak asidik ve monosiksil ila bisiklik formları vardır. Başta tarım olmak üzere gıda, kozmetik ve ilaç sektöründe geniş bir kullanım alanları mevcuttur (Ninkuu et al., 2021; W. Wang et al., 2018). Seskiterpenler, üç izoprenden oluşan (C_{15}) ve doğada yaygın olarak bulunan tepen bileşikleridir. Monoterpenlerde olduğu gibi halkasal yapılarına göre sınıflandırılırlar. Fakat bazı seskiterpeneler bu sınıflandırmada istisna olarak dışarıda kalırlar. Hidrokarbonlar, aldehitler, alkoller ve esterler seskiterpen grubunda bulunur ve mikroorganizmalar ila kansere karşı etkili özellikleri vardır. Ayrıca parfüm sektöründe de aktif olarak kullanımları mevcuttur (Abdallah & Quax, 2017; Z. Li et al., 2020).

Tıbbi alanda kullanılan, anti-inflamatuar veya antibakteriyel özellikte terpenlerde mevcuttur ve tıbbi bileşik olarak adlandırılırlar. Terpen bileşikleri, tıbbi özellikleri ile hem bitkilerde hemde hayvanlarda bulunur. Canlı organizmaya birçok yararlı etkileşimler için aracılık yapar. Canlıyı biyotik ve abiyotik tehditlerden korur ve hatalık yapan mikroorganizmalar için patojen etkiler gösterir. Bulunduğu canlıyı strese ve doğal ortamdaki rakiplerine karşı korur. Kenevir, tıbbi terpen eldesi için oldukça önemli bir yere sahiptir. İçeriğinde, kansere karşı koruyucu, mikroorganizma ve parazit önleyici terpenler bulunur. Ayrıca ilaç çalışmalarında büyük ölçekte kullanımları mevcuttur(Cox-Georgian et al., 2019b; Gershenzon & Dudareva, 2007).

Terpenve terpenoid yapısal olarak benzer moleküllerdir. Çok küçük farklılıkların olmasına karşın, bu kelimeler bazı durumlarda birbirlerinin yerine kullanılırlar (Yang et al., 2012). Terpenoidler, bilim insanları için uzun yıllardır ilgi konusudur. Çünkü doğada, hem fiziksel hemde kimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptirler. Bunun yanında doğal ortamda birçok farklı yolla sentezlenirler. Terpeneoidlerin üretimi, canlı içerisinde genel olarak 2 farklı yol ile gerçekleşir. Birinci yol, daha çok ökaryotlar ve arkebakterilerde gözlemlenen Mevalonat Yolu (MVA)'dur. İkinci yol ise, daha çok bakteri ve kloroplast hücrelerinde görülen Metil Eritritol Fosfat Yolu (MEP)'dur. Bu iki yolun temel amacı glikozu, terpenoidlerin temel yapı taşı olan başka iki yapıya dönüştürmektir. Bu dönüşüm sıralı enzimlerin çalışması (enzim kaskadı) ile gerçekleşir ve oluşan yapılar, DMAPP

(dimetilalil difosfat) ve IPP (izopentenil difosfat)'dir. DMAPP ve IPP birleşerek farklı uzunluklarda zincirler oluştururlar ve bu zincirlerin karbon sayısı, terpeneoidin çeşidini (C10:monoterpen, C15:seskiterpen, C20:diterpen vs.) belirler. Zincirlenme aşamasını tamamlayan yapı daha sonra halkalaşır ve yapı değiştirerek çeşitlenmeye başlar. Burada terpen sentaz olarak adlandırılan enzimler devreye girer ve alkoller ila eterler gibi farklı kimyasalların ortaya çıkması ile yapı halkalaşır. Bu aşama molekülün ana yapısını bozmadan üzerine yeni gruplar eklenmesi ile sonuçlanır(Couillaud et al., 2021; Cox-Georgian et al., 2019b).

1.9.1. Monoterpenler

Terpenleinrin alt grubu monoterpenler, $C_{10}H_{16}$ moleküler formülüne sahiptir. Birçok uçucu yağ, koku ve yapısal izomerin ana bileşiğidir ve çiçekler, meyveler ve yapraklardan elde edilirler. Yapısal olarak asidik ve monosiksil ila bisiklik formları vardır. En yaygın olarak bilinen ve antibakteriel ila antifungal etkiye sahip monoterpenler, çam ağacından elde edilen α-pinen ve turunçgillerden elde edilen limonendir. Uçucu yağlar, beyin zarından geçebilen maddelerdir. Bu durum, birçok şeyi yöneten beyin için yeni bir tedavi yaklaşımı sunmaktadır(Cox-Georgian et al., 2019b; Yayli, 2013.). Monoterpeneler, bitkilerde aromatik karakterden sorumlu izopren türevleridirler. İkincil metabolitlerdir ve biyotik ila abiyotik stres ortamında sentezlenirler. Monoterpenlerin kimyasal olarak 3 grubu vardır. Bu gruplar, asidik monoterpeneler, monosiklik monoterpenler ve bi-trisiklik terpenelerdir (Wojtunik-kulesza et al., 2021). İrodoid monoterpenler, temel yapılarını monoterpenelerden alırlar ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için araştırılan doğal moleküllerdir. İki izopen biriminden oluşan irodoid monoterpenler, genel olarak şekerlerle kimyasal bağlar kurarlar ve glikozitleri oluştururlar (irodoid glikozitler). Bitkiler, biyotik ve abiyotik tehditlerden korunmak için birçok savunma mekanizması geliştirmiştir. Bu mekanizmalara örnek olarak, bitkilerin doğal olarak ürettiği ve sekonder metabolit olarak bilinen bileşiklerdir. Sekonder metabolit olan irodoid glikozitlerin, bitkiler için önemli, otla beslenen canlılardan ve üzerinde barınmaya çalışan diğer canlılardan korunmakla ilgilidir. İrodiod glikozitlerin diğer önemli özellikleri, bitliyi UV ışınlarına karşı koruma, bitkiler arasında rekabeti kontrol altına alma ve çiçeklerde nektar salgılamasıdır. Salgılanan nektar ile böceklerin ilgisi çekilir ve tozlaşma gerçekleşir.

Yani, irodoid glikozitlerin bulunduğu bitkiler daha geniş arazilere yayılabilir. Sonuç olarak, antimikrobiyal ve antifungal etkiler göstererek bitkiyi korumaktadır(ÇÖLGEÇEN & ATAR, 2013).

Günümüzde AH ilaç tedavisi için kullanılan AChE inhibitörleri ve NMDA reseptör modülatörleri henüz tatmin edici düzeyde değildir. Mevcut ilaçlar, semptomları hafifletmek ve hastalığın daha yavaş ilerlemesini sağlayabilir. Ancak, AH'ye sebep olan nedenlere etki göstermez. Monoterpen ve monoterpen türevleri, AH nöropatolojisinde birden fazla hedefe müdahale edebilme potansiyellerinden dolayı, AH'de yeni geliştirilecek olan ilaçlarlar için oldukça ilgi çekici bir gruptur. Bu bileşiklerin potansiyelleri birkaç başlık altında incelenebilir. Bunalr, Aβ'nin indüklediği nörotoksisitenin inhibisyonu ve beyinden uzaklaştırılması, düzensiz artan Tau fosforilasyonunda azalma, mitokondrial fonksiyonu ve kolinerjik sistemi destekleme, oksidatif stres ve nöroiflamasyonda azalmalardır. Gerçekleşen bu etkiler yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile ortaya koyulurken mekanizmalar henüz net olarak aydınlatılamamıştır (Wojtunik-kulesza et al., 2021).

Tez çalışmasının amacı, Alzheimer hastalığına yönelik mevcut tedavi yöntemlerinin yetersizliği ve yeni moleküler hedeflere duyulan ihtiyacın vurgulanmasıdır. Alzheimer hastalığının moleküler mekanizmalarını hedefleyen yeni terapötik ajanların keşfi, hastalığın ilerlemesini durdurma veya yavaşlatma potansiyeliyle tedaviye yönelik yeni yaklaşımlar sunabilir. Bu tez kapsamında, monoterpenlerin amiloid beta (Aβ) ile indüklenen Alzheimer modelindeki etkileri araştırılarak, Alzheimer hastalığı için potansiyel yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlanması amaçlanmaktadır (S. W. Wang et al., 2012). Elde edilecek bulgular, Alzheimer tedavisinde yeni moleküler hedeflerin ve stratejilerin belirlenmesine olanak tanıyabilir. Ayrıca bu çalışma, Alzheimer hastalığının moleküler temellerinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayarak, gelecekteki araştırmalar için önemli bir bilimsel zemin oluşturacaktır. Böylece, Alzheimer tedavisinde mevcut paradigmaları dönüştürebilecek yeni yaklaşımların geliştirilmesine doğrudan katkıda bulunulması hedeflenmektedir (Dinda et al., 2019).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Marumoto ve arkadaşları (2017), yaptıkları çalışmada β-sekretaz (BACE1**)** enzimini inhibe etmeyi hedeflemiştir. Bu işlem için 80 adet aday molekül belirlenmiş ve seçilen moleküller içerisinde monoterpenler, seskiterpenler ve C13 norizoprenoidler gibi aromatik bileşikler bulunmaktadır. Rekombinant insan BACE1 enzimi üzerine yapılan çalışma, 200 μM konsantrasyonda test edilmiştir. Araştırma bulgularına göre, monoterpen sınıfında olan geranil aseton ve kafur gibi bileşikleri, BACE1 enzimini anlamlı bir şekilde inhibe etmiştir. Geranil aseton, BACE1 enzimi için en güçlü inhibitör olarak belirlenmitir ve inhibisyon için olası mekanizmalar detaylı bir şekilde incelenmiştir. Elde edilen bulgular ışığında, monoterpenlerin, AH tedavisinde öncü molekül olabileceği vurgulanmıştır (Marumoto et al., 2017).

Bi ve arkadaşları (2008), *Rehmannia glutinosa* bitkisinin kökünden izole ettikleri katalpol'ün, oksidatif stresle oluşmuş hasarı koruyup korumayacağını araştırmıştır. Katapol, irodoid bir glikozittir ve Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda ilişkilendirilen, hidrojen peroksit (H_2O_2)'nin oluşturduğu hasara karşı koruyucu etkinliği incelenmiştir. Araştımada, Astrositler kullanılmıştır. Araştırma bulgularına göre, katalpol, hücre canlılığını arttırmış ve hücre içerisinde oluşan ROS'u anlamlı bir biçimde azaltmıştır. Ayrıca, glutasyon redoks döngüsündeki enzim aktiviteleri korunmuştur. Elde edilen bulgular ışığında, katalpol, oksidatif stres kaynaklı oluşan nörodejeneratif hastalıkların önlenmesi veya tedavi edilmesinde potansiyel olarak öncü molekül olabileceği önerilmiştir (Bi et al., 2008).

Wang ve arkadaşları (2015), kapatol'ün, Aβ ile oluşturulan AH modellerinde kolinerjik ekspresyon ve aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmaya, hem PC12 hücrelerie hem de sıçanlara Aβ uygulaması ve kolin asetil-transferaz düzeyinin anlamlı bir şekilde düşürülmesi ilebaşlanmıştır. Modellere uygulanan katalpol, azalan kolin asetil-transferaz düzeyini anlamlı bir şekilde tersine çevirmiştir. Elde edilen bulgular ışığında, katalpol, kolinerjik sistem fonksiyonlarını destekleyebileceği ve AH tedavisinde potansiyel olarak öncü molekül olabileceği önerilmiştir (J. hong Wang et al., 2015).

Hur ve arkadaşaları (2012), yaptıkaları çalışmada doğal bir monoterpen olan borneol'ün, SH-SY5Y (insan nöroblastom hücre hattı) ile oluşturulan AH modelinde antioksidatif, antiapoptotik ve nöroprotektif etkilerini araştırılmışlardır. Aβ ile oluşturulan toksisite sonucunda hücre canlılığı azaltılmış ve 100 μM konsantrasyonda borneol uygulanmıştır. Araştırma bulgularına göre, borneol, azalan hücre canlılığını anlamlı bir şekilde korumuş, ROS üretiminde anlamlı bir azalmaya yol açmış ve apoptoz belirtileri olan Bcl-2/Bax oranını olumlu yönde değiştirerek hücre ölümünü baskılamıştır. Elde edilen bulgular ışığında, borneol, AH'de Aβ ile ilişkili toksisiteye karşı koruyucu etki göstererek, AH tedavisi için umut vadedici ajan olabileceği önerilmiştir (Hur et al., 2013).

Khan ve arkadaşları (2013), yaptıkları çalışmada doğal bir monoterpen bileşiği olan 1,8-sineol'ün (Cin), Aβ ile indüklenen AH modelinde inflamatuar ve nöroprotektif etkilerini araştırmıştır. Araştırmada, PC12 hücreleri kullanılmıştır ve Aβ ile hücre canlılığı azaltılmıştır. Ardından Cin tedavisi uygulanmış ve mitokondrial disfonksiyon, ROS ve NO üretimi, proinflamatuar sitokin (TNF-α, IL-1β gibi) seviyelerinde anlamlı azalmalar sağlanmıştır. Ayrıca iltihaplanma ile ilişkili bazı proteinler baskılanmıştır. Elde edilen bulgular ışığında, 1,8-sineol, AH tedavisinde potansiyel anti-enflamatuar ajan olabileceği önerilmiştir (Islam et al., 2014).

Martínez ve arkadaşları (2016), doğal monoterpen bileşiği olan **1**,8-sineol ve α-pinenin, H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif strese karşı PC12 hücrelerinde anti oksidan ve koruyucu etkinlikleri araştırılmıştır. Her iki bileşikte, hücre canlılığını korumuş, ROS üretimini azaltmış ve antioksidan enzim seviyelerini arttırmıştır. Ayrıca bileşikler, kaspaz-3 aktivitesini düşürerek apoptozu engellemiştirler. Elde edilen bulgular ışığında, 1,8-sineol ve α-pinenin, ROS temizlenmesi ve Nrf2 yolunu aktifleştirme özellikleri ile nörodejeneratif hastalıklarda oluşan oksidatif hasarı azatlmada kullanım potansiyeline sahip bileşikler olarak önerilmiştir (Porres-Martínez et al., 2016).

Nam ve arkadaşları (2010), gardenya meyvesinden izode edilen ve irodoid yapıda olan genipinin, şıcan kökenli mikroglia aktivasyonu üzerine etkilerini araştırmıştır. Hücreler, LPS, interferon-gama ve Aβ gibi iltihaplanma tetikleyici maddeler ile uyarılmış

ve uygulanan genipinin ile NO, proinflamatuar sitokin ve ROS oluşumu anlamlı bir şekilde azalmıştır. Ayrıca genipin, iltihapla ile ilgili olan bazı yolakaları baskılamıştır. Deneysel olarak iltihaplanma yapılan fare deneylerinde ise, genipin, mikrogliaların aşırı çalışmalarını engellemiş ve beyin hücreleri üzerine koruyucu bir etki göstererek, nörodejeneratif hastalıklar için potansiyel bir anti-inflamatuar bir ajan olabileceği ortaya konulmuştur (Nam et al., 2010).

Zhang ve arkadaşları (2015), yaptıkları çalışmada irodoid bileşik olan geniposid'in, primer kortikal nöronlarda Aβ ile oluşturulan toksisitesiyi araştırılmıştır. Geniposid, GLP-1 reseptörü üzerinden hareket ederek insülin parçalayan enzim ekspresyonunu artırmış ve dolaylı olarak Aβ'nın oluşturduğu toksisiteyi hafifletmiştir. Bazı inhibitörler ile yapılan deneylerde, bu etkinin PI3K, PPARγ, c-Src, EGFR ve PKA yolakları aracılığıyla gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular ışığında, geniposid, AH için umut vadeden bir ajan olabileceği ortaya konulmuştur (Zhang et al., 2015.).

Kaufman ve arkadaşları (2011), AH'de önem arz eden ve tedavi için sürekli hedef alınan AChE inhibisyonuna yönelik bazı doğal bileşiklerin potansiyel etkinliklerini araştırmıştır. Bu amaçla, çeşitli monoterpen yapıdaki uçucu yağ bileşikleri kullanılmış ve in vitro AChE inhibitör etkinlikleri değerlendirilmiştir. Çalışmada Ellman'ın kolorimetrik testi uygulanarak 1,8-sineol, karvakrol, mirtenal ve verbenon gibi bileşiklerin AChE etkinlikleri belirlenmiştir. Araştırma bulgularına göre, özellikle mirtenal en güçlü inhibitör etkisi göstermiştir. Elde edilen bulgular ışığında, ilk defa etkinliği belirlenen mirtenal, kolinerjik sistem fonksiyonlarını destekleyebileceği ve AH tedavisinde potansiyel olarak öncü molekül olabileceği önerilmiştir (Kaufmann et al., 2011).

