



**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI**

**SH-SY5Y HÜCRE HATTININ 3D MODELİNDE circRNA-miRNA
SÜNGERİNDEKİ GENLERİNİN ACHYROFURAN İLE
HEDEFLENMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Merve BOZKURT

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Sırma GEYİK

GAZİANTEP

Kasım-2025



**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI**

**SH-SY5Y HÜCRE HATTININ 3D MODELİNDE circRNA-miRNA
SÜNGERİNDEKİ GENLERİNİN ACHYROFURAN İLE
HEDEFLENMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Merve BOZKURT

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Sırma GEYİK

GAZİANTEP

Kasım-2025

TEZ ONAY SAYFASI
T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

**SH-SY5Y HÜCRE HATTININ 3D MODELİNDE circRNA-miRNA SÜNGERİNDEKİ
GENLERİNİN ACHYROFURAN İLE HEDEFLENMESİ**

Dr. Merve BOZKURT

05/11/2025

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

Prof. Dr. Şevki Hakan EREN
Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Sırma Geyik
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

Prof. Dr. Sırma GEYİK
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1. Prof. Dr. Sırma Geyik
2. Prof. Dr. Aylin Akçalı
3. Doç. Dr. Halil Ay

YEDEK JÜRİ

1. Prof. Dr. Feridun Bülbül
2. Prof. Dr. Ayşe Aysima Özçelik

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince danışmanlığı, yol göstericiliği, hekimliği ile her zaman bana destek olan, tezimin planlanması ve tamamlanmasında katkılarını esirgemeyen, bundan sonraki meslek hayatımda da gururla örnek alacağım çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Sırma GEYİK'e,

Tez sürecim boyunca bilimsel birikimi, yol gösterici yaklaşımı ve her zaman destekleyici tutumuyla bana ilham veren, aynı zamanda sabrı, ilgisi ve güven verici tutumuyla yanımda olan değerli hocam Prof. Dr. Şenay GÖRÜCÜ YILMAZ'a,

Asistanlık sürecim boyunca bilgi, birikim ve deneyimiyle her zaman yanımda olan; bilimsel disiplini, yol gösterici tutumu ve üretkenliğiyle bana ilham veren; aynı zamanda insani değerlere verdiği önem, sabrı ve anlayışıyla her zaman örnek aldığım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Aylin AKÇALI'ya,

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle akademik ve mesleki gelişimime büyük katkı sağlayan; her zaman desteklerini hissettiren değerli hocalarım Doç. Dr. Halil AY ve Doç. Dr. Sedat YAŞIN'e,

Tüm asistan arkadaşlarıma,

Bu süreçte her zaman yanımda olan, sevgisiyle güç veren, sabrıyla destekleyen ve en zor zamanlarıma bile kolaylaştıran canım eşim Mustafa BOZKURT'A,

Hayatımın her döneminde benden desteklerini esirgemeyen, bugünlere gelmemde çok emekleri olan, canımdan çok sevdiğim annem, babam ve kardeşlerime, Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kasım -2025

Dr. Merve BOZKURT

ÖZET

BOZKURT M, SH-SY5Y HÜCRE HATTININ 3D MODELİNDE CİRCRNA-MİRNA SÜNGERİNDEKİ GENLERİNİN ACHYROFURAN İLE HEDEFLENMESİ, GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ NÖROLOJİ ANABİLİM DALI, TIPTA UZMANLIK TEZİ, GAZİANTEP, 2025.