Li ve arkadaşları (2014), yaptıkları çalışmada paeoniflorin'in, Aβ'nın indüklediği mitokondriyal disfonksiyon üzerine etkisini araştırmıştır. Çalışmada kullanılan paeoniflorin, *Radix Paeoniae alba* bitkisinden izole edilmiştir ve PC12 hücrelerine uygulanmıştır. Araştırma bulgularına göre, Aβ nedeniyle oluşan hasar azalmış, mitokondrial membran potansiyeli korunmuş, sitokrom c salınımı düşmüş ve apoptoz belirteçleri alan kaspaz-3 ve kaspaz-9'un baskılanmış olduğu gözlemlenmiştir. Elde

edilen bulgular ışığında, paeoniflorin, AH'de Aβ ile ilişkili toksisiteye karşı koruyucu etki göstererek, AH tedavisi için umut vadedici ajan olabileceği önerilmiştir (J. Li et al., 2014).

Zhong ve arkadaşları (2013), Lamiaceae familyasından izole edilen ve monoterpen bir bileşik olan karvakrol'ün, nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilen serebral ödem üzerindeki nöroprotektif etkisini araştırmıştır. Karvakrolün çalışmada, bakteriyel kollajenaz ile indüklenen intraserebral kanama (ICH) fare modelinde, serebral ödem ve nörolojik disfonksiyon üzerindeki etkileri incelenmiştir. Araştırma bulgularına göre, ICH sonrasında gözlemlenen serebral ödenin iyileştiği gösterilmiştir. Özellikle, Aquaporin 4 protein ekspresyonunun üçüncü günden itibaren anlamlı bir şekilde düştüğü ve iyileşen ödemin Aquaporin 4 aracılı olduğu düşünülmektedir. Elde edilen bulgular ışığında, karvakrol, nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde potansiyel bir terapi ajanı olarak önerilmiştir (Zhong et al., 2013.).

Huang ve arkadaşları (2016), yaptıkları çalışmada katalpol'ün, AH üzerinde koruyucu etkinliğini kemirgen modelleri kullanarak araştırmıştır. Katalpol, Rehmannia cinsinden izole edilen irodoid bir glikozittir ve etkinliği oksidatif stres, Aβ ve bilişsel aktivitede değerlendirilmiştir. Araştırma bulgularına göre, katalpol, ROS ile ilişkili olan enzimlerin aktiviteleri ve konstrasyonunda anlamlı bir düşüşe sebep oluken, bazı zararlı bileşenlerin seviyelerinde değişikliğe sebep olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca, serebral kortekste bulunan Aβ türevlerinin seviyelerini azaltarak yaşlılık plaklarının oluşumunu engellemiştir. Elde edilen bulgular ışığında, katalpol, Aβ plaklarının birikimini engelleyerek nöroprotektif etkiler göstermiş ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde potansiyel bir ilaç olarak kullanılabileceğini önerilmiştir (Huang et al., 2016).

Zhang ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan başka bir çalışmada, irodoid yapıda olan geniposidin, AH ve diyabet ilişkisini anlamak için *in vivo* ila *in vitro* modellerle araştırılmıştır. Araştırma, geniposidin pankreatik β hücrelerinden glikozla uyarılan insülin salınımını desteklediğini ve Aβ ile oluşturulan sitotoksik etkiyi azalttığını ortaya koymuştur. Ancak, geniposidinin beyindeki insülin sinyal yolakalarını nasıl düzenlediğine dair mekanizmalar anlaşılamamıştır. Bu amaçla, AH transgenik fare

modelinde streptozotosin uygulaması yapılarak insülin eksikliği indüklenmiştir, ardından geniposidin APP'nin β-amiloidojenik işlenme etkileri değerlendirilmiştir. Araştırma bulgularına göre, streptozotosin tedavisinin vahşi tip ve APP/PS1 transgenik farelerinde insülin düzeyinde belirgin düşüşler gösterilmiştir. Bununla birlikte, 4 haftalık bir periyotta uygulanan geniposid tedavisi, Aβ türevlerinde anlamlı bir azalmaya yol açmıştır. Elde edilen bulgular ışığında, geniposidin, APP işlemede ve insülin sinyalizasyonunda önemli bir düzenleyici rol üstlenebildiğini ve AH tedavisinde potansiyel bir ajan olabileceğini önermiştir (Y. Zhang et al., 2015).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve marka/model listesi

Cihaz Adı	Cihaz Marka/Model Adı
(+) 4°C Soğutucu	J.P. Selecta
(-) 20°C Soğutucu	J.P. Selecta
(-) 80°C Derin dondurucu	Thermo Sciencific FDE
Class II Laminer Kabin	ESCO NotdicSafe^{TM}
Hassas Terazi	OHAUS
İnkübatör (37°C de %5 CO)	ESCO Cell Culture
Mikroplaka Okuyucu	Biotek, EPOCH
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Vorteks	WisdWisemix VM-10
İnvert Mikroskop	Leica DFC450C

Çizelge 3.2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasalların listesi

Kit ve Kimyasal Adı	Marka Adı
EMEM	Sigma-Aldrich® (Almanya)
Etanol	Merck (Almanya)
FBS (Fetal Bovin Serum)	Gibco® (ABD)
Hoecehst 33258 Floresan Boya	Sigma-Aldrich® (Almanya)
MTT-Assay Kit	Sigma-Aldrich® (Almanya)
PBS (Fosfat Buffer Saline)	Sigma-Aldrich® (Almanya)
Penisilin/Streptomisin	Sigma-Aldrich® (Almanya)
Siproflaksasin	Sigma-Aldrich® (Almanya)
(–)-Caryophyllene oxide (%95)	Sigma-Aldrich® (Almanya)
Eucalyptol (%99)	Sigma-Aldrich® (Almanya

Çizelge 3.2. **(devam)**

Kit ve Kimyasal Adı	**Marka Adı**
(±)-Isoborneol (≥ 90.0%)	TCI (Tokyo Chemical Industry)
Linalyl acetate (%95)	Thermo Scientific Chemicals
Colsemid Solution	Caprıcorn Scıentifie
Amyloid β peptide(42-1)	Bostonchem

3.2. Monoterpenlerin Biyogüvenlik Analizleri

3.2.1. Hücre kültürü

Tez çalışması kapsamında, in vitro biyogüvenlik çalışmaları için HMC3 (ATCC®, CRL-3304™) insan mikroglial hücre hattı kullanılmıştır. Amerikan Tip Kültür Koleksiyonundan (ATCC) satın alınan hücre hatları, %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin antibiyotiği ile desteklenmiş Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) besi ortamında, %5 CO_2 içeren inkübatörde 37°C'de kültüre edilmiştir. Hücreler, her iki veya üç günde bir kontrol edilerek %70-80 konfluense ulaşan hücreler haftada en az iki kez pasajlanmış ve çoğaltılmıştır. Hücreler, besiyerinden ayrıldıktan sonra, Fosfat Buffer Salin (PBS) ile yıkanmış ve %0,05 tripsin/EDTA eklenerek 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler, tripsini inhibe etmek için besiyeri ile işlem gördükten sonra, 15 ml'lik tüplere alınarak 1200 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. 96 kuyucuklu bir hücre kültür plakasına istenilen sayıda hücre ekilmiş ve terpen molekülleri ile belirlenen konsantrasyonlarda üç tekrarlı olarak 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Yapılan biyogüvenlik testlerinde deney kontrolü ve kıyasması için negatif ve pozitif kontroller, deneylere entegre edilmiştir.

3. 2. 2 Hücre canlılık analizi

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) testi, hücre canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksisitesinin bir göstergesi olarak hücresel metabolik aktiviteyi ölçmek için yaygın olarak kullanılan bir sitotoksisite testidir. Bu analiz yönteminde, MTT, formazana indirgenir ve bu sırada meydana gelen renk,

kolorimetrik olarak ölçülür. 96 kuyucuklu hücre kültür plakasına ekilen ve 1 gün tutunması beklenen hücrelere, geniş doz aralığında (4000, 2000, 1000, 500, 250, 125 ve 62.5 µM) 3 terkrarlı olacak şekilde terpen molekülleri uygulanmış (Negatif ve pozitif kontrol grupları hariç) ve muamele olması için 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hücreler, her bir kuyuya 5 mg/ml konsantrasyonda MTT solüsyonu eklenerek 37°C'de 3 saat inkübe edilmiştir . İnkübasyon süresinin sonunda, kuyucuklarda oluşan formazan tuzu kristalleri mikroskop altında kontrol edilmiş ve ardından bu kristalleri çözmek için 100 µL DMSO uygulanmıştır. Analizin son kısmında, 96 kuyucuklu plaka bir mikroplaka okuyucusunda 570 nm'de analiz edilmiştir. Moleküllerle muamele edilmiş kuyulardan okunan optik yoğunluk, kontrole karşı canlı hücrelerin yüzdesi olarak hesaplanamıştır. Elde edilen veriler, kontrolün ortalama % fraksiyonu ± standart hata sapması olarak ifade edilmiştir.

3. 2. 3. Nükleer anomali analizi

Hoechst 33258 boyası, mutasyona uğramış çekirdekleri tespit etmek için kullanılmıştır. Terpen molekülleriyle 24 saat boyunca muamele edilen hücrelerin eski besiyeri uzaklaştırılmış ve ardından PBS ile iki kez yıkanmıştır. Hücreler, %4 gluteraldehit içeren PBS içinde 30 dakika karanlıkta inkübe edilmiş, fikse edilme periyodunun sonunda, gluteraldehit çözeltisi uzaklaştırılmış ve hücreler birkaç kez PBS ile yıkanmıştır. Fikse edilen hücreler, Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich®) boyası ile 5 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlıkta muamele edilecektir. Son olarak, örnekler floresan mikroskobu kullanılarak fotoğraflanmıştır.

3. 2. 4. Kromozomal aberrasyon testi

Kromozomal aberasyon (CA) testi, kromozomların yapı ve sayısındaki anormal değişimleri saptamak için kullanılmıştır. Kültürlenen ve 24 saat inkübe edilen HMC-3 hücre hattı, terpen molekülleriyle 3 saat boyunca muamele edilerek sonuçlar belirlenmiştir. 24 saat olarak başlatılan deneyin 21.saatinde ortama kolşisin uygulaması yapılarak, kromozomların metafaz plağında durması sağlanmıştır. Süre sonunda tripsinizasyon işlemi yapılmış ve 10 dakika süreyle 900 rpm'de santrifüj edilmiştir.

Ardından pellete, vortex üzerinde KCI ile hazırlanan hipotonik çözelti uygulanmış ve 5-10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek, 10 dakika süreyle 900 rpm'de santrifüj edilmiştir. Son olarak, metanol ve asetik asitle hazırlanan fiksitatif çözelti ile oluşan pelletler muamele edilerek, süspansiyon haline getirilmiştir, bir Pasteur pipeti kullanılarak, yıkanmış ve 4°C'de saklanmış önceden etiketlenmiş lamellere damlatılmıştır. Lameller 1 gün boyunca kurumaya bırakılmış ve daha sonra 15 dakika süreyle Giemsa boyası ile boyanmıştır. Boyama işleminden sonra, lamellerin tamamen kuruması için 1 gün daha bekletilmiştir. Daha sonra, her test grubu için otuz metafaz plakası incelenmiş ve kromozom kromatin seviyesindeki boşluklar veya kırıkların varlığı değerlendirilerek her grubun ortalama kromozomal aberrasyon değeri hesaplanmıştır.

3. 3. *In Vitro* Anti-Alzheimer Hastalığı Etkilerinin İncelenmesi

İn vitro Alzheimer hastalığı modeli, HMC3 (ATCC®, CRL-3304™) insan mikroglial hücre hattının %80 konfluense kadar büyütülmesi ve amiloid beta (Aβ) molekülünün hücre kültürlerine entegrasyonu yoluyla oluşturulmuştur. Öncelikle, Aβ hücre kültürlerinde %50 hücre ölümüne neden olacak dozunun belirlenmesi için geniş doz aralığında (1 µM - 500 µM) 24 saat boyunca hücre kültürü ortamında inkübe edilmiştir. Aday terpenler oluşturulacak olan Aβ toksisite modeline geniş doz aralıklarında ve toksik olmayan konsantrasyonlarda (0,1, 1, 10 ve 100 µM) 24 saat boyunca hücre kültürlerine uygulanmış ve hücreler, her bir kuyuya 5 mg/ml konsantrasyonda MTT solüsyonu eklenerek 37°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, kuyucuklarda oluşan formazan tuzu kristalleri mikroskop altında kontrol edilmiş ve ardından bu kristalleri çözmek için 100 µL DMSO uygulanmıştır. Analizin son kısmında, 96 kuyucuklu plaka bir mikroplaka okuyucusunda 570 nm'de analiz edilmiştir. Moleküllerle muamele edilmiş kuyulardan okunan optik yoğunluk, kontrole karşı canlı hücrelerin yüzdesi olarak hesaplanacaktır. Elde edilen veriler, kontrolün ortalama % fraksiyonu ± standart hata sapması olarak ifade edilecektir.

3. 3. 1. Akış sitometrisi ile apoptoz analizi

Flow sitometrik yöntemi, ticari olarak satılan propidyum iyodür içeren annexin V-FITC apoptoz saptama kiti ile hücrelerde apoptoz/nekroz tespiti ile yapılmıştır. Moleküller ile 24 saat boyunca muamele edilen hücreler, tripsinizasyon işlemiyle ayrıştırıldıktan sonra falkon tüplerine aktarılıp 5000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek toplanmıştır. Pelette çöken hücreler annexin 1x bağlanma tamponu ile süspanse edilip hücre süspansiyonu 5 mL'lik bir test tüpüne aktarılmış ve sırasıyla 5 µL FITC annexin V ve 10 µL propidyum iyodür solüsyonu eklenerek, hücreler yavaşça vortekslenmiştir. Sonrasında karanlıkta oda sıcaklığında (25°C) 15 dakika inkübe edilen hücreler, CyFlow® (Cube 6, Almanya) cihazına alınarak analiz edilmiştir.

3. 3. 2. TAS ve TOS analizi

Optimize edilmiş kitler yardımıyla TAK ve TOS analizleri, kültürlerden alınan numunelerle gerçekleştirilmiştir. Piyasaya sürülen kitler (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) tarafından üreticisinin tarif ettiği şekilde oluşturulan AH modelinde, süpernatanttan alınan numunelere eklenerek ve belirli bir dalga boyunda spektrofotomete kullanılarak absorbans değerleri ölçülerek belirlenmiştir. Sonuç olarak ortamdaki antioksidan değer değişimleri ve oksidatif sitres durumları tespit edilmiştir.

3. 3. 3. Asetilkolinesteraz (AchE) aktivitesinin belirlenmesi

Hücrelerin AchE aktivitesi, Asetil Kolinesteraz Test Kiti (Abcam®. Cambridge, MA, ABD) kullanılarak üreticinin önerdiği protokole göre belirlenmiştir. Buna göre daha önce uygulanan sekilde terpenler ile muamele edilen deneysel Alzheimer hastalığı modelleri 100 ml lizis tamponu ile 15 dakika inkübe edilmiş ve elde edilen supernatant 50 ml asetilkolin reaksiyon karışımı ile 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 410 nm dalga boyunda spektrofotomete kullanılarak absorbans değerleri ölçülmüştür.

3. 3. 4. İstatistiksel analiz

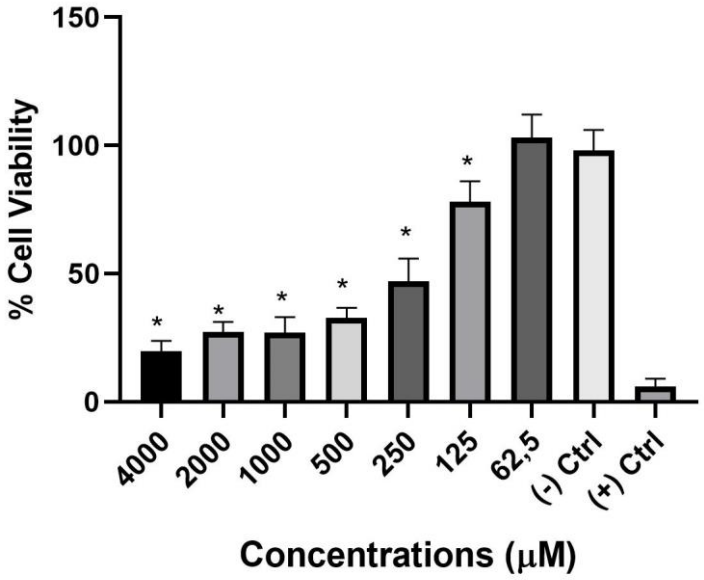
İstatistiksel analizler, Tek Yönlü ANOVA prosedürü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Moleküllerin hücreler üzerindeki etkileri, kontrol grubu ile karşılaştırılarak Dunnett post-hoc testi ile analiz edilmiştir. Anlamlılık düzeyi %5 olarak kabul edilmiş ($p < 0.05$). Tüm deneyler üç bağımsız tekrar ile yürütülmüş ve verilerin değerlendirilmesinde GraphPad Prism 7.0 yazılımı kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Biyogüvenlik Analizleri

4.1.1. Sitotoksisite analizleri

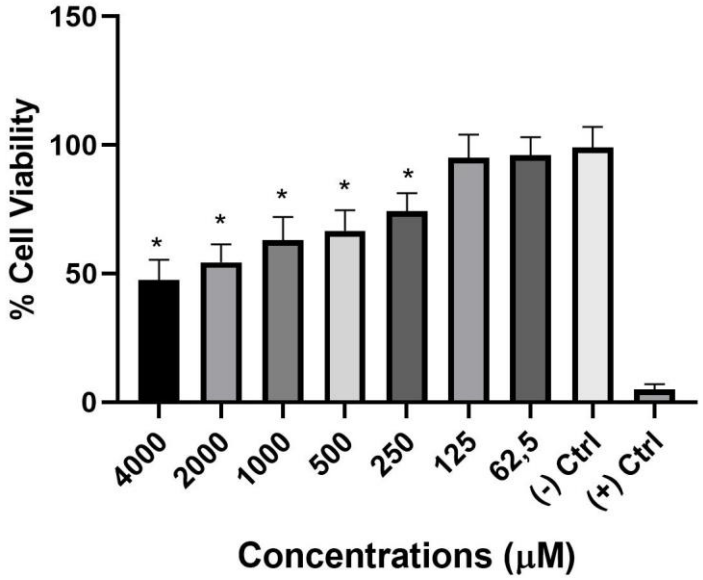
Tez çalışması kapsamında, sitotoksitete analizleri için insan mikroglial hücre hattı (HMC-3) kullanılmış ve belirlenen 4 terpen molekülü hücreler ile 24 saat muamele edilmiştir. Elde edilen hücre canlılık sonuçları ise kullanılan 4 terpen molekülü için ayrı ayrı Şekil 4.1, Şekil 4.2 Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.1. (–)-Caryophyllene oxide molekülünün HMC-3 hücre hattındaki sitotoksisite analizleri.

Caryophyllene oxide molekülünün hücre canlılığı 62.5 µM ila 4000 µM arası konsantrasyonlarda, MTT testi ile belirlenmiştir. Sonuçlar, en yüksek konsantrasyon olan 4000 µM'da scanlılığın yaklaşık %20 olduğunu gösterirken 2000 ve 250 µM dozları arasında da bu etkinin devam ettiği ve negatif kontrol grubuna göre canlılığın anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. Ancak canlılığın göreceli olarak arttığı, düşük konsantrasyonlarda (120 ve 62.5 µM) ise canlılığın anlamlı bir şekilde korunduğu

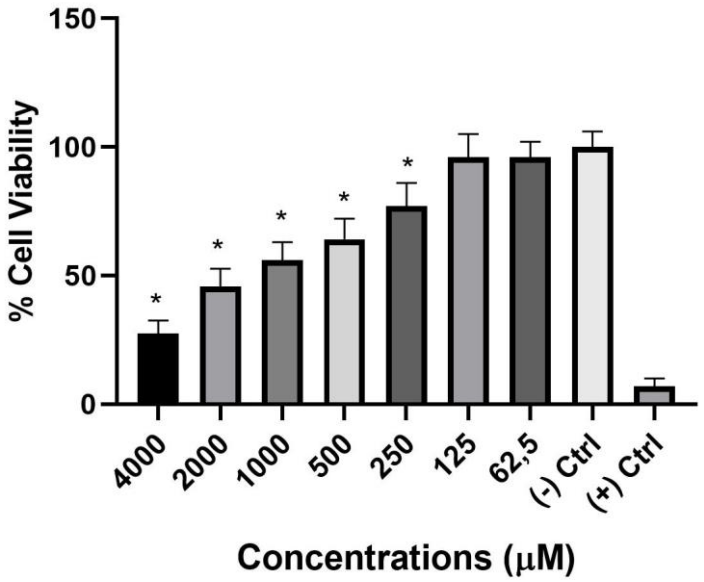
bulunmuştur. Sonuç olarak, HMC-3 hücrelerine yüksek konsantrasyonlarda uygulanan Caryophyllene oxide, belirgin bir sitotoksisite gösterirken azalan konsantrasyonlarda etkimliğini kaybederek canlılığı etkilememektedir. Elde edilen veriler, Caryophyllene oxide'un HMC-3 hücreleri üzeinde doza bağımlı sitotoksik etkiye sahip olduğunu gösterirken, Sameh ve arkadaşlarının 2023 yılında yaptığı çalışma ile paralellik göstermektedir. Sözü geçen çalışma Caryophyllene oxide'un çeşitli kanser hücre hatlarında antiproliferatif etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Shabana et al., 2023). Benzer şekilde, Katsuyama ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptığı *in vivo* ve *in vitro* klinik öncesi çalışmada, Caryophyllene oxide'un antiinflamatuvar etkisinin yanı sıra belirli merkezi sinir sistemi hastalıklarında umut vaad ettiğini raporlamıştır (Francomano et al., 2019). Yapılan bu çalışmalar, molekülün doza bağımlı bir toksisiteye sahip olduğu ve biyogüvenlik değerlendirmelerinde bu özelliğinin dikkate alınması gerektiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.2. Eucalyptol molekülünün HMC-3 hücre hattındaki sitotoksisite analizleri.

Eucalyptol molekülünün hücre canlılığı 62.5 μM ila 4000 μM arası konsantrasyonlarda, MTT testi ile belirlenmiştir. Sonuçlar, en yüksek konsantrasyonlarda (4000 μM- 1000 μM) canlılığın anlamlı bir şekilde azaldığını gösterirken, ara dozlarda da bu etkinin devam ettiği ve negatif kontrol grubuna göre canlılığın anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. Ancak canlılığın göreceli olarak

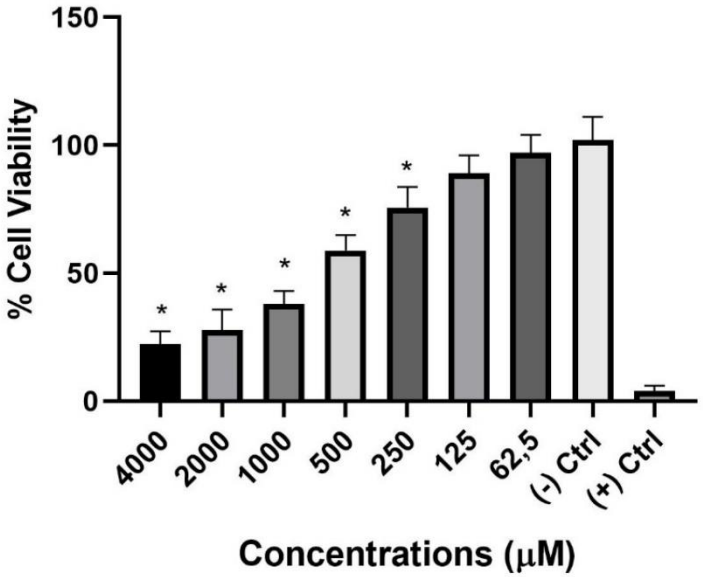
arttığı, düşük konsantrasyonlarda (120 ve 62.5 µM) ise, canlılığın anlamlı bir şekilde korunduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, HMC-3 hücrelerine yüksek konsantrasyonlarda uygulanan Eucalyptol, belirgin bir sitotoksisite gösterirken azalan konsantrasyonlarda etkimliğini kaybederek canlılığı etkilememektedir. Literatür incelendiğinde, elde edilen bulguları desteklemektedir. Antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve nanopartikül ile birleştiğinde antikanser etkinlik gösterdiği bildirilen Eucalyptol, yapılan çalışmalarda yüksek doz ile sitotoksik etkiler göstermiş (Izham et al., 2021; Pries et al., 2023)ve benzer *in vivo* modellerde, membran bütünlüğünü bozan Aβ'nın etkisini azalttığı raporlanmıştır (Kim et al., 2020). Yapılan bu çalışmalar, molekülün doza bağımlı bir toksisiteye sahip olduğu ve biyogüvenlik değerlendirmelerinde bu özelliğinin dikkate alınması gerektiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.3. Isoborneol molekülünün HMC-3 hücre hattındaki sitotoksisite analizleri.

Isoborneol molekülünün hücre canlılığı 62.5 µM ila 4000 µM arası konsantrasyonlarda, MTT testi ile belirlenmiştir. Sonuçlar, yüksek konsantrasyonlarda (4000 µM- 1000 µM) canlılığın anlamlı bir şekilde azaldığını (%50'nin altında) gösterirken, ara dozlarda da bu etkinin devam ettiği ve negatif kontrol grubuna göre canlılığın anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. Ancak canlılığın göreceli olarak arttığı, düşük konsantrasyonlarda (120 ve 62.5 µM) ise, canlılığın anlamlı bir şekilde korunduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, HMC-3 hücrelerine yüksek konsantrasyonlarda

uygulanan Isoborneol, belirgin bir sitotoksisite gösterirken azalan konsantrasyonlarda etkimliğini kaybederek canlılığı etkilememektedir. Yapılan çalışmada Isobornel, doza bağımlı sitotoksik etki göstermiştir. Literatürde, SH-SY5Y hücrelerinde 6-OHDA ile indüklenen Parkinson hastalığı için, isoborneol ile koruyucu etkinlik belirlenmiştir. İsoborneol, 6-OHDA'nın sebep olduğu ROS ve artan hücre içi kalsiyum oranını anlamlı bir şekilde düşürmüştür. Sonuç olarak, izoborneol, nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılma potansiyeli olduğu ortaya konmuştur (Physiology, 2007).



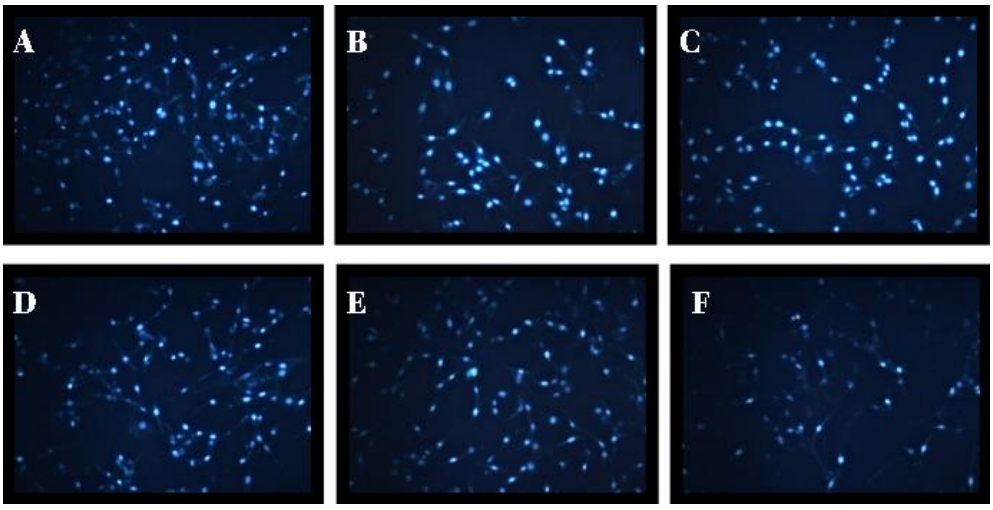
Şekil 4.4. Linalyl acetate molekülünün HMC-3 hücre hattındaki sitotoksisite analizleri.

Linalyl acetate molekülünün hücre canlılığı 62.5 µM ila 4000 µM arası konsantrasyonlarda, MTT testi ile belirlenmiştir. Sonuçlar, yüksek konsantrasyonlarda (4000 µM- 1000 µM) canlılığın anlamlı bir şekilde azaldığını (%50'nin altında) gösterirken, ara dozlarda da bu etkinin devam ettiği ve negatif kontrol grubuna göre canlılığın anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. Ancak canlılığın göreceli olarak arttığı, düşük konsantrasyonlarda (120 ve 62.5 µM) ise, canlılığın anlamlı bir şekilde korunduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, HMC-3 hücrelerine yüksek konsantrasyonlarda uygulanan Linalyl acetate, uygulanan diğer terpenler gibi doza bağımlı çift yönlü etki göstermiştir. Literatürde, linalyl acetate'ın, glial hücrelerde oluşturulan inflamasyon üzerine etkileri incelenmiştir. Düşük dozlarda inflamasyonu baskıladığı gözlemlenirken, yüksek dozlarda membran bütünlüğünü bozarak sitotoksisiteyi arttırdığı rapor edilmiştir.

Benzer şekilde, yapılan başka bir çalışmada, Linalyl acetate'ın nöron hücrelerinde doza bağlı sitotoksisiteyi arttırdığı, bunuda mitokondriyal disfonksiyona sebep olarak gerçekleştirebileceği bildirilmiştir (Jongwachirachai et al., 2024; Shin & Seol, 2023; Peana et al., 2002). Ayrıca, Linalyl acetate'ın, antioksidan ve nöron koruyucu etkilerinin varlığı, birkaç çalışmada gösterilmiştir. Bu bulgular, yapılan tez çalışmasını destekler niteliğinde ve sitotoksik etkilerle örtüşmektedir.

4.1.2. Genotoksisite analizleri

Tez çalışması kapsamında, genotoksisite analizleri Hoechst 33258 boyası ve kromozomal aberasyon testi ile değerlendirilmiştir. Çalışmada, insan mikroglial hücre hattı (HMC-3) kullanılmış ve belirlenen 4 terpen molekülü hücreler ile 3-24 saat muamele edilmiştir. Hoechst boyası ile yapılan floresan mikroskop analizleri, 1000 hücre çekirdek morfolojisindeki mutansyonalar (MN, lob, çentik) incelenerek belirlenmiştir. Kromozomal aberasyon testi ise, invert mikroskobu altında, bölünme sırasında oluşan kromozomlar üzerindeki anormallikleri (kromozom/kromatin kırığı, tetrat/uçlardan birleşme ve diğer anormallikler) ortalama 500 set incelenerek belirlenmiştir. Yapılan testler ile elde edilen görüntüler ayrı ayrı Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'da verilmiş, elde edilen anomali sonuçları ise Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'de verilmiştir.

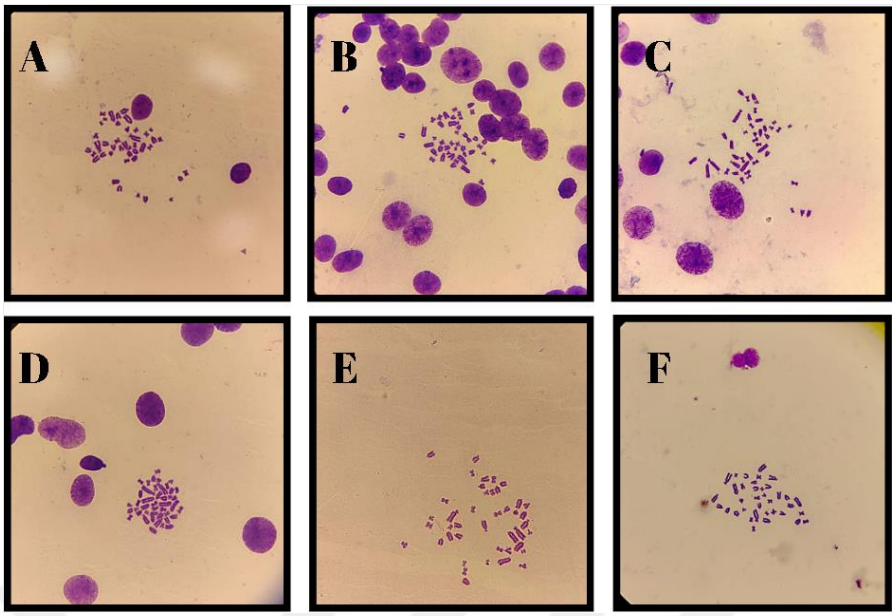


Şekil 4.5. Terpen moleküllerinin HMC-3 hücre hattında, çekirdek anomalisinin Hoechst floresan boyası ile tespiti. A; (–)-Caryophyllene oxide, B; Eucalyptol, C; Isoborneol, D; Linalyl acetate, E; (-) Kontrol, F; Beta amiloid.