Amaç: Bu çalışmada, Alzheimer hastalığında miRNA ve circRNA'ların tanı ve tedavi potansiyeli incelenmiştir. Achyrofuran'ın A β ve tau proteinlerini hedefleyen circRNA-miRNA etkileşimlerine etkisi değerlendirilmiş; bu etkileşimlerin gen ekspresyonu ile apoptoz, otofaji ve mitofaji süreçlerindeki rolleri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Achyrofuranın Alzheimer ile ilişkili moleküler mekanizmalarını incelemek amacıyla SH-SY5Y hücre hattı kullanıldı. Hücreler, retinoik asit, BDNF ve db-cAMP içeren 18 günlük protokol ile nöron-benzeri fenotipe farklılaştırılmıştır. Deneysel toksisite ve tau modelleri A β oligomerleri ve okadaik asit ile oluşturuldu. Achyrofuran 0.07 μ g/ml dozunda uygulanarak etkileri değerlendirildi. Hücre canlılığı ve proliferasyonu Trypan Blue, CCK-8 ve MTT testleriyle; apoptoz, otofaji ve mitofaji ELISA tabanlı kitlerle incelendi. Gen, miRNA ve circRNA ekspresyonları qRT-PCR; hücre morfolojisi faz kontrast mikroskopi; Tau ve A β proteinleri ise immünohistokimya ile analiz edilmiştir. Veriler SPSS 11.0 ile değerlendirilmiş, $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular: SH-SY5Y hücreleri, 18 günlük protokol sonunda nöron-benzeri morfoloji geliştirmiştir. Achyrofuran tedavisi hücre canlılığını azaltırken apoptozu artırmıştır. BECN1 ve LC3-II artışı ile p62 azalması otofaji aktivasyonunu göstermiştir. CYCS, CASP3 ve CASP9 gen ekspresyonları yükselirken bunları hedefleyen miRNA'lar baskılanmış, ilgili circRNA'lar ise artış göstermiştir. Mitofaji yolunda PINK1 yükselmiş, LRRK2 azalmış, PARK2'de ise anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. İmmünohistokimya, A β agregasyonunun azaldığını ancak tau proteininin yanlış lokalizasyonunun sürdüğünü ortaya koymuştur. Bulgular, Achyrofuran'ın otofaji ve mitofaji aracılığıyla nöroprotektif etki gösterebileceğini, ancak apoptoz artışı ve tau patolojisinin bu etkiyi sınırladığını ortaya koymaktadır.

Sonuç: Bu çalışma, Achyrofuran'ın SH-SY5Y hücrelerinde otofaji, apoptoz ve mitofajiyi düzenlediğini göstermiştir. A β birikimini azaltmasına karşın artan apoptoz ve sınırlı mitofaji etkisini kısıtlamıştır. Bulgular, uygun doz ve kombinasyonların gelecekte araştırılmasını önermektedir.

Anahtar kelimeler: Achyrofuran, Alzheimer hastalığı, SH-SY5Y hücreler

ABSTRACT

BOZKURT M. TARGETING GENES WITHIN THE CIRCRNA-MIRNA SPONGE NETWORK USING ACHYROFURAN IN A 3D MODEL OF SH-SY5Y CELLS. MEDICAL SPECIALIZATION THESIS, DEPARTMENT OF NEUROLOGY, FACULTY OF MEDICINE, GAZIANTEP UNIVERSITY, GAZIANTEP, 2025.

Aim: In this study, the diagnostic and therapeutic potential of miRNAs and circRNAs in Alzheimer's disease was investigated. The effect of Achyrofuran on circRNA-miRNA interactions targeting A β and tau proteins was evaluated, and their roles in gene expression as well as in apoptosis, autophagy, and mitophagy were investigated.

Methods: The SH-SY5Y cell line was employed to investigate the molecular mechanisms of Alzheimer's disease associated with Achyrofuran. The cells were differentiated into a neuron-like phenotype through an 18-day protocol involving retinoic acid, BDNF, and db-cAMP. Experimental toxicity and tau models were induced using A β oligomers and okadaic acid. Achyrofuran was administered at a dose of 0.07 μ g/ml to evaluate its effects. Cell viability and proliferation were assessed using Trypan Blue, CCK-8, and MTT assays, while apoptosis, autophagy, and mitophagy were analyzed with ELISA-based kits. Gene, miRNA, and circRNA expressions were analyzed by qRT-PCR; cell morphology by phase-contrast microscopy; and Tau and A β proteins by immunocytochemistry. Data were analyzed using SPSS 11.0, with $p < 0.05$ considered statistically significant.

Results: SH-SY5Y cells developed a neuron-like morphology at the end of the 18-day protocol. Achyrofuran treatment reduced cell viability while increasing apoptosis. An increase in BECN1 and LC3-II accompanied by a decrease in p62 indicated autophagy activation. CYCS, CASP3, and CASP9 gene expressions were upregulated, while their targeting miRNAs were suppressed and the corresponding circRNAs were increased. In the mitophagy pathway, PINK1 was upregulated, LRRK2 was downregulated, while no significant change was observed in PARK2. Immunocytochemistry revealed a reduction in A β aggregation but persistent mislocalization of tau protein. The findings suggest that Achyrofuran may exert neuroprotective effects through autophagy and mitophagy; however, increased apoptosis and tau pathology limit this effect.