Çizelge 4.1. Terpen moleküllerinin HMC-3 hücre hattında 24 saat (10 μM) uygulaması sonucunda incelenen nükleer anomalileri. (MN: Mikro Nükleus, aynı üslü harfler (a ve b) istatistiksel olarak benzer grupları temsil eder.

Nükleer anomaliler (NA)				
	Toplam MN	**Toplam Loblu**	**Toplam Çentikli**	**Ortalama NA/1000 hücre ± SD**
(-) Kontrol	8	6	3	0.017±0.0013[a]
Beta Amyloid	12	9	8	0.029±0.0011[b]
Caryophyllene Oxide	9	7	9	0.025±0.0019[a]
Eucalyptol	6	9	4	0.019±0.0018[a]
Isoborneol	5	6	7	0.018±0.0012[a]
Linalyl Acetate	7	8	4	0.019±0.0015[a]

Hoechst boyası ile yapılan floresan mikroskop analizleri, Aβ uygulamasının yapıldığı grupta nükleer morfoloji bozulmuş ve anomalilerin anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir. Aβ grubunda toplam nükleer anomali sayısı 29 olarak hesaplanmış ve ortalama NA değeri 0.029 ± 0.0011 olarak belirlenmiştir. Buna karşılık, terpen uygulanan gruplarda bu anomalilerin önemli ölçüde azaldığı ve negatif kontrol düzeyine yakın değerlere gerilediği görülmüştür. Özellikle Isoborneol (0.018 ± 0.0012) ve Eucalyptol (0.019 ± 0.0018) gruplarında nükleer anomali düzeylerinin düşük seyretmesi, bu bileşiklerin Aβ kaynaklı morfolojik bozulmaları sınırlandırabildiğini göstermektedir. Elde edilen bu bulgular, terpen bileşiklerinin sadece sitotoksisiteyi değil, aynı zamanda çekirdek bütünlüğünü de koruyarak genotoksik etkilere karşı potansiyel koruyucu bir rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.6. Terpen moleküllerinin HMC-3 hücre hattında, kromozom anomalisinin Giemsa boyası ile tespiti. A; (–)-Caryophyllene oxide, B; Eucalyptol, C; Isoborneol, D; Linalyl acetate, E; (-) Kontrol, F; Beta amiloid.

Çizelge 4.2. Terpen moleküllerinin HMC-3 hücre hattında 24 saat (10 µM) uygulaması sonucunda incelenen nükleer anomalileri. (Aynı üslü harfler (a ve b) istatistiksel olarak benzer grupları temsil eder.

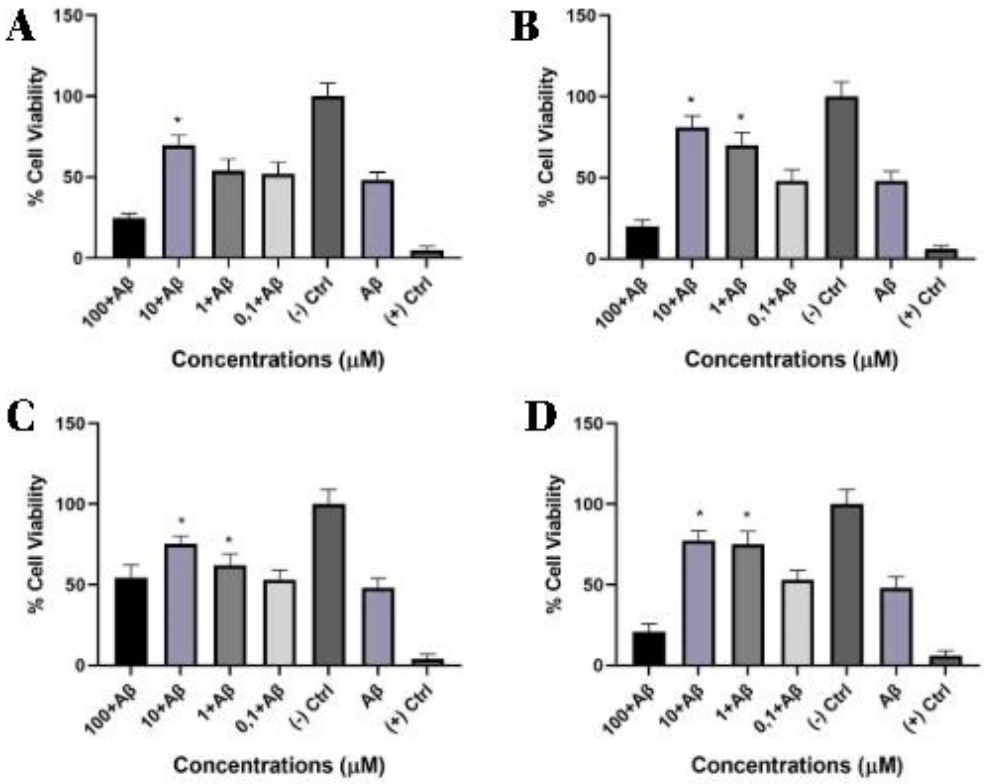
	Kromozomal anomaliler (KA)			
	Kromozom/kromatin kırığı	**Tetrat/uçlardan birleşme**	**Diğer anormallikler**	**Ortalama KA/500 hücre ± SD**
(-) Kontrol	5	4	4	0.026 ± 0.0013[a]
Beta Amyloid	11	14	12	0.074 ± 0.0011[b]
Caryophyllene Oxide	8	6	6	0.040 ± 0.0019[a]
Eucalyptol	7	6	5	0.036 ± 0.0018[a]
Isoborneol	4	7	5	0.032 ± 0.0012[a]
Linalyl Acetate	7	5	4	0.032 ± 0.0015[a]

Kromozomal anomaliler analizinde, Aβ uygulamasını temsil eden grupta kromozom/kromatin kırığı, tetrat/uç birleşmeleri ve diğer yapısal bozukluklar anlamlı düzeyde artış göstermiştir. Pozitif kontrol grubunda toplam anomali sayısı 73 olup, ortalama KA değeri 0.146 ± 0.005 olarak belirlenmiştir. Terpen uygulanan gruplarda ise KA düzeylerinin negatif kontrol grubuna yakın ve beta amyloid grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olduğu görülmüştür. Özellikle Isoborneol (0.032 ± 0.002) ve Linalyl acetate (0.032 ± 0.002) uygulamaları, toplam kromozomal hasarı sınırlandırarak genetik bütünlüğün korunmasında etkili olmuştur.

4.2. *In Vitro* Anti-Alzheimer Analizleri

4.2.1. AH modeli sitotoksisite analizleri

Tez çalışması kapsamında, terpen yapıda olan 4 molekülün, Aβ ile oluşturulmuş deneysel AH modelinde potansiyel nöron koruyucu etkileri HMC-3 mikroglial hücre hattında değerlendirilmiştir. Söz konusu moleküllerin biyolojik güvenlik (biyogüvenlik) profillerinin belirlenmesi amacıyla yapılan ön deneylerde, 62,5 ila 4000 µM aralığında gerçekleştirilen MTT testleri, her molekül için yüksek dozlarda belirgin hücre ölümüne yol açarken, düşük dozlarda ise hücre canlılığını önemli ölçüde koruduğu ortaya koyulmuştur. Elde edilen bu bulgular doğrultusunda, AH'yi daha iyi anlayabilmek için *in vitro* model oluşturma gerçekleştirilmiştir. AH modeli, HMC-3 hücrelerinin Aβ1-42 peptidi ile muamele edilmesi (Aβ bir gün oda sıcaklığında bekletilmiştir) yoluyla oluşturulmuş ve oluşan model Aβ'nın yol açtığı toksisiteyi taklit etmiştir. Bu bağlamda, Aβ'nın indüklediği toksisiteye karşı elimizdeki moleküllerin koruyucu etkilerini değerlendirmek adına, oluşturulan AH modeli deneylerinde dört doz (0.1, 1, 10 ve 100 µM) kullanımına gidilmiştir. Bunun sebebi, moleküllerin hem hücre canlılığını koruyabilecek aralıkta olması hem de etki potansiyellerinin daha iyi test edilmesidir. Oluşturulan model ve buna bağlı elde edilen sonuçlar Şekil 4.7'da verilmiştir.



Şekil 4.7. Terpen moleküllerinin Aβ1-42 ile oluşturulan AH modeli üzerindeki etkisinin HMC-3 mikroglial hücre hattında MTT testi ile değerlendirilmesi. A; (–)-Caryophyllene oxide, B; Eucalyptol, C; Isoborneol, D; Linalyl acetate

İlk olarak HMC-3 hücelerine Aβ uygulaması yapılarak %50 hücre ölümüne neden olan dozu belirlenmiştir. Bu dozu model alarak, her bir terpen molekülü ile eş zamanlı şekilde belirli konsantrasyonlarda uygulamalar yapılmıştır. Bu durum, Aβ kaynaklı hücre ölümünü önleyici veya azaltıcı etkinliğinin doza bağımlı olarak değerlendirilmesi için imkan sağlamıştır. Aβ, deney düzeneğinde tüm gruplara sabit olarak uygulanmış ve negatif kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığı yaklaşık %50 oranında azalarak belirgin bir sitotoksisite oluşturmuştur. Bu durum, grafiklerde Aβ kontol gruplarında gözlemlenmekte olup, modelin etkinliğini doğrulamaktadır. Caryophyllene oxide'un uygulandığı (A grafiği) ve Aβ'nın toksisitesini nasıl etkilediği incelendiğinde, özellikle 10 μM dozla hücre canlılığını Aβ kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttırmıştır. Elde edilen bu sonuç, Caryophyllene oxide'un Aβ'nın neden olduğu toksisiteyi belirli bir doz aralığında hafiflettiğini göstermiştir. 1 ve 0,1 μM dozları içinde bu etki gözlemlenmiş, anacak daha düşük etkilerde kalmıştır. Yüksek dozlarda (100 μM) toksik

olan molekül, daha düşük dozlarda Aβ'nın toksisitesine karşı hücresel koruma sağlayabilmiştir.

Eucalyptol'ün uygulandığı (B grafiği) ve Aβ'nın toksisitesini nasıl etkilediği incelendiğinde, en dikkat çekici koruyucu etkiyi 1 ve 10 µM dozlarda göstermiştir. 1 µM dozu içinde bu etki gözlemlenmiş, anacak daha düşük etkilerde kalmıştır. Benzer şekilde, Isoborneol (C grafiği) ve Linalyl acetate (D grafiği) uygulanan ve Aβ'nın toksisitesini nasıl etkilendiği incelenen gruplarda, anlamlı koruyucu etkiler 1 ve 10 µM dozlarda gözlemlenmiştir. 0,1 dozu Aβ kontrol grubuna göre anlamlı bir etki göstermemiştir. Sonuç olarak, Caryophyllene oxide'de olduğu gibi Eucalyptol, Isoborneol ve Linalyl acetate molekülleri Aβ'nın neden olduğu toksisiteyi belirli bir doz aralığında hafiflettiği göstermiştir.

4 terpen molekülü hücre canlılığı üzerine koruyucu etkiler açısından kıyaslandığında, doz yanıt ilişkileri ve maksimun etki düzeyleri bakımından anlamlı ve benzer farklar ortaya koymuştur. Genel olarak, 10 µM dozut üm bileşikler için en etkili koruyucu konsantrasyon olarak öne çıkmış ve bu dozda, Eucalyptol, Linalyl acetate ve Isoborneol, Aβ kontrol grubuna göre hücre canlılığını en yüksek düzeyde artıtıran moleküller olmuşlardır. Caryophyllene oxide'de 10 µM dozda belirgin bir etki göstermiş, ancak bu etki diğer 3 moleküle kıyasla daha sınırlı kalmıştır.

1 µM dozda tüm moleküller canlılığı belirli düzeyde iyileştirmiş, ancak10 µM dozun gerisinde kalmıştır. Bu dozda da Eucalyptol, Linalyl acetate ve Isoborneol yine ön plana çıkarken, Caryophyllene oxide etkinliği geri planda kalmıştır. 0,1 µM dozda tüm moleküller için koruyucu etki zayıf kalmış, genelde canlılık Aβ kontrol grubuna yakın seyretmiştir. 100 µM doz ise tüm moleküllerin, Aβ toksisitesine karşı en zayıf veya nötr etki gösterdiği gruptur. Caryophyllene oxide, Eucalyptol ve Linalyl acetate, bu dozda hafif toksik etkiler göstermiş ve hücre canlılığını Aβ gubuna kıyasla daha düşük düzeye getirmişlerdir. Isoborneol'de diğer gruplara kıyasla daha minimal toksik etki gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, uygulanan 0,1 ve 100 µM dozları koruyucu etkinlik için sınır konsantrasyonlar olurken, Aβ toksisitesine karşı koruyucu etkilerin 1 ve 10 µM

dozlarda optimum olduğunu ortaya koymaktadır. Bu sebeple yapılan diğer deneylerde 1 ve 10 µM dozları kullanılmıştır.

4.2 2 AH modelinde TAS ve TOS analizi

Tez çalışması kapsamında, terpen moleküllerinin Aβ kaynaklı oksidatif stres üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla toplam antioksidan kapasite (TAS) ve toplam oksidan seviye (TOS) testleri yapılmıştır. Böylece, kullanılan 4 molekülün oksidatif denge üzerinde koruyucu ve düzenleyici etkileri olup olmadığı ortaya koyulmuştur. Elde edilen bulgular Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3' de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Terpenlerin Aβ kaynaklı oksidatif strese karşı antioksidan etkileri.

Deney grubu	TAS (10 µM, mmol Trolox Equiv./l)	TAS (1 µM, mmol Trolox Equiv./l)
Caryophyllene oxide+Aβ	1,34±0,06	1,27±0,08
Eucalyptol+Aβ	1,32±0,07	1,12±0,04
Isoborneol+Aβ	1,24±0,06	1,13±0,06
Linalyl acetate+Aβ	1,52±0,05	1,46±0,04
Aβ	0,68±0,03	
(-) Ctrl	1,63±0,08	

HMC-3 mikroglial hücrelerinde, Aβ ile oksidatif stres tetiklenmiş ve deneysel verilerde bu etki açıkça gözlemlenmiştir. Çizelge 4.2'de gösterilen değerler incelendiğinde, Aβ gurubu, en düşük antioksidan kapasite seviyesine sahip olduğu (0,68±0,03), negatif kontrol grubuna kıyasla açıkça gözlemlenmektedir (1,63±0,08). 10 µM dozda Linalyl acetate, TAS düzeyi bakımından (1,52±0,05), Aβ'nın yol açtığı oksidatif hasarı neredeyse geriye çevirmiş ve negatif kontrol grubuna oldukça yaklaşmıştır. Caryophyllene oxide (1,34±0,06) ve Eucalyptol (1,32±0,07) orta seyirde bir etki sağlayarak, Aβ grubuna kıyasla anlamlı bir iyileştirme sağlamıştır. Isoborneol ise aynı dozda (1,24±0,06) en iyi etki gösteren Linalyl acetate ve orta düzeyde etki gösteren Caryophyllene oxide ila Eucalyptol molekülüne göre daha az etki göstererek, iyileştirme potansiyeli zayıf kalmıştır. 1 µM dozda Linalyl acetate yine etkisini sürdürmüş (1,46±0,04) ve tüm moleküllerden daha yüksek TAS değeri sağlamıştır. Diğer 3 molekül ise 10 µM doza kıyasla etkinliğinde bir miktar azalma göstermiştir. Tüm moleküller

(özellikle Linalyl acetate), Aβ'nın yol açtığı tol açtığı antioksidan seviyesindeki azalmayı, anlamlı bir şekilde iyileştirmiştir.

Çizelge 4.3. Terpenlerin Aβ kaynaklı oksidatif strese karşı oksidan etkileri.

Deney grubu	**TOS (10 µM, µmol H2O2 Equiv./l)**	**TOS (1 µM, µmol H2O2 Equiv./l)**
Caryophyllene oxide+Aβ	14,83±0,08	13,54±0,04
Eucalyptol+Aβ	13,12±0,06	15,32±0,05
Isoborneol+Aβ	13,43±0,05	14,79±0,05
Linalyl acetate+Aβ	14,15±0,07	13,16±0,07
Aβ	22,54±0,09	
(-) Ctrl	13,24±0,5	

Aβ, hücresel düzeyde oksidatif stresi tetiklemiştir ve elde edilen bulgular bu etkinin doğruluğunu güçlü bir şekilde desteklemektedir. Çizelge 4.3'te gösterilen değerler incelendiğinde, Aβ gurubu, en yüksek oksidan kapasite seviyesine sahip olduğu (22,54±0,09), negatif kontrol grubuna kıyasla (13,24±0,5) açıkça gözlemlenmektedir. 10 µM doz için Eucalyptol (13,12±0,06) ve Isoborneol (13,43±0,05) Aβ'nın oksidatif etkisini bastırarak, negatif kontrole oldukça yakın TOS değerleri sağlamışlardır. Linalyl acetate (14,15±0,07) ve Caryophyllene oxide (14,83±0,08), her ne kadar iyileşme potansiyeli sağlasalarda diğer iki moleküle göre oksidan seviyeleri yüksektir. Tüm deneysel gruplar Aβ grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir azalma sağlamış ve oksidatif stresin önüne geçmiştir.

4.2.3. AH modelinde AChE analizi

Çizelge 4.4. Terpenlerin Aβ kaynaklı artan AChE seviyesine etkileri

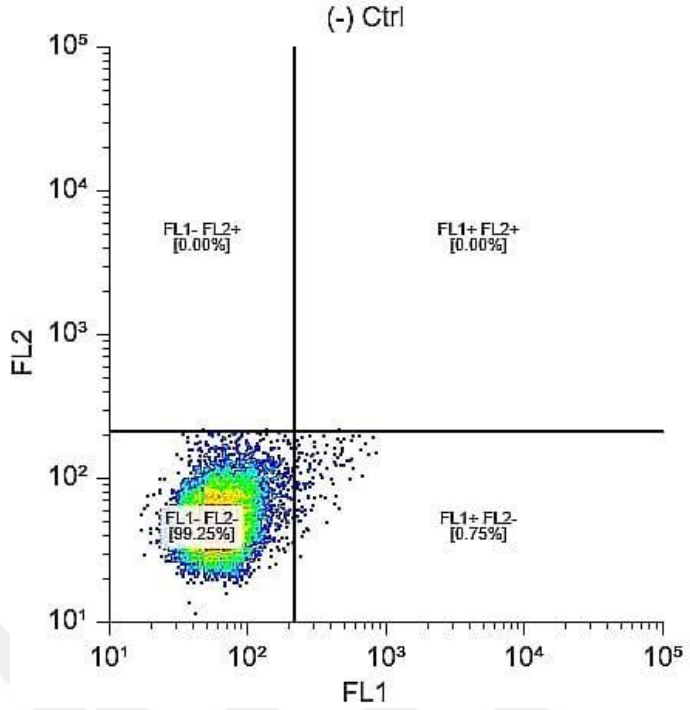
Deney grubu	**AChE (10 µM, pg/mL)**	**AChE (1 µM, pg/mL)**
Caryophyllene oxide+Aβ	412,56±15	423,39±18
Eucalyptol+Aβ	424,66±16	405,57±23
Isoborneol+Aβ	463,65±21	432,24±14
Linalyl acetate +Aβ	435,78±13	451,21±24
Aβ	456,65±18	
(-) Ctrl	348,35±23	

AH'de asetilkolin seviyesi, asetilkolinesteraz (AChE) enziminin artması ile azalmaktadır. Hastalığın tedavisinde hedef alınan ve kullanılan ilaçlar, AChE'yi inhibe etme veya etkisini azaltma yönündedir. Bu tez çalışması da, 4 terpen molekülünün bu enzim üzerine etkilerini değerlendirmek amacı ile Aβ'nın arttırdığı AChE enziminin düzeylerinde meydana gelen değişiklikleri incelemiştir. Elde edilen bulgular Çizelge 4.4'te verilmiştir.

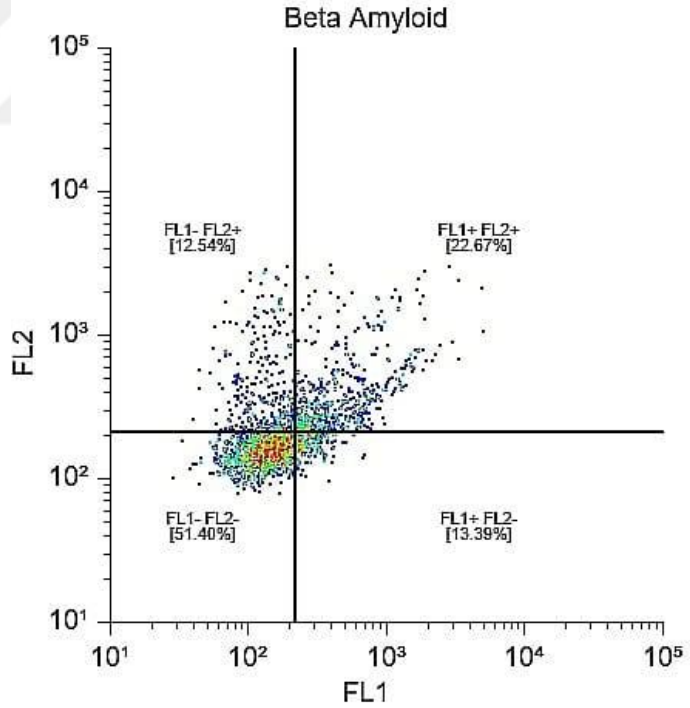
Aβ'nın tek başına kontrol olarak uygulandığı grupta, AChE seviyesi, hastalık modeli için beklenildiği gibi artmıştır. Elde edilen sonuç Aβ'nın AChE seviyesinde (456,65±18) artışa neden olduğunu gösterirken, negatif kontrol ile kıyaslandığında (348,35±23) kolinerjik iletimin bozulduğunu doğrulamıştır. Terpen gruplarına bakıldığında, Caryophyllene oxide (412,56±15 ve 423,39±18) ve Eucalyptol (424,66±16 ve 405,57±23), Aβ kaynaklı artışı kısmen baskılayarak, AChE düzeyini düşürmüştür. Isoborneol (463,65±21 ve 432,24±14) ve Linalyl acetate (435,78±13 ve 451,21±24) ise Aβ grubuna yakın değerler vermiş, ancak diğer iki terpene göre daha sınırlı etki göstermiştir.

4.2.4. AH modelinde Akış sitometrisi ile apoptoz analizi

Aβ toksisitesi hücresel stresi tetikleyerek, hücreyi programlanmış ölüme iter. Apoptozun erken aşamasında hücre zar bütünlüğü korunur ve fosfatidilserin hücre zarının dış kısmına lokalize olur. Bu durumu Annexin V boyası ile tespit edilebilir. Ancak geç apoptozda membran bütünlüğü bozulmaya başladığı için ikinci boya olan PI hücre içine girer ve Annexin V boyası ile ışıma verir. Nekroz, apoptozun aksine kısmen enerji gerektirmez ve hücre ölümünü ani olarak tetikler. Bu sayede, nekroz ile ölümler sadece PI boyasının pozitifliğine bakılarak belirlenir (Krysko et al., 2008; Vermes et al., 2015.). Tez çalışmasında HMC-3 mikroglial hücre hattında Aβ aracılı hücre ölümünün boyutu ve terpenlerin olası koruyucu etkileri, Annexin V-FITC ve PI boyaları kullanılarak akış sitometrisi yöntemiyle değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, apoptozun erken ve geç evrelerinin yanı sıra nekroz gibi farklı hücre ölüm biçimlerini kantitatif olarak belirleme olanağı sunmaktadır.



Şekil 4.8. Negatif kontrol grubuna ait akış sitometrisi grafiği.

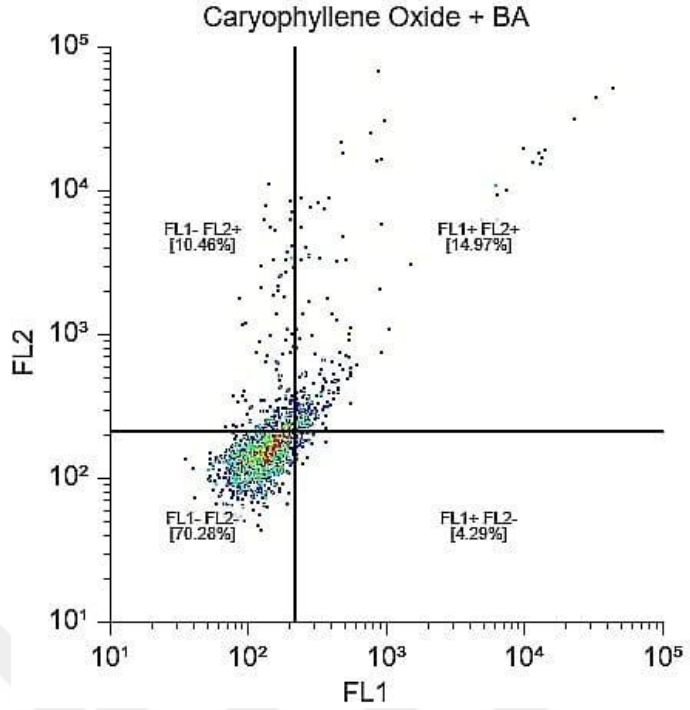


Şekil 4.9. Aβ grubuna ait akış sitometrisi grafiği.

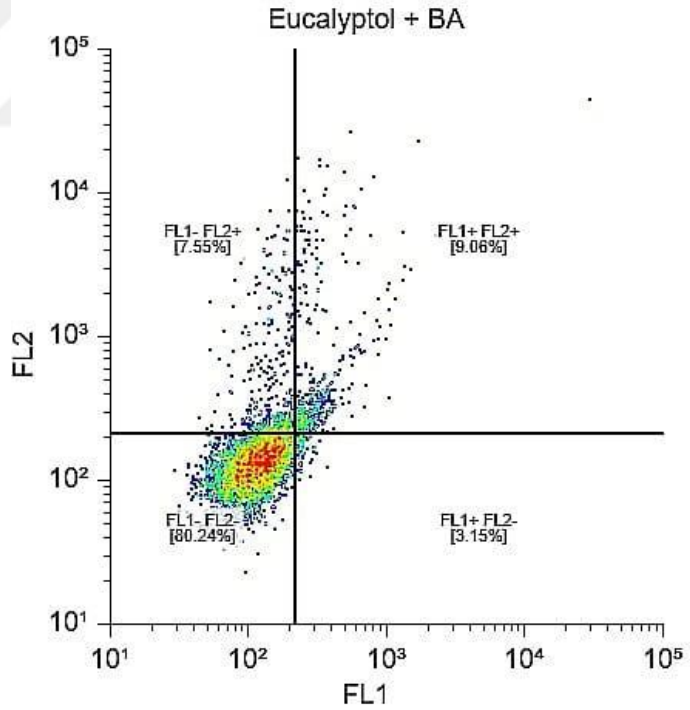
Negatif kontrol grubuna ait akış sitometri sonuçları, HMC-3 hücrelerinin optimum düzeydeki fizyolojik durumunu yansıtmaktadır. Elde edilen veriler hücrelerin %99,25 oranında canlı olduğunu gösterirken, erken, geç apoptoz ve nekroz gibi ölüm

yolları neredeyse hiç gözlenmemiştir. Bu sonuç, hücre kültürünün sağlıklı koşullarda sürdürüldüğü, diğer deneysel grupların değerlendirilmesi açısından güvenilir referans oluşturmaktadır.

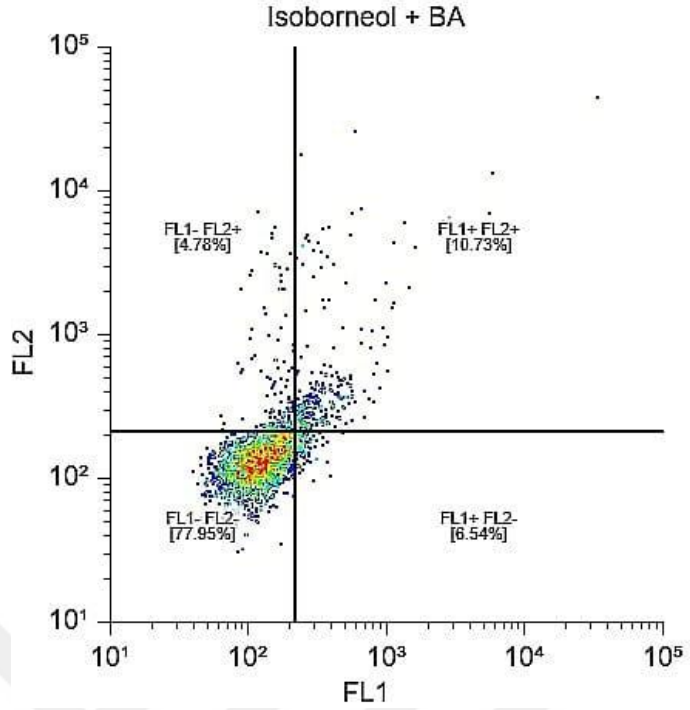
Aβ uygulanan gruba ait akış sitometrisi verileri, HMC-3 mikroglial hücre hattı üzerinde belirgin sitotoksik etkiler oluşturduğunu göstermektedir. Yapılan analizde, canlı hücre oranı yalnızca %51,40 olarak belirlenmiştir. Bu oran, negatif kontrol grubuna (%99,25) kıyasla ciddi bir azalmayı temsil eder ve Aβ'nın hücre canlılığını büyük ölçüde azalttığını ortaya koyar. Ayrıca erken apoptoz oranı %13,39, geç apoptoz oranı ise %22,67 olarak tespit edilmiştir. Bu bulgular, Aβ'nın hücrelerde apoptotik süreci aktif bir şekilde indüklediğini göstermektedir. Özellikle geç apoptoz oranının yüksekliği, Aβ'nın yol açtığı hücresel stresin hücre zar bütünlüğünü bozulmaya başladığını ve geç evreye birçok hücrenin ulaştığına işaret eder. Bunun yanında, nekroz oranı da %12,54 düzeydedir. Bu durum, Aβ'nın yalnızca kontrollü hücre ölümüne (apoptoz) değil, aynı zamanda membran bütünlüğünün hızlı bozulmasıyla karakterize olan nekroza da yol açtığını göstermektedir. Sonuç olarak, Aβ uygulaması sonrası HMC-3 hücre hattında canlı hücre oranının yarı yarıya azaldığı, apoptozun hem erken hem de geç evrelerinin aktifleştiği ve nekrozun belirgin hale geldiği gözlemlenmiştir. Bu veriler, Alzheimer hastalığında Aβ birikiminin mikroglial hücreler üzerinde toksik ve dejeneratif etkiler yarattığını açıkça desteklemektedir.



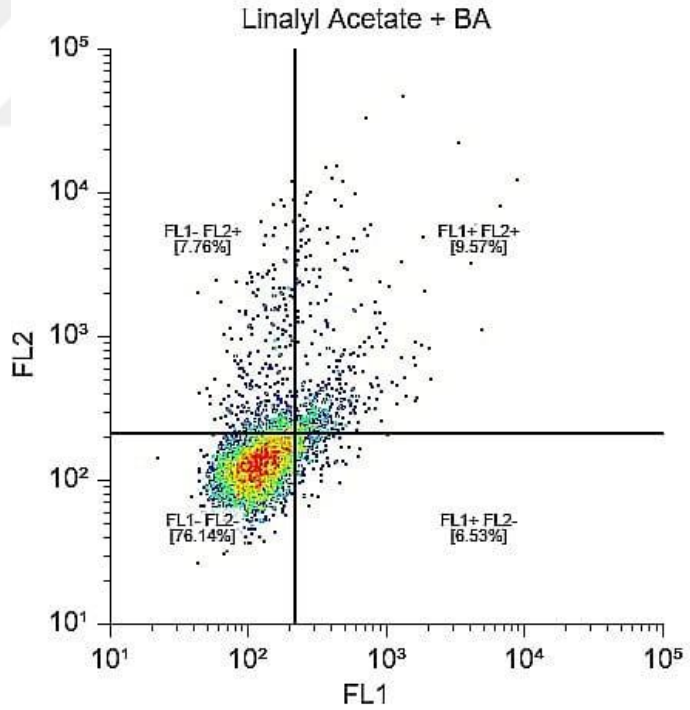
Şekil 4.10. Caryophyllene oxide + Aβ grubuna ait akış sitometrisi grafiği.