Conclusion: This study demonstrated that Achyrofuran modulates autophagy, apoptosis, and mitophagy in SH-SY5Y cells. Although it reduced A β accumulation, increased apoptosis and limited mitophagy constrained its effect. The findings suggest that appropriate dosing and combination strategies should be explored in future studies.

Keywords: Achyrofuran, Alzheimer's disease, SH-SY5Y cells

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGE VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER.....	xi
TABLOLAR	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Alzheimer Hastalığı.....	3
2.1.1. Tanım ve Tiplendirme	3
2.1.2. Epidemiyoloji	5
2.1.3. Etyoloji	5
2.1.4. Patoloji.....	8
2.1.5. Patogenez.....	9
2.2. Alzheimer Hastalığına Hücresel Yaklaşım	11
2.3. Hücre Modellerinde Terapötik Test	12
2.4. 3 Boyutlu (3D) Hücre Kültürü	14
2.5. Fitokimyasallar ve Alzheimer Hastalığı'ndaki Yeri	15
2.6. Achyrofuran Satureioides.....	17
2.6.1. Toksisite	19
2.7. Apoptosis, Otofaji ve Mitofaji	19
2.8. Dairesel RNA'lar (circRNA) ve mikroRNA'lar (miRNA).....	21
2.9. Fitokimyasallar ve Terapi Uygulamaları.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Materyaller	24
3.1.1. Stok Solüsyonlar.....	24
3.2. Kültür Medyumlarının (Besi Ortamlarının) Hazırlanması.....	24

3.3. Hücre Kültürüne Farklılaştırma	26
3.3.1. Hücre Hattı: SH-SY5Y	26
3.3.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Primer Kültürü ve Alt Kültür Yapılması	26
3.3.3. Alt Kültür (P1).....	26
3.3.4. SH-SY5Y Kültürünün Pasajlanması	27
3.3.4. SH-SY5Y Hücrelerinin Dondurulması.....	27
3.3.5. Farklılaşma Protokolü	27
3.5. Hücre Morfolojisi ve Canlılık Analizleri	32
3.5.1. Hücre Morfolojisinin Analizi	32
3.5.2. Farklılaşmış Hücrelerin Kültürlenmesi	32
3.5.3. Asılı Damlaların Oluşumu.....	33
3.5.4. Achyrofuran Uygulaması	33
3.6. Gen, circRNA ve miRNA Ekspresyonlarının Analizi	34
3.6.1. Ekspresyonu Yapılacak Genlerin Seçimi	34
3.6.2. Ekspresyon Analizleri.....	36
3.7. Apoptoz, Otofaji ve Mitofaji	37
3.7.1. Tripan Blue ile Hücre Canlılığının Tespiti	37
3.7.2. Hücre Proliferasyon Analizi	38
3.7.3. MTT Sitotoksosite Testi	38
3.7.4. Apoptoz Analizi.....	39
3.7.5. Mitofaji Analizi	40
3.7.6. Otofaji Analizi	41
3.8. İmmünohistokimya (ICC) ile TAU ve A β Değerlendirilmesi	42
3.9. İstatistiksel Analiz	43
4. BULGULAR	44
4.1. SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaşması.....	44
4.2. Achyrofuran Tedavisi ve Hücre Canlılığı	44
4.3. Apoptoz, Otofaji ve Mitofaji Analizleri	45
4.4. Gen ve circRNA/miRNA Ekspresyonu.....	45
4.4.1. Otofaji Yolağı	48
4.4.2. Apoptoz Yolağı	49
4.4.3. Mitofaji Yolağı	50

4.4.4. Entegre Analizler.....	51
4.5. 3 Boyutlu Kültürde Fonksiyonel Doğrulama	52
4.6. İmmünohistokimya (TAU and A β)	55
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	74
7. KAYNAKLAR	75