Şekil 4.11. Eucalyptol + Aβ grubuna ait akış sitometrisi grafiği.



Şekil 4.12. Isoborneol + Aβ grubuna ait akış sitometrisi grafiği.



Şekil 4.13. Linalyl acetate oxide + Aβ grubuna ait akış sitometrisi grafiği.

Caryophyllene oxide ve Aβ'nın birlikte uygulandığı grupta, akış sitometrisi verileri hücre ölüm oranlarında Aβ grubuna kıyasla anlamlı bir azalma olduğunu göstermektedir. Bu grupta canlı hücre oranı %70,28 olarak ölçülmüştür. Bu değer, Aβ

grubundaki %51,40 canlılık oranına göre belirgin bir artış göstermekte ve Caryophyllene oxide'un Aβ kaynaklı hücre ölümünü kısmen baskıladığını düşündürmektedir. Ayrıca erken apoptoz oranı %4,29, geç apoptoz %14,97 ve nekroz %10,46 olarak kaydedilmiştir. Erken apoptozda gözlenen ciddi azalma, Caryophyllene oxide'un hücresel stres yanıtını azaltıcı etkisine işaret etmektedir. Geç apoptoz ve nekroz oranlarının Aβ grubuna kıyasla düşük olması, bu terpenin hem programlı hücre ölümü süreçlerini hem de hücre membranı bütünlüğünü koruyarak nekrotik ölümü azaltabildiğini göstermektedir.

Eucalyptol ve Aβ birlikte uygulandığında, hücrelerdeki canlılık oranı %80,24 olarak belirlenmiştir. Bu değer, tüm deney grupları arasında en yüksek canlı hücre oranı olarak dikkat çekmektedir. Aynı zamanda, erken apoptoz oranı %3,15, geç apoptoz %9,06 ve nekroz %7,55 olarak ölçülmüştür. Bu bulgular, Eucalyptol'ün Aβ kaynaklı apoptoz sürecini baskılayıcı etkisini ve özellikle erken apoptozu azaltmadaki potansiyelini göstermektedir. Ancak nekroz oranı görece yüksek kalmıştır (%7,55). Bu durum, Eucalyptol'ün apoptozu daha etkin baskıladığı, ancak zar bütünlüğü bozulmuş hücrelerdeki nekrotik ölümü tamamen engelleyemediği anlamına gelebilir. Genel olarak değerlendirildiğinde, Eucalyptol hem canlılık oranı hem de düşük apoptoz düzeyleri ile etkili bir hücre koruyucu ajan olarak öne çıkmaktadır.

Isoborneol ve Aβ uygulamasına ait akış sitometri sonuçları, canlı hücre oranı %77,95 olup, bu oran çalışmadaki en yüksek ikinci değerdir ve Aβ grubuna göre yaklaşık %27'lik bir artış anlamına gelmektedir. Erken apoptoz oranı %6,54, geç apoptoz %10,73 ve nekroz %4,78 olarak tespit edilmiştir. Bu değerler, Isoborneol'ün yalnızca apoptotik süreci değil, aynı zamanda membran hasarı ile ilişkili nekrotik ölümü de ciddi oranda azalttığını göstermektedir. Geç apoptoz oranının düşüklüğü, terpenin Aβ'nın neden olduğu kalıcı hücre hasarını önlemede etkili olduğunu desteklemektedir.

Linalyl acetate ve Aβ'nın birlikte uygulandığı grupta, canlı hücre oranı %76,14 olarak ölçülmüş, bu oran Isoborneol ve Eucalyptol gruplarına yakın düzeyde kalmıştır. Erken apoptoz %6,53, geç apoptoz %9,57 ve nekroz %7,76 oranlarında gerçekleşmiştir. Elde edilen bu veriler, Linalyl acetate'in Aβ kaynaklı hücre ölümünü baskılayabildiğini ve hücre canlılığını belirgin şekilde koruduğunu göstermektedir. Apoptoz oranları düşük

seyretmekte, ancak nekroz oranı görece yüksektir. Bu, Linalyl acetate'in anti-apoptotik etkisinin yüksek olduğunu, ancak membran stabilitesi üzerindeki etkisinin Eucalyptol'e kıyasla daha sınırlı olabileceğini düşündürmektedir

Çizelge 4. 5. HMC-3 hücrelerinde Aβ ve terpen uygulamalarının ardından akış sitometrisi ile belirlenen canlılık, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları (%).

Grup	Canlı Hücre (%)	Erken Apoptoz (%)	Geç Apoptoz (%)	Nekroz (%)
(-) Kontrol	99,25	0,00	0,00	0,75
Aβ	51,40	13,39	22,67	12,54
Caryophyllene oxide + Aβ	70,28	4,29	14,97	10,46
Eucalyptol + Aβ	80,24	7,55	9,06	3,15
Isoborneol + Aβ	77,95	6,54	10,73	4,78
Linalyl acetate + Aβ	76,14	7,76	9,57	6,53

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1. Sonuç

Tez çalışmasında, Alzheimer hastalığı patogenezinin *in vitro* modeli olarak HMC-3 mikroglial hücre hattında amiloid beta (Aβ) uygulamasıyla oluşturulan hücresel hasar ortamı kullanılmış ve dört farklı terpen bileşiğinin (Caryophyllene oxide, Eucalyptol, Isoborneol ve Linalyl acetate) bu modele karşı olası koruyucu etkileri çok yönlü deneysel analizlerle değerlendirilmiştir.

Sitotoksisite analizi sonuçları, hücre canlılığı üzerindeki etkilerini doza bağımlı olarak ortaya koymuştur. 62.5 µM ile 4000 µM arasındaki geniş konsantrasyon aralığında yapılan uygulamalarda, tüm bileşiklerin yüksek dozlarda belirgin sitotoksisite oluşturduğu; ancak düşük dozlarda (özellikle 62.5 µM ve 120 µM) canlılık üzerinde anlamlı bir bozulmaya yol açmadığı saptanmıştır. Bu veriler doğrultusunda, Aβ modellemesine yönelik deneylerde 100, 10, 1 ve 0.1 µM gibi düşük konsantrasyonlar tercih edilerek hem hücre canlılığını koruyan hem de terapötik potansiyeli gözlemlemeye olanak tanıyan doz aralıkları oluşturulmuştur. Böylece, biyogüvenlik açısından uygunluk taşıyan bu dozlar, model çalışmaları için temel oluşturmuştur.

Nükleer anomalileri belirlemek amacıyla gerçekleştirilen Hoechst boyama analizi, Aβ grubunda nükleer yapının morfolojik bütünlüğünün bozulduğunu; mikronükleus, loblu ve çentikli çekirdek gibi anomalilerin anlamlı şekilde arttığını göstermiştir. Buna karşın, terpen uygulanan gruplarda bu anomalilerin negatif kontrol grubuna benzer seviyelerde seyretmesi, bileşiklerin Aβ kaynaklı genotoksik etkileri baskılayabildiğini ortaya koymuştur. Özellikle Isoborneol uygulaması, nükleer anomalilerin en düşük düzeyde izlendiği grup olarak dikkat çekmiştir. Genotoksisiteye dair daha derinlemesine bilgi sağlamak amacıyla yapılan kromozomal aberasyon analizi, Aβ'nın uygulandığı pozitif kontrol grubunda kromozom ve kromatin kırıkları, tetratlar ve diğer yapısal anormalliklerin anlamlı şekilde arttığını göstermiştir. Buna karşın, terpen uygulanan gruplarda toplam aberasyon oranı anlamlı düzeyde düşük seyretmiş, negatif kontrole yakın sonuçlar elde edilmiştir. Bu durum, incelenen bileşiklerin DNA üzerinde

kalıcı yapısal bozukluklara neden olmadığını ve hücreler için genetik açıdan güvenli bir profil sergilediğini göstermektedir.

Aβ uygulaması, hücre canlılığını %50'nin altına düşürerek güçlü bir toksik model oluşturmuştur. Bu model üzerinde uygulanan düşük doz terpenler, özellikle Isoborneol ve Eucalyptol gruplarında canlı hücre oranlarını anlamlı düzeyde artırmıştır. Ancak en yüksek canlılık, Isoborneol grubunda gözlenmiştir. Tüm bileşikler, düşük doz aralığında sitotoksik etki göstermemiş ve modelin fizyolojik gerçekliğini bozmadan nöroprotektif etkiler sergilemiştir.Aβ'nın uygulandığı pozitif kontrol grubunda TOS değerleri belirgin şekilde artarken, TAS düzeyleri azalmıştır. Bu durum, hücrelerin oksidatif stres altında olduğunu ve redoks dengesinin bozulduğunu göstermektedir. Terpen uygulamaları ise bu dengeyi tersine çevirmiş; özellikle Linalyl acetate ve Caryophyllene oxide gruplarında TAS düzeylerinin yükselmesi ve TOS'un düşmesi, bu bileşiklerin güçlü antioksidan savunma tepkileri oluşturduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, mototerpenlerin Alzheimer patofizyolojisinde merkezi rol oynayan oksidatif stres mekanizmasına müdahale potansiyelini desteklemektedir.

AChE enzim düzeyleri, Aβ uygulaması sonrası anlamlı şekilde artmıştır. Bu artış, kolinerjik iletimin bozulmasına ve nörodejeneratif süreçlerin tetiklenmesine işaret etmektedir. Terpen bileşiklerinin Aβ ile birlikte uygulandığı gruplarda, bu enzim düzeylerinde gözle görülür bir azalma meydana gelmiştir. Özellikle Eucalyptol ve Isoborneol, AChE aktivitesini negatif kontrol seviyelerine yaklaştırarak kolinerjik sistemin korunmasına katkı sağlamıştır. Bu durum, söz konusu bileşiklerin AChE inhibitörü gibi davranarak nörolojik fonksiyonları destekleyebileceğini düşündürmektedir. Flow sitometri sonuçları, Aβ'nın erken ve geç apoptoz oranlarını anlamlı düzeyde artırdığını ve aynı zamanda nekrozu da tetiklediğini göstermiştir. Terpen uygulanan gruplarda ise hem apoptoz hem de nekroz oranlarının anlamlı şekilde azaldığı, canlı hücre yüzdesinin ise kontrol seviyelerine yaklaştığı saptanmıştır. Isoborneol özellikle geç apoptozu baskılayarak Aβ'ya bağlı hücre ölümünü sınırlamada öne çıkmıştır. Bu veriler, bileşiklerin apoptoz mekanizmalarını hedef alarak Aβ'nın başlattığı programlı hücre ölümünü önleyebileceğini ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada kullanılan dört doğal terpen bileşiği kimyasal yapılarına göre sınıflandırıldığında, Isoborneol, Eucalyptol ve Linalyl acetate bileşikleri monoterpen grubuna; Caryophyllene oxide ise seskiterpen grubuna dahil olmaktadır. Caryophyllene oxide, bu çalışmada monoterpenlerin etkinliğini değerlendirmek amacıyla referans niteliğinde karşılaştırmalı bir kontrol olarak kullanılmıştır. Elde edilen bulgular, genel olarak monoterpen bileşiklerinin Alzheimer modelinde daha güçlü ve çok yönlü hücresel koruma sağladığını göstermektedir. Özellikle Isoborneol ve Eucalyptol, Aβ kaynaklı sitotoksisite, apoptotik süreçler ve asetilkolinesteraz aktivitesinde anlamlı düşüş sağlayarak belirgin nöroprotektif etki sergilemiştir. Ayrıca, bu iki bileşiğin nükleer anomaliler ve kromozomal aberasyon düzeylerinde de düşük değerler göstermesi, hem fonksiyonel hem de genetik düzeyde koruma sağladıklarını düşündürmektedir. Buna karşın seskiterpen yapısındaki Caryophyllene oxide, bazı parametrelerde etkili olsa da genel koruyucu etki açısından monoterpenlere kıyasla daha sınırlı kalmıştır. Bu durum, moleküler yapı-aktivite ilişkisi açısından monoterpen grubunun Alzheimer patofizyolojisine karşı daha etkili farmakolojik yanıtlar geliştirebildiğini ortaya koymaktadır. Bu çalışma kapsamında yapılan deneysel analizler yalnızca bileşiklerin koruyucu etkilerini göstermekle kalmamış, aynı zamanda Alzheimer hastalığında etkili olan sitotoksisite, oksidatif stres, apoptoz, asetilkolin metabolizması ve genetik hasar gibi temel patolojik mekanizmalar üzerinden bu etkilerin hangi biyolojik yollar aracılığıyla gerçekleştiğini de ortaya koymayı amaçlamıştır. Elde edilen sonuçlar, değerlendirmeye alınan terpen bileşiklerinin bu mekanizmalar üzerinde çok yönlü müdahale potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

5.2. Öneriler

Sonuçlandırılan tez çalışması kapsamında elde edilen bulgular, değerlendirilen terpen bileşiklerinin AH'de bazı hücresel mekanizmaları üzerine koruyucu etkiler gösterebildiğini ortaya koymuştur. Ancak bu etkilerin kapsamlı sınırı, sürekliliği ve moleküler temellerin daha detaylı incelenmesi gerekmektedir. Bu incelemeler, mevcut sonuçların güçlendirilmesi ve klinik uygulamaya taşınması açısından önem arz etmektedir.

Çalışmanın yalnızca HMC-3 mikroglial hücre hattında yapılmış olması ilk sınırlayıcıdır. Bulguların doğrulanabilmesi için, insan kaynaklı nöronlar**,** astrositler ve 3D serebral organoid modelleri gibi daha kompleks sistemlerde de test edilmesi gerekmektedir. Ayrıca terpenlerin etkilediği hücresel mekanizmaları daha net belirlemek amacıyla qPCR, western blot ve ELISA vs testlerinin yapılarak apoptotik genlerin ekspresyon ve aktivite seviyeleri, detaylı ROS ve antioksidan enzim düzeylerinin ölçümü ve protein düzeyindeki değişiklikler incelenmelidir. Bu sayede terpen bileşiklerinin Aβ kaynaklı hücresel hasara karşı koruyucu etkilerinin yalnızca fenotipik düzeyde değil, aynı zamanda moleküler mekanizmalar üzerinden nasıl gerçekleştiği de net bir şekilde ortaya konabilecektir. Devamında ise *İn vitro* sonuçların biyolojik geçerliliğini artırmak amacıyla transgenik Alzheimer fare modellerinde benzer testlerin yapılması gerekmektedir. Beyin doku kesitlerinde immünohistokimyal yöntemlerle belirlenecek olan ile Aβ plak birikimi düzeylerinin değerlendirilmesi önerilir.

KAYNAKLAR

Abdallah, I. I. ve Quax, W. J. 2017. A glimpse into the biosynthesis of terpenoids. *KnE Life Sciences*, 3(5), 81.

AbuHammad, G. A. R., Naser, A. Y. ve Hassouneh, L. K. M. 2023. Diabetes mellitus-related hospital admissions and prescriptions of antidiabetic agents in England and Wales: an ecological study. *BMC Endocrine Disorders*, 23(1), 1–10.

Albert, M. S., DeKosky, S. T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H. H., Fox, N. C., Gamst, A., Holtzman, D. M., Jagust, W. J., Petersen, R. C., Snyder, P. J., Carrillo, M. C., Thies, B. ve Phelps, C. H. 2011. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, 7(3), 270–279.

Angelucci, F., Cechova, K., Amlerova, J. ve Hort, J. 2019. Antibiotics, gut microbiota, and Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 1–9.

Anjum, I., Fayyaz, M., Wajid, A., Sohail, W. ve Ali, A. 2018. Does obesity increase the risk of dementia: a literature review. *Cureus*, 10(5), e2660.

Aru, B., Develioğlu, A., Gürel, G. ve Demirel, G. Y. t.y. Alzheimer Hastalığı'nda in vivo ve in vitro modeller. *TÜSEB Dergisi*. Erişim adresi: https://doi.org/10.54537/tusebdergisi

Barak, M., Fedorova, V., Pospisilova, V., Raska, J., Vochyanova, S., Sedmik, J., Hribkova, H., Klimova, H., Vanova, T. ve Bohaciakova, D. 2022. Human iPSC-derived neural models for studying Alzheimer's disease: from neural stem cells to cerebral organoids. *Stem Cell Reviews and Reports*, 18(2), 792–820.