SİMGE VE KISALTMALAR

2D:	2 Boyutlu
3D:	3 Boyutlu
AChE:	Asetilkolinesteraz
AH:	Alzheimer Hastalığı
APP:	Amiloid Prekürsör Proteini
Aβ:	Amiloid-Beta
BDNF:	Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktörü
BOS:	Beyin Omurilik Sıvısı
circ RNA:	Dairesel RNA
CNS:	Merkezi Sinir Sistemi
db-cAMP:	Dibütil Siklik Adenozin Monofosfat
DMSO:	Dimetil Sülfoksit
ECM:	Doğal Hücre Dışı Matrisi
EOAD:	Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
fAD:	Ailesel Alzheimer hastalığı
iPSC:	İndüklenen Pluripotent Kök Hücreler
lncRNA:	Uzun Kodlamayan RNA
LOAD:	Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
MAP:	Mikrotübül ile ilişkili protein
miRNA:	mikroRNA
NFT:	Nörofibriler Yumaklar
PET:	Pozitron Emisyon Tomografisi
PSEN:	Presenilin 2
PSEN1:	Presenilin 1
RA:	Retinoik Asit
RCT:	Randomize Kontrollü Çalışma
sAD:	Sporadik Alzheimer Hastalığı
SH-SY5Y:	İnsan Nöroblastoma Hücreleri
TF:	Transkripsiyon Faktörleri

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Alzheimer hastalığı ile ilişkili genetik varyantlar.....	7
Şekil 2.2. Alzheimer hastalığında görülen patolojik bulgular	8
Şekil 3.1. Farklılaşma evrelerinin zaman tablosu.	28
Şekil 4.1. SH-SY5Y Nöronal Farklılaşması Sırasında Morfolojik Değişiklikler.....	44
Şekil 4.2. (A) MTT canlılık testi (24 saat). (B) CCK-8 çoğalma eğrisi (0–72 saat)..	45
Şekil 4.3. (A) Apoptozis (absorbans 450 nm). (B) LC3A düzeyleri (ng/mL). (C) Mitofaji (COX-I/SDH-A oranı).	45
Şekil 4.4. miRNA/circRNA ekspresyonunun ısı haritası (log2 kat değişimi).	47
Şekil 4.5. Genler ve kodlamayan RNA ekspresyonlarının AH ile ilgili yollardaki değişimleri.....	53
Şekil 4.6. A β agregasyonunun ve Tau yanlış lokalizasyonunun immünohistokimyasal kantifikasyonu.	55
Şekil 4.7. (A) Kontrol ve (B) Achyrofuran ile tedavi edilen gruplarda A β agregasyonu ve Tau yanlış lokalizasyonunun immünohistokimyasal kantifikasyonu.	56

TABLÖLAR

Tablo 3.1. Gen, miRNA ve hedef circRNA'lar.....	34
Tablo 3.2. Gen ifadeleri için reaksiyon karışımı	36
Tablo 3.3. İnkübasyon koşulları.	37
Tablo 4.1. AH ile İlgili Genlerin, miRNA'ların ve circRNA'ların entegre ifade profili.....	46
Tablo 4.2. Yolakların karşılaşması ve AH ile ilişkisi.....	51



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer hastalığı (AH), beyin patolojisiyle ilişkili nörodejeneratif bozukluktur ve şu anda dünya çapında on milyonlarca insanı etkilemektedir (1). Ne yazık ki, dünya nüfusu yaşlandıkça, bu hastalıkların çoğunun görülme sıklığı artmaya devam edecek ve 2050 yılına kadar iki katından fazla olması bekleniyor (2). Bu hastalığa yönelik etkili tedavilerin artan yükü göz önüne alındığında, yeni tedavilere yönelik yüksek bir talep bulunmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklara yönelik terapötiklerin geliştirilmesindeki temel adım, nörodejeneratif süreçlerin incelenmesi ve nörodejenerasyonun temel suçlularının belirlenmesi için güvenilir analizlerin oluşturulmasıdır. Nörodejenerasyon, merkezi sinir sisteminde (CNS) meydana gelen ve ilerleyici yapısal ve fonksiyonel eksikliklerle ve sonuçta nöron hücrelerinin ölümüyle sonuçlanan çeşitli patolojik süreçleri tanımlamak için kullanılan bir şemsiye terimdir. Birçok nörodejeneratif hastalık, hücresel ve moleküler düzeyde benzer etyolojileri paylaşır, ancak fenotipik düzeyde, örneğin duyu-motor ve bilişsel işlevlerin ilerleyici kaybı gibi farklı özellikler sunar. Yaşlanma, genetik faktörler ve metaller, pestisitler veya travmatik beyin yaralanmaları gibi çevresel faktörler de dahil olmak üzere AH ile ilişkili çeşitli risk faktörleri vardır (3). Bununla birlikte, büyük önem taşıyan bir özellik, hastalığa özgü proteinlerin çözünmeyen agregatlar halinde patolojik olarak geri döndürülemez bir şekilde birleşmesidir. Pek çok nörodejeneratif hastalıkta, hastalığın erken ve genellikle semptomatik olmayan aşamasında spesifik proteinler farklı beyin bölgelerinde toplanmaya başlarken, ileri aşamalarda başka beyin bölgeleri de devreye girer. AH yanlış katlanmış, çözünmeyen agregatlar halinde endojen protein toplanması ile karakterize en yaygın nörodejeneratif bozukluktur (4). Bireysel nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili çok sayıda protein bilinmektedir; ancak nörodejeneratif hastalıkların gelişimi ve ilerlemesindeki zararlı rollerini ortadan kaldıracak etkili ilaç adayları hâlâ mevcut değildir. Bu amaçla hastalığa özgü nörodejenerasyonun nedenlerini ve sonuçlarını belirlemek, etkili tedavilerin geliştirilmesi için bir ön koşuldur. Günümüzde farklı hastalıklara benzeyen hücre analizleri ilaç keşfinde önemli bir adım olarak kullanılıyor. AH, histolojik olarak

amiloid öncü proteininin sekretaz (5) tarafından sıralı bölünmesinden kaynaklanan A β peptidlerinden (6) oluşan hücre dışı senil plaklarla karakterize edilir. A β peptidlerinin varlığı, hiperfosforile tau proteininden oluşan AH'nin ikinci histolojik özelliği olan nörofibriler yumakların (7) oluşumuna yol açan patojenik bir kademeyi tetikler. Hem A β hem de tau proteini nöronlarda sırasıyla sinaptik fonksiyonun düzenlenmesi (8) ve mikrotübüllerin stabilize edilmesi (9) gibi fizyolojik roller oynar. Ancak bunların patolojik toplanması, nöronal yapıya ve fonksiyona giderek zarar verir. AH'de nöron ölümü esas olarak amigdala, neokorteks ve hipokampusta görülür (10). CNS'deki kolinerjik nöronların derin hasarı ve kaybı, Alzheimer'ın önemli bir klinik özelliği olan bilişsel işlevlerde ciddi bir düşüşe neden olur (11). AH patolojisinin araştırılmasında hayvan deneylerinden önce hücresel cevabın ortaya konulması önemlidir. Bu nedenle geleneksel hücre kültürüne karşı nöronal hücrelerin doğal ortamına en yakın modellenmesi için 3 boyutlu (3D) kültürler avantajlıdır.

miRNA ve dairesel RNA (circ RNA) kodlayıcı olmayan RNA molekülleridir. Bu RNA molekülleri Alzheimer hastalığının araştırılması, teşhisi, izlemi ve tedavisinde önemli yer tutmaktadır. Araştırmamızın amacı seçtiğimiz sirküler RNA'lar ve miRNA'ların sinerjisi ve sonuçlarının yanında achiyofuran yönetimindeki düzenlenmelerinin AH'nin tedavisindeki rolleri konusunda veri elde etmektir. Aynı zamanda çalışma sonuçları bu circRNA ve miRNA'ların genleri düzenlemesi durumunda terapötik hedef olarak potansiyellerini de gösterecektir.

AH patolojisinde 2 önemli molekül A β ve tau protein oluşumunu achiyofuran ile tedavi etmek temel hedeftir. Bu hedefe ulaşmak için genler üzerinde transkripsiyonel düzenleyiciler olarak görev yapan circRNA'lar ve taşıdıkları spesifik miRNA'ların hedefledikleri genlerle birlikte ekspresyonları araştırılacaktır. Genler apoptoz, otofaji ve mitofajide temel genlerdir ve bu genleri hedefleyen miRNA-circRNA'lar seçilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

2.1.1. Tanım ve Tiplendirme

Alzheimer hastalığı (AH) Dünya Sağlık Örgütü tarafından küresel bir halk sağlığı önceliği olarak kabul edilmektedir. Alzheimer hastalığı demansın ana nedenidir ve hızla bu yüzyılın en pahalı, ölümcül ve yük getiren hastalıklarından biri haline gelmektedir (12). Alois Alzheimer'ın 1907'de ilk vakayı bildirmesinden bu yana AH patogenezi ve hastalığın kavramsallaştırılmasını anlamamızdaki büyük kazanımlara rağmen (13) halen hastalığı modifiye edici bir tedavi bulunmamaktadır.