Bi, J., Jiang, B., Liu, J. H., Lei, C., Zhang, X. L. ve An, L. J. 2008. Protective effects of catalpol against H2O2-induced oxidative stress in astrocytes primary cultures. *Neuroscience Letters*, 442(3), 224–227.

Blaikie, L., Kay, G., Maciel, P. ve Kong Thoo Lin, P. 2022. Experimental modelling of Alzheimer's disease for therapeutic screening. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, 5, 100044.

Blennow, K. ve Zetterberg, H. 2018. Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future. *Journal of Internal Medicine*, 284(6), 643–663.

Breijyeh, Z. ve Karaman, R. 2020. Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment. *Molecules*, 25(24), 5789.

Brok, H. P. M., Boven, L., van Meurs, M., Kerlero de Rosbo, N., Celebi-Paul, L., Kap, Y. S., Jagessar, A., Hintzen, R. Q., Keir, G., Bajramovic, J., Ben-Nun, A., Bauer, J., Laman, J. D., Amor, S. ve 't Hart, B. A. 2007. The human CMV-UL86 peptide 981–1003 shares a crossreactive T-cell epitope with the encephalitogenic MOG peptide 34–56, but lacks the capacity to induce EAE in rhesus monkeys. *Journal of Neuroimmunology*, 182(1–2), 135–152.

Bucci, D. J., Holland, P. C. ve Gallagher, M. 1998. Removal of cholinergic input to rat posterior parietal cortex disrupts incremental processing of conditioned stimuli. *Journal of Neuroscience*, 18(19), 7595–7601.

Burm, S. M., Peferoen, L. A. N., Zuiderwijk-Sick, E. A., Haanstra, K. G., 't Hart, B. A., van der Valk, P., Amor, S., Bauer, J. ve Bajramovic, J. J. 2016. Expression of IL-1β in rhesus EAE and MS lesions is mainly induced in the CNS itself. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 138.

Camilli, G., Cassotta, A., Battella, S., Palmieri, G., Santoni, A., Paladini, F., Fiorillo, M. T. ve Sorrentino, R. 2016. Regulation and trafficking of the HLA-E molecules during monocyte-macrophage differentiation. *Journal of Leukocyte Biology*, 99(1), 121–130.

Castellani, R. J., Rolston, R. K. ve Smith, M. A. 2010. Alzheimer disease. *Disease-a-Month*, 56(9), 484–546.

Chen, Z. Y. ve Zhang, Y. 2022. Animal models of Alzheimer's disease: applications, evaluation, and perspectives. *Zoological Research*, 43(6), 1026–1040.

Chiu, Y. J., Lin, C. H., Lee, M. C., Hsieh-Li, H. M., Chen, C. M., Wu, Y. R., Chang, K. H. ve Lee-Chen, G. J. 2021. Formulated Chinese medicine Shaoyao Gancao Tang reduces NLRP1 and NLRP3 in Alzheimer's disease cell and mouse models for neuroprotection and cognitive improvement. *Aging*, 13(11), 15620–15637.

Choi, S. H., Kim, Y. H., Hebisch, M., Sliwinski, C., Lee, S., D'Avanzo, C., Chen, H., Hooli, B., Asselin, C., Muffat, J., Klee, J. B., Zhang, C., Wainger, B. J., Peitz, M., Kovacs, D. M., Woolf, C. J., Wagner, S. L., Tanzi, R. E. ve Kim, D. Y. 2014. A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature*, 515(7526), 274–278.

Macedo, C., Tissot, C., Therriault, J., Servaes, S., Wang, Y. T., Fernandez-Arias, J., Rahmouni, N., Lussier, F. Z., Vermeiren, M., Bezgin, G., Vitali, P., Ng, K. P., Zimmer, E. R., Guiot, M. C., Pascoal, T. A., Gauthier, S. ve Rosa-Neto, P. 2023. The use of Tau PET to stage Alzheimer disease according to the Braak staging framework. *Journal of Nuclear Medicine*, 64(8), 1171–1178.

Cohen, R. M., Rezai-Zadeh, K., Weitz, T. M., Rentsendorj, A., Gate, D., Spivak, I., Bholat, Y., Vasilevko, V., Glabe, C. G., Breunig, J. J., Rakic, P., Davtyan, H., Agadjanyan, M. G., Kepe, V., Barrio, J. R., Bannykh, S., Szekely, C. A., Pechnick, R. N. ve Town, T. 2013. A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric Aβ, and frank neuronal loss. *Journal of Neuroscience*, 33(15), 6245–6256.

Cox-Georgian, D., Ramadoss, N., Dona, C. ve Basu, C. 2019. Therapeutic and medicinal uses of terpenes. In: *Medicinal Plants: From Farm to Pharmacy*, 333–359. Springer International Publishing.

Cramb, K. M. L., Beccano-Kelly, D., Cragg, S. J. ve Wade-Martins, R. 2023. Impaired dopamine release in Parkinson's disease. *Brain*, 146(8), 3117–3132.

Dang, C., Wang, Q., Zhuang, Y., Li, Q., Feng, L., Xiong, Y. ve Lu, Y. 2024. Pharmacological treatments for vascular dementia: a systematic review and Bayesian network meta-analysis. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1451032.

Dar, R. A., Shahnawaz, M., Qazi, P. H. ve Qazi, H. 2017. General overview of medicinal plants: a review. *The Journal of Phytopharmacology*, 6(6), 349–351.

de Bruijn, R. F. A. G. ve Ikram, M. A. 2014. Cardiovascular risk factors and future risk of Alzheimer's disease. *BMC Medicine*, 12(1), 130.

Demir, Z. ve Türkan, F. 2022. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Enzimlerinin Alzheimer Hastalığı ile İlişkisi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12(4), 2386–2395.3

Do Carmo, S. ve Cuello, A. C. 2013. Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Molecular Neurodegeneration*, 8(1), 37.

Dong, X. X., Wang, Y. ve Qin, Z. H. 2009. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(4), 379–387.

Drummond, E. ve Wisniewski, T. 2017. Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*, 133(2), 155–175.

D'Souza, G. X., Rose, S. E., Knupp, A., Nicholson, D. A., Keene, C. D. ve Young, J. E. 2021. The application of in vitro-derived human neurons in neurodegenerative disease modeling. *Journal of Neuroscience Research*, 99(1), 124–140.

Durazzo, T. C., Mattsson, N. ve Weiner, M. W. 2014. Smoking and increased Alzheimer's disease risk: A review of potential mechanisms. *Alzheimer's and Dementia*, 10(3 SUPPL.), S122–S145.

Ergen, B. ve Sertkaya, M. E. 2022. Alzheimer hastalığının erken teşhisinin çoklu değişken kullanarak tespiti. *European Journal of Science and Technology*, (28), 285–291.

Farlow, M. R., Graham, S. M. ve Alva, G. 2008. Memantine for the treatment of Alzheimer's disease: Tolerability and safety data from clinical trials. *Drug Safety*, 31(7), 577–585.

Ferreira-Vieira, T. H., Guimaraes, I. M., Silva, F. R. ve Ribeiro, F. M. 2016. Alzheimer's disease: Targeting the cholinergic system. *Current Neuropharmacology*, 14(1), 101–115.

Filippi, M., Preziosa, P., Barkhof, F., Ciccarelli, O., Cossarizza, A., De Stefano, N., Gasperini, C., Geraldes, R., Granziera, C., Haider, L., Lassmann, H., Margoni, M., Pontillo, G.,

Ropele, S., Rovira, À., Sastre-Garriga, J., Yousry, T. A. ve Rocca, M. A. 2024. The ageing central nervous system in multiple sclerosis: The imaging perspective. *Brain*, 147(11), 3665–3680.

Folch, J., Busquets, O., Ettcheto, M., Sánchez-López, E., Castro-Torres, R. D., Verdaguer, E., Garcia, M. L., Olloquequi, J., Casadesús, G., Beas-Zarate, C., Pelegri, C., Vilaplana, J., Auladell, C. ve Camins, A. 2018. Memantine for the treatment of dementia: A review on its current and future applications. *Journal of Alzheimer's Disease*, 62(3), 1223–1240.

Francomano, F., Caruso, A., Barbarossa, A., Fazio, A., La Torre, C., Ceramella, J., Mallamaci, R., Saturnino, C., Iacopetta, D. ve Sinicropi, M. S. 2019. β-caryophyllene: A sesquiterpene with countless biological properties. *Applied Sciences*, 9(24), 5420.

Friedrich, R. P., Tepper, K., Rönicke, R., Soom, M., Westermann, M., Reymann, K., Kaether, C. ve Fändrich, M. 2010. Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis of Aβ pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(5), 1942–1947.

Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T. ve Gillespie, F. 1995. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*, 373(6514), 523–527.

Gershenzon, J. ve Dudareva, N. 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, 3(7), 408–414.

Gezici, S. ve Koçum, D. 2021. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde nöroprotektif ajan olarak tıbbi bitkiler ve fitokimyasallar. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 10(2), 325–337.

Gezici, S. ve Şekeroğlu, N. 2022. Medicinal plants and phytochemicals of potential importance in the developmental process and treatment of Alzheimer's disease. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 42(2), 121–133.

Ghersi, M. S., Gabach, L. A., Buteler, F., Vilcaes, A. A., Schiöth, H. B., Perez, M. F. ve De Barioglio, S. R. 2015. Ghrelin increases memory consolidation through hippocampal

mechanisms dependent on glutamate release and NR2B-subunits of the NMDA receptor. *Psychopharmacology*, 232(10), 1843–1857.

Ghiasvand, K., Amirfazli, M., Moghimi, P., Safari, F. ve Takhshid, M. A. 2024. The role of neuron-like cell lines and primary neuron cell models in unraveling the complexity of neurodegenerative diseases: a comprehensive review. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 1024.

Gill, S. K., Bhattacharya, M., Ferguson, S. S. G. ve Rylett, R. J. 2003. Identification of a novel nuclear localization signal common to 69- and 82-kDa human choline acetyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(22), 20217–20224.

McKhann, G. 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology*. (Erişim adresi: https://www.neurology.org)

Hamlin, D., Ryall, C., Turner, C., Faull, R. L. M., Murray, H. C. ve Curtis, M. A. 2024. Characterization of neurofibrillary tangle immunophenotype signatures to classify tangle maturity in Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, 20(7), 4803–4817.

Hampel, H., Mesulam, M. M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Cavedo, E., Snyder, P. J. ve Khachaturian, Z. S. 2018. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*, 141(7), 1917–1933.

Harel, M., Schalkt, I., Ehret-Sabatiert, L., Bouett, F., Goeldnert, M., Hirtht, C., Axelsen, P. H., Silmanii, I. ve Sussman, J. L. 1993. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90.

Hart, B. A. T. 2019. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset: A translationally relevant model for the cause and course of multiple sclerosis. *Primate Biology*, 6(1), 17–58.

Heneka, M. T., Golenbock, D. T. ve Latz, E. 2015. Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nature Immunology*, 16(3), 229–236.

Holler, T., Berse, B., Cermak, J. M., Diebler, M. F. ve Blusztajn, K. 1996. Differences in the developmental expression of the vesicular acetylcholine transporter and choline acetyltransferase in the rat brain. *Neuroscience Letters*, 212.

Houser, C. R., Crawford, G. D., Barber, R. P., Salvaterra, P. M. ve Vaughn, J. E. 1983. Organization and morphological characteristics of cholinergic neurons: An immunocytochemical study with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase. *Brain Research*, 266. Elsevier Biomedical Press.

Huang, J. Z., Wu, J., Xiang, S., Sheng, S., Jiang, Y., Yang, Z. ve Hua, F. 2016. Catalpol preserves neural function and attenuates the pathology of Alzheimer's disease in mice. *Molecular Medicine Reports*, 13(1), 491–496.

Hur, J., Pak, S. C., Koo, B. S. ve Jeon, S. 2013. Borneol alleviates oxidative stress via upregulation of Nrf2 and Bcl-2 in SH-SY5Y cells. *Pharmaceutical Biology*, 51(1), 30–35.

Islam, F., Khan, A., Vaibhav, K., Javed, H., Tabassum, R., Ahmed, M. E., Khan, M. M., Khan, M. B., Shrivastava, P., Islam, F., Siddiqui, M. S. ve Safhi, M. M. 2014. 1,8-Cineole (eucalyptol) mitigates inflammation in amyloid beta toxicated PC12 cells: Relevance to Alzheimer's disease. *Neurochemical Research*, 39(2), 344–352.

Izham, M. N. M., Hussin, Y., Rahim, N. F. C., Aziz, M. N. M., Yeap, S. K., Rahman, H. S., Masarudin, M. J., Mohamad, N. E., Abdullah, R. ve Alitheen, N. B. 2021. Physicochemical characterization, cytotoxic effect and toxicity evaluation of nanostructured lipid carrier loaded with eucalyptol. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1).

Jack, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., Holtzman, D. M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J. L., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K. P., Rowe, C. C., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder, H. M. ve Silverberg, N. 2018a. NIA-AA research framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, 14(4), 535–562.

Jack, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., Holtzman, D. M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J. L., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K. P., Rowe, C. C., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder, H. M. ve Silverberg, N. 2018b. NIA-AA research framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, 14(4), 535–562.

Johnson, J. W. ve Kotermanski, S. E. 2006. Mechanism of action of memantine. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(1), 61–67.

Johnson, K. A., Fox, N. C., Sperling, R. A. ve Klunk, W. E. 2012. Brain imaging in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(4).

Jongwachirachai, P., Ruankham, W., Apiraksattayakul, S., Intharakham, S., Prachayasittikul, V., Suwanjang, W., Prachayasittikul, V., Prachayasittikul, S. ve Phopin, K. 2024. Neuroprotective properties of coriander-derived compounds on neuronal cell damage under oxidative stress-induced SH-SY5Y neuroblastoma and in silico ADMET analysis. *Neurochemical Research*.

Kametani, F. ve Hasegawa, M. 2018. Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 12(JAN). Frontiers Media S.A.

Kandiah, N., Pai, M. C., Senanarong, V., Looi, I., Ampil, E., Park, K. W., Karanam, A. K. ve Christopher, S. 2017. Rivastigmine: The advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson's disease dementia. *Clinical Interventions in Aging*, 12, 697–707. Dove Medical Press Ltd.

Karis, J. H., Nastuk, W. L. ve Katz, R. L. 1966. The action of tacrine on neuromuscular transmission: A comparison with hexafluorenium. *British Journal of Anaesthesia*, 38(10), 762–774.

Kaufmann, D., Dogra, A. K. ve Wink, M. 2011. Myrtenal inhibits acetylcholinesterase, a known Alzheimer target. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(10), 1368–1371.

Kelava, I. ve Lancaster, M. A. 2016. Dishing out mini-brains: Current progress and future prospects in brain organoid research. *Developmental Biology*, 420(2), 199–209. Academic Press Inc.

Khan, S., Barve, K. H. ve Kumar, M. S. 2020. Recent advancements in pathogenesis, diagnostics and treatment of Alzheimer's disease. *Current Neuropharmacology*, 18(11), 1106–1125.

Kim, D. Y., Kang, M. K., Lee, E. J., Kim, Y. H., Oh, H., Kim, S. Il, Oh, S. Y., Na, W. ve Kang, Y. H. 2020. Eucalyptol inhibits amyloid-β-induced barrier dysfunction in glucose-exposed retinal pigment epithelial cells and diabetic eyes. *Antioxidants*, 9(10), 1–18.

Kinney, J. W., Bemiller, S. M., Murtishaw, A. S., Leisgang, A. M., Salazar, A. M. ve Lamb, B. T. 2018. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*, 4, 575–590. Elsevier Inc.

Kocahan, S. ve Doğan, Z. 2017. Mechanisms of Alzheimer's disease pathogenesis and prevention: The brain, neural pathology, N-methyl-D-Aspartate receptors, tau protein and other risk factors. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 15(1), 1–8. Korean College of Neuropsychopharmacology.

Koch, P., Tamboli, I. Y., Mertens, J., Wunderlich, P., Ladewig, J., Stüber, K., Esselmann, H., Wiltfang, J., Brüstle, O. ve Walter, J. 2012. Presenilin-1 L166P mutant human pluripotent stem cell-derived neurons exhibit partial loss of γ-secretase activity in endogenous amyloid-β generation. *American Journal of Pathology*, 180(6), 2404–2416.