DSM-IV-TR'ye (Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı, Dördüncü Baskı, Metin Gözden Geçirme) göre AH, Alzheimer Tipi Demans altında sınıflandırılır ve aşağıdaki kriterlere göre teşhis edilir:

Alzheimer Tipi Demans için Tanı Kriterleri (DSM-IV-TR)

A. Her ikisiyle de ortaya çıkan çoklu bilişsel eksikliklerin gelişimi: Hafıza bozukluğu (yeni bilgi öğrenme veya daha önce öğrenilen bilgileri hatırlama yeteneğinin bozulması). Bilişsel bozukluklardan biri (veya daha fazlası): Afazi (dil bozukluğu), Apraksi (sağlam motor becerilere rağmen bozuk motor fonksiyonu), agnozi (sağlam duyuşsal fonksiyona rağmen nesneleri tanıma veya tanımlama başarısızlığı), yönetici işlev bozukluğu (örneğin planlama, organize etme, soyut düşünme)

B. Bilişsel eksiklikler sosyal veya mesleki işlevsellikte önemli bozulmaya neden olur ve önceki işlevsellik düzeyine göre bir düşüşü temsil eder.

C. Seyir, kademeli başlangıç ve devam eden bilişsel gerileme ile karakterizedir.

D. Bilişsel eksiklikler şunlardan kaynaklanmaz: Diğer merkezi sinir sistemi rahatsızlıkları (örn. serebrovasküler hastalık, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı), sistemik rahatsızlıklar (örn. hipotiroidizm, B12 vitamini eksikliği), madde kaynaklı rahatsızlıklar (örn. uyuşturucu kullanımı, ilaç yan etkileri).

E. Eksiklikler yalnızca deliryum seyri sırasında ortaya çıkmaz.

F. Bozukluk, başka bir Eksen I bozukluğu (örn. Majör Depresif Bozukluk, Şizofreni) ile daha iyi açıklanamaz.

Hastalık alt tiplere göre sınıflandırdığında ikiye ayrılır: Erken Başlangıçlı (EOAD) (65 yaşından önce), geç başlangıçlı (LOAD) (65 yaş ve üzeri).

Bu özelliklere ek olarak AH genellikle zamanla ilerleyici bir kötüleşmeye sahiptir. Genetik faktörler (örn. APP, PSEN1, PSEN2 genlerindeki mutasyonlar) özellikle erken başlangıçlı vakalarda rol oynayabilir. Kesin tanı için nöropatolojik doğrulama (örn. amiloid plaklar, nörofibriler düğümler) gereklidir, ancak olası AH için klinik kriterler kullanılır.

A. Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı (EOAD)

Erken başlangıçlı Alzheimer hastalığı, 65 yaşın altındaki bireyleri etkileyen ve genellikle 40'lı veya 50'li yaşlarda görülen nadir bir demans türüdür. Daha yaygın olan geç başlangıçlı Alzheimer'ın aksine, erken başlangıçlı vakalar genellikle APP, PSEN1 veya PSEN2 gibi genlerdeki mutasyonlarla bağlantılı güçlü bir genetik bileşene sahiptir. Semptomlar arasında ilerleyici hafıza kaybı, kafa karışıklığı, dil zorluğu ve bozulmuş yargılama bulunur ve bunlar işi, ilişkileri ve günlük yaşamı önemli ölçüde etkileyebilir. Atipik başlangıç yaşı nedeniyle, durum sıklıkla yanlış teşhis edilir ve uygun tedavi ve desteği geciktirir. Bir tedavisi olmasa da ilaçlar, bilişsel terapi ve yaşam tarzı ayarlamaları gibi erken teşhis ve müdahaleler semptomları yönetmeye ve yaşam kalitesini iyileştirmeye yardımcı olabilir. Erken başlangıçlı Alzheimer'dan etkilenen aileler, hastalığın duygusal ve pratik zorluklarıyla başa çıkmak için genetik danışmanlık ve destek gruplarından da yararlanabilir.

B. Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı (LOAD)

Genellikle 65 yaşından sonra ortaya çıkan LOAD, en yaygın demans türüdür ve Alzheimer vakalarının çoğunluğunu oluşturur. Hafıza kaybı, bozulmuş muhakeme, dil güçlükleri ve davranış değişiklikleri gibi ilerleyici bilişsel gerileme ile karakterizedir ve nihayetinde ciddi sakatlığa ve bağımlılığa yol açar. LOAD'un birincil patolojik ayırt edici özellikleri arasında, nöronal iletişimi bozan ve nörodejenerasyonu tetikleyen hiperfosforile tau proteininden oluşan nörofibriler yumaklar ve amiloid-beta plaklarının birikmesi yer alır. Kesin nedeni henüz belirsizliğini korurken, genetik, çevresel ve yaşam tarzı faktörleri gelişimine katkıda bulunur. APOE ε4 aleli, kesin olmasa da en güçlü genetik risk faktörüdür; kardiyovasküler hastalık, diyabet ve hareketsiz yaşam tarzı da duyarlılığı artırabilir.

Tanı, klinik değerlendirme, bilişsel test, nörogörüntüleme ve biyobelirteç analizini içerir; ancak kesin onay için postmortem muayene gerekir. Kolinesteraz inhibitörleri ve NMDA reseptör antagonistleri gibi mevcut tedaviler semptomatik rahatlama sağlar ancak hastalığın ilerlemesini durdurmaz. Anti-amiloid antikorlar (örn. lecanemab) ve tau hedefleme yaklaşımları dahil olmak üzere hastalığı değiştiren terapiler üzerine araştırmalar devam etmektedir. Vasküler sağlık, diyet ve bilişsel katılımı hedef alan erken tespit ve müdahaleler riski azaltmaya veya başlangıcı geciktirmeye yardımcı olabilir. LOAD, hastalar, bakıcılar ve sağlık sistemleri için önemli zorluklar ortaya koyar ve mekanizmaları ve etkili tedavileri üzerine sürekli araştırma yapılması gerektiğini vurgular.

2.1.2. Epidemiyoloji

Demans - günlük yaşam aktivitelerini etkileyecek kadar edinilmiş ilerleyici bilişsel bozukluk - bağımlılık, engellilik ve ölümün önemli bir nedenidir. Mevcut tahminlere göre şu anda dünya çapında 44 milyon kişi demansla yaşamaktadır. Nüfus yaşlandıkça bu rakamın 2050 yılına kadar üç katına çıkacağı ve sadece ABD'de demansın yıllık maliyetinin 600 milyar ABD dolarını aşacağı tahmin edilmektedir (14). Son çalışmalar, özellikle erkeklerde demans insidansının batı ülkelerinde azalıyor olabileceğini göstermektedir; hangi demans nedenlerinin azaldığı belirsizdir ve bu durum vasküler riskin daha iyi yönetilmesiyle destekleniyor olabilir (15, 16). Önümüzdeki yıllarda, demans prevalansında en büyük artışın kardiyovasküler hastalık, hipertansiyon ve diyabette artış gösteren düşük ve orta gelirli ülkelerde olması beklenmektedir (14). Demansın % 50-75'ini oluşturan AH, demansın en büyük nedenidir ve 65 yaşından sonra her 5 yılda bir prevalansı kabaca ikiye katlanan, esas olarak yaşamın ilerleyen dönemlerine ait bir durumdur (14).