Kumar, A., Sidhu, J., Lui, F., Tsao, J. W. ve Doerr, C. 2024. Alzheimer Disease (Nursing). *StatPearls*, StatPearls Publishing.

Krysko, D. V., Vanden Berghe, T., D'Herde, K. ve Vandenabeele, P. 2008. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44(3), 205–221.

Kumar, A., Singh, A. ve Ekavali. 2015. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological Reports*, 67(2), 195–203.

LaFerla, F. M. ve Green, K. N. 2012. Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11).

Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C. A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., Homfray, T., Penninger, J. M., Jackson, A. P. ve Knoblich, J. A. 2013. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 501(7467), 373–379.

Lee, H. J., Seo, H. I., Cha, H. Y., Yang, Y. J., Kwon, S. H. ve Yang, S. J. 2018. Diabetes and Alzheimer's Disease: Mechanisms and Nutritional Aspects. *Clinical Nutrition Research*, 7(4), 229.

Lieberman, O. J., Lee, S. ve Zabinski, J. 2023. Donepezil treatment is associated with improved outcomes in critically ill dementia patients via a reduction in delirium. *Alzheimer's and Dementia*, 19(5), 1742–1751.

Li, J., Ji, X., Zhang, J., Shi, G., Zhu, X. ve Wang, K. 2014. Paeoniflorin attenuates Aβ25-35-induced neurotoxicity in PC12 cells by preventing mitochondrial dysfunction. *Folia Neuropathologica*, 52(3), 285–290.

Liktor-Busa, E., Keresztes, A., Lavigne, J., Streicher, J. M. ve Largent-Milnes, T. M. 2021. Analgesic potential of terpenes derived from *Cannabis sativa*. *Pharmacological Reviews*, 73(4), 1270–1297.

Liu, E., Zhang, Y. ve Wang, J. Z. 2024. Updates in Alzheimer's disease: From basic research to diagnosis and therapies. *Translational Neurodegeneration*, 13(1).

Li, X., Bao, X. ve Wang, R. 2016. Experimental models of Alzheimer's disease for deciphering the pathogenesis and therapeutic screening (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 37(2), 271–283.

Li, Z., Howell, K., Fang, Z. ve Zhang, P. 2020. Sesquiterpenes in grapes and wines: Occurrence, biosynthesis, functionality, and influence of winemaking processes. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(1), 247–281.

Loreto, F., Pollastri, S., Fineschi, S. ve Velikova, V. 2014. Volatile isoprenoids and their importance for protection against environmental constraints in the Mediterranean area. *Environmental and Experimental Botany*, 103, 99–106.

Luca, M., Di Mauro, M. ve Luca, A. 2019. Gut microbiota in Alzheimer's disease, depression, and type 2 diabetes mellitus: The role of oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.

Lüscher, C. ve Malenka, R. C. 2012. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6).

Magnard, J.-L., Roccia, A., Caissard, J. C., Vergne, P., Sun, P., Hecquet, R., Dubois, A., Hibrand-Saint Oyant, L., Jullien, F. ve Nicolè, F. 2015. Biosynthesis of monoterpene scent compounds in roses. *Science*, 349(6243), 81–83.

MahmoudianDehkordi, S., Arnold, M., Nho, K., Ahmad, S., Jia, W., Xie, G., Louie, G., Kueider-Paisley, A., Moseley, M. A., Thompson, J. W., St John Williams, L., Tenenbaum, J. D., Blach, C., Baillie, R., Han, X., Bhattacharyya, S., Toledo, J. B., Schafferer, S., Klein, S. ve Kaddurah-Daouk, R. 2019. Altered bile acid profile associates with cognitive impairment in Alzheimer's disease—An emerging role for gut microbiome. *Alzheimer's and Dementia*, 15(1), 76–92.

Marumoto, S., Okuno, Y. ve Miyazawa, M. 2017. Inhibition of β-secretase activity by monoterpenes, sesquiterpenes, and C13 norisoprenoids. *Journal of Oleo Science*, 66(8), 851–855.

McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D. ve Stadlan, E. M. 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. Neurology, 34(7), 939–944.

McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Kawas, C. H., Klunk, W. E., Koroshetz, W. J., Manly, J. J., Mayeux, R., Mohs, R. C., Morris, J. C., Rossor, M. N., Scheltens, P., Carrillo, M. C., Thies, B., Weintraub, S. ve Phelps, C. H. 2011. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the

National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimer's and Dementia, 7(3), 263–269.

Mohsenzadegan, M. ve Mirshafiey, A. 2012. The immunopathogenic role of reactive oxygen species in Alzheimer disease. Iranian Journal of Allergy, Asthma, and Immunology, 11(3), 203–216.

Moloney, C. M., Labuzan, S. A., Crook, J. E., Siddiqui, H., Castanedes-Casey, M., Lachner, C., Petersen, R. C., Duara, R., Graff-Radford, N. R., Dickson, D. W., Mielke, M. M. ve Murray, M. E. 2023. Phosphorylated tau sites that are elevated in Alzheimer's disease fluid biomarkers are visualized in early neurofibrillary tangle maturity levels in the post mortem brain. Alzheimer's and Dementia, 19(3), 1029–1040.

Moloney, C. M., Lowe, V. J. ve Murray, M. E. 2021. Visualization of neurofibrillary tangle maturity in Alzheimer's disease: A clinicopathologic perspective for biomarker research. Alzheimer's and Dementia, 17(9), 1554–1574.

Moulton, P. V. ve Yang, W. 2012. Air pollution, oxidative stress, and Alzheimer's disease. Journal of Environmental and Public Health, 2012, 1–9.

Murphy, M. P. ve Levine, H. 2010. Alzheimer's disease and the amyloid-β peptide. Journal of Alzheimer's Disease, 19(1), 311–323.

Nam, K. N., Choi, Y. S., Jung, H. J., Park, G. H., Park, J. M., Moon, S. K., Cho, K. H., Kang, C., Kang, I., Oh, M. S. ve Lee, E. H. 2010. Genipin inhibits the inflammatory response of rat brain microglial cells. International Immunopharmacology, 10(4), 493–499.

Ninkuu, V., Zhang, L., Yan, J., Fu, Z., Yang, T. ve Zeng, H. 2021. Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection. International Journal of Molecular Sciences, 22(11), 1–24.

Öz, D., Özbek İşbitiren, Y., Kıyı, İ. ve Yener, G. 2022. Alzheimer hastalığı klinik ölçütlerine göre demans ve hafif kognitif bozukluk ayrımında sözel akıcılık testlerinin mini mental durum testi ile birlikte kullanılması yararlı olabilir. Çukurova Medical Journal, 47(4), 1403–1411.

Pegueroles, J., Jiménez, A., Vilaplana, E., Montal, V., Carmona-Iragui, M., Pané, A., Alcolea, D., Videla, L., Casajoana, A., Clarimón, J., Ortega, E., Vidal, J., Blesa, R., Lleó, A. ve Fortea, J. 2018. Obesity and Alzheimer's disease, does the obesity paradox really exist? A magnetic resonance imaging study. Oncotarget, 9(78), Erişim adresi: www.oncotarget.com.

Penney, J., Ralvenius, W. T. ve Tsai, L. H. 2020. Modeling Alzheimer's disease with iPSC-derived brain cells. Molecular Psychiatry, 25(1), 148–167.

Perluigi, M., Di Domenico, F. ve Butterfield, D. A. 2024. Oxidative damage in neurodegeneration: roles in the pathogenesis and progression of Alzheimer disease. Physiological Reviews, 104(1), 103–197.

Physiology, C. 2007. Cellular Physiology. Cell Physiol Biochem, 20, Erişim adresi: www.karger.com/cpb.

Pistollato, F., Cano, S. S., Elio, I., Vergara, M. M., Giampieri, F. ve Battino, M. 2016. Role of gut microbiota and nutrients in amyloid formation and pathogenesis of Alzheimer disease. Nutrition Reviews, 74(10), 624–634.

Porres-Martínez, M., González-Burgos, E., Carretero, M. E. ve Gómez-Serranillos, M. P. 2016. In vitro neuroprotective potential of the monoterpenes α-pinene and 1,8-cineole against H_2O_2-induced oxidative stress in PC12 cells. Zeitschrift für Naturforschung C, 71(7–8), 191–199.

Pathak, K. P. 2018. An Overview of Dementia. MedDocs eBooks, 45, Thessaloniki.

Pries, R., Jeschke, S., Leichtle, A. ve Bruchhage, K. L. 2023. Modes of Action of 1,8-Cineol in Infections and Inflammation. Metabolites, 13(6).

Qian, X., Song, H. ve Ming, G. L. 2019. Brain organoids: Advances, applications and challenges. Development, 146(8).

Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Schmitt, F., Ferris, S. ve Möbius, H. J. 2003. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 348(14), 1333–1341.

Salmon, D. P., Thomas, R. G., Pay, M. M., Booth, A., Hofstetter, C. R., Thal, L. J. ve Katzman, R. 2002. Alzheimer's disease can be accurately diagnosed in very mildly impaired individuals. *Neurology*, 59(7), 1022–1028.

Santos, C. Y., Snyder, P. J., Wu, W. C., Zhang, M., Echeverria, A. ve Alber, J. 2017. Pathophysiologic relationship between Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, and cardiovascular risk: A review and synthesis. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring*, 7, 69–87.

Schneider, L. S., Mangialasche, F., Andreasen, N., Feldman, H., Giacobini, E., Jones, R., Mantua, V., Mecocci, P., Pani, L., Winblad, B. ve Kivipelto, M. 2014. Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: An appraisal from 1984 to 2014. *Journal of Internal Medicine*, 275(3), 251–283.

Schupf, N., Tang, M. X., Fukuyama, H., Manly, J., Andrews, H., Mehta, P., Ravetch, J. ve Mayeux, R. 2008. Peripheral Aβ subspecies as risk biomarkers of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(37), 14052–14057.

Schwab, E. D. P., Queiroz, R., Fiebrantz, A. K. B., Bastos, M., Bonini, J. S. ve Silva, W. C. F. N. da. 2022. Hypothesis on ontogenesis and pathophysiology of Alzheimer's disease. *Einstein (São Paulo)*, 20, eRW0170.

Seltzer, B. 2007. Donepezil: An update. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 8(7), 1011–1023.

Shabana, S. M., Gad, N. S., Othman, A. I., Mohamed, A. F. ve El-Missiry, M. A. 2023. β-caryophyllene oxide induces apoptosis and inhibits proliferation of A549 lung cancer cells. *Medical Oncology*, 40(7).

Sharma, K. 2019. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Molecular Medicine Reports*, 20(2), 1479–1487.

Sharma, P., Srivastava, P., Seth, A., Tripathi, P. N., Banerjee, A. G. ve Shrivastava, S. K. 2019. Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer's disease and potential therapeutic strategies. *Progress in Neurobiology*, 174, 53–89.

Shin, Y. K. ve Seol, G. H. 2023. Effects of linalyl acetate on oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction: can linalyl acetate prevent mild cognitive impairment? *Frontiers in Pharmacology*, 14.

Shipley, M. M., Mangold, C. A. ve Szpara, M. L. 2016. Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(108).

Schupf, N., Tang, M. X., Fukuyama, H., Manly, J., Andrews, H., Mehta, P., Ravetch, J. ve Mayeux, R. 2008. Peripheral Aβ subspecies as risk biomarkers of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(37), 14052–14057.

Sierra-Fonseca, J. A., Najera, O., Martinez-Jurado, J., Walker, E. M., Varela-Ramirez, A., Khan, A. M., Miranda, M., Lamango, N. S. ve Roychowdhury, S. 2014. Nerve growth factor induces neurite outgrowth of PC12 cells by promoting Gβγ-microtubule interaction. *BMC Neuroscience*, 15(1).

Solana-Manrique, C., Sánchez-Pérez, A. M., Paricio, N. ve Muñoz-Descalzo, S. 2025. Two- and Three-Dimensional In Vitro Models of Parkinson's and Alzheimer's Diseases: State-of-the-Art and Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(2).

Tekin, B., Elmacıoğlu, F. ve Ülker, M. T. 2023. Alzheimer Disease-Type 3 Diabetes: Traditional Review. *Türkiye Klinikleri Journal of Health Sciences*, 8(1), 153–160.

Varadharajan, A., Davis, A. D., Ghosh, A., Jagtap, T., Xavier, A., Menon, A. J., Roy, D., Gandhi, S. ve Gregor, T. 2023. Guidelines for pharmacotherapy in Alzheimer's disease - A primer on FDA-approved drugs. *Journal of Neurosciences in Rural Practice*, 14(4), 566–573.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. ve Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184(1), 39–51.

Wang, J. H., Xie, H., Zhao, T. K. ve Kang, B. 2015. Catalpol regulates cholinergic nerve system function through effect on choline acetyl-transferase not M receptor affinity. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 69, 291–296.

Wang, J., Jin, C., Zhou, J., Zhou, R., Tian, M., Lee, H. J. ve Zhang, H. 2023. PET molecular imaging for pathophysiological visualization in Alzheimer's disease. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 50(3), 765–783.

Wang, R. ve Reddy, P. H. 2017. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(4), 1041–1048.

Wang, W., Li, Y., Dang, P., Zhao, S., Lai, D. ve Zhou, L. 2018. Rice secondary metabolites: Structures, roles, biosynthesis, and metabolic regulation. *Molecules*, 23(12).

Weinstock, M. 1999. Selectivity of cholinesterase inhibition: Clinical implications for the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drugs*, 12(4), 307–323.

Wojtunik-Kulesza, K., Rudkowska, M., Kasprzak-Drozd, K., Oniszczuk, A. ve Borowicz-Reutt, K. 2021. Activity of selected group of monoterpenes in Alzheimer's disease symptoms in experimental model studies—A non-systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14).

Woolf, N. J. ve Butcher, L. L. 2011. Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness. *Behavioural Brain Research*, 221(2), 488–498.

Xicoy, H., Wieringa, B. ve Martens, G. J. M. 2017. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 10.

Xu, Z. P., Yang, S. L., Zhao, S., Zheng, C. H., Li, H. H., Zhang, Y., Huang, R. X., Li, M. Z., Gao, Y., Zhang, S. J., Zhan, P. Y., Zhang, L. F., Deng, L., Wei, S., Liu, Y. C., Ye, J. W., Ren, H. J., Li, N., Kong, C. X. ve Wang, J. Z. 2016. Biomarkers for early diagnostic of mild cognitive impairment in type-2 diabetes patients: a multicentre, retrospective, nested case-control study. *EBioMedicine*, 5, 105–113.

Yang, J., Xian, M., Su, S., Zhao, G., Nie, Q., Jiang, X., Zheng, Y. ve Liu, W. 2012. Enhancing production of bio-isoprene using hybrid MVA pathway and isoprene synthase in *E. coli*. *PLoS ONE*, 7(4), e33509.

Yaylı, N. (2006). Uçucu yağlar ve tıbbi kullanımları. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, *19*(1), 35–50.

Yıldırım, N. ve Eke, B. C. 2024. Alzheimer's disease, risk factors and therapy. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 48(2), 766–790.

Zahr, N. M. 2024. Alcohol Use Disorder and Dementia: A Review. *Alcohol Research: Current Reviews*, 44(1), 1–12.

Zetterberg, H. ve Bendlin, B. B. 2021. Biomarkers for Alzheimer's disease—preparing for a new era of disease-modifying therapies. *Molecular Psychiatry*, 26(1), 296–308.

Zhang, T., Han, Y. R., Wang, J. Y., Hou, D., Deng, H., Deng, Y. L. ve Song, Z. 2018. Comparative Epidemiological Investigation of Alzheimer's Disease and Colorectal Cancer: The Possible Role of Gastrointestinal Conditions in the Pathogenesis of AD. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 176.

Zhang, Y., Xia, Z., Liu, J. ve Yin, F. 2015. Cell Signaling Mechanisms by which Geniposide Regulates Insulin-Degrading Enzyme Expression in Primary Cortical Neurons. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 14(3), 370–377.

Zhang, Y., Yin, F., Liu, J., Liu, Z., Guo, L., Xia, Z. ve Zidichouski, J. 2015. Geniposide attenuates insulin-deficiency-induced acceleration of β-amyloidosis in an APP/PS1 transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 89, 7–16.

Zhong, Z., Wang, B., Dai, M., Sun, Y., Sun, Q., Yang, G. ve Bian, L. 2013. Carvacrol alleviates cerebral edema by modulating AQP4 expression after intracerebral hemorrhage in mice. *Neuroscience Letters*, 555, 24–29.

Alzheimer's Association. 2024. 2024 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 20(5), 3708–38.