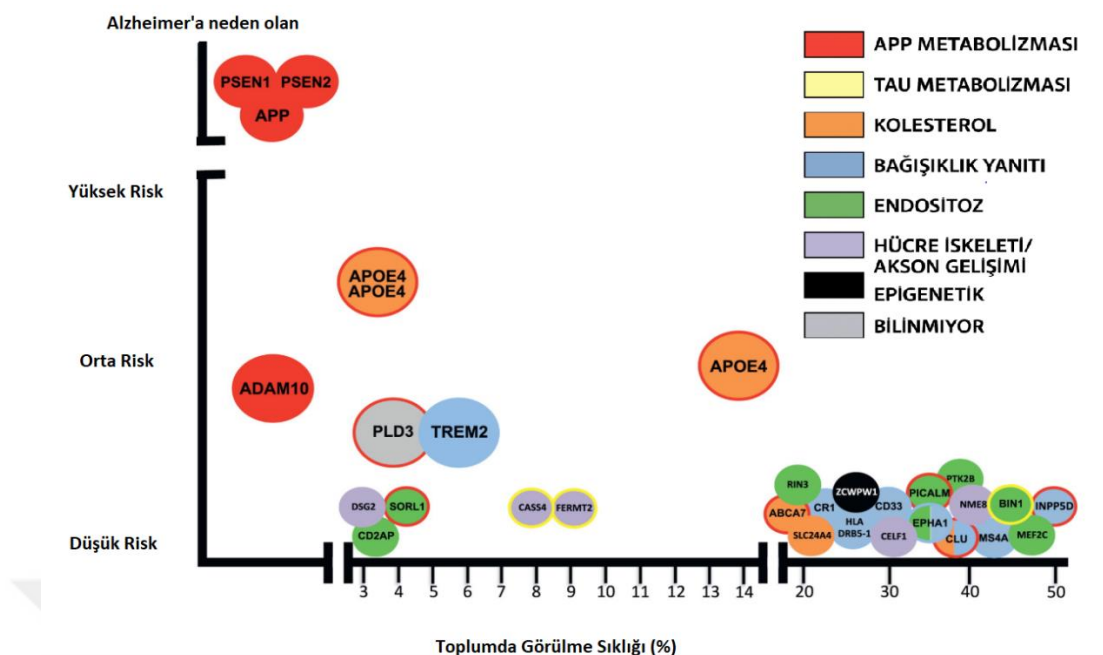
2.1.3. Etiyoloji

Alzheimer hastalığı (AH), patogeneze bağlı olarak sporadik ve ailesel olmak üzere iki temel formda sınıflandırılmaktadır. Sporadik Alzheimer hastalığı (sAD), genellikle 65 yaşından sonra ortaya çıkarken, nadir görülen ailesel Alzheimer hastalığı (fAD) genellikle 30-50 yaş arasında başlar. Ailesel form, çoğunlukla amiloid prekürsör proteini (APP), presenilin 1 (PSEN1) ve presenilin 2 (PSEN2) genlerindeki mutasyonlarla ilişkilidir ve toplam Alzheimer vakalarının % 0,5'inden

daha azını oluşturur. Bu iki form, başlangıç yaşına bağlı olarak hastalığın ilerleyişi ve klinik seyri açısından farklılık göstermektedir (17).

Başlangıç yaşı göz önünde bulundurularak erken başlangıçlı (atipik) ve geç başlangıçlı (tipik) olarak 2 farklı şekilde kategorize edilir. Geç başlangıçlı AH, genetik ve çevresel faktörlerin birbirleriyle etkileşimi sonucu ortaya çıkma eğilimindedir. Çeşitli duyarlılık genlerinin AH riskinde rol oynadığı bilinmektedir; bunlardan biri olan APOE geni, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ olmak üzere üç varyanta sahiptir ve sporadik AH için en önemli genetik risk faktörlerinden biri olarak kabul edilmektedir. $\epsilon 4$ alelini taşımayan bireylerle karşılaştırıldığında, $\epsilon 4$ heterozigotları için Alzheimer hastalığı riski yaklaşık 3 kat artarken, $\epsilon 4$ homozigotlarında bu risk yaklaşık 12 kata kadar çıkmaktadır (18). Binlerce örnek kullanılarak yapılan genom çapında ilişkilendirme çalışmaları, inflamatuvar, kolesterol metabolizması ve endosomal-vezikül geri dönüşüm yollarını içeren 20'den fazla genetik risk faktörü tanımlamıştır (19).

Özellikle, amiloid birikimine yanıt olarak mikrogial aktivasyonun AH patogenezinde kilit bir rol oynadığı artık kabul edilmektedir. Bu nispeten yaygın risk genlerinin her biri yalnızca çok küçük bir risk artışı sağlar, ancak poligenik bir risk skorunda birleştirildiklerinde vaka tahminini neredeyse iki katına çıkarabilir (20). Odaklanmış genetik yaklaşımlar ve yeni nesil dizileme kullanan çalışmalar, AH için nispeten yüksek risk oluşturan bir dizi başka düşük frekanslı geni de ortaya çıkarmıştır ve bunlar da patogeneze hakkında bilgi sağlamaktadır (Şekil 2.1).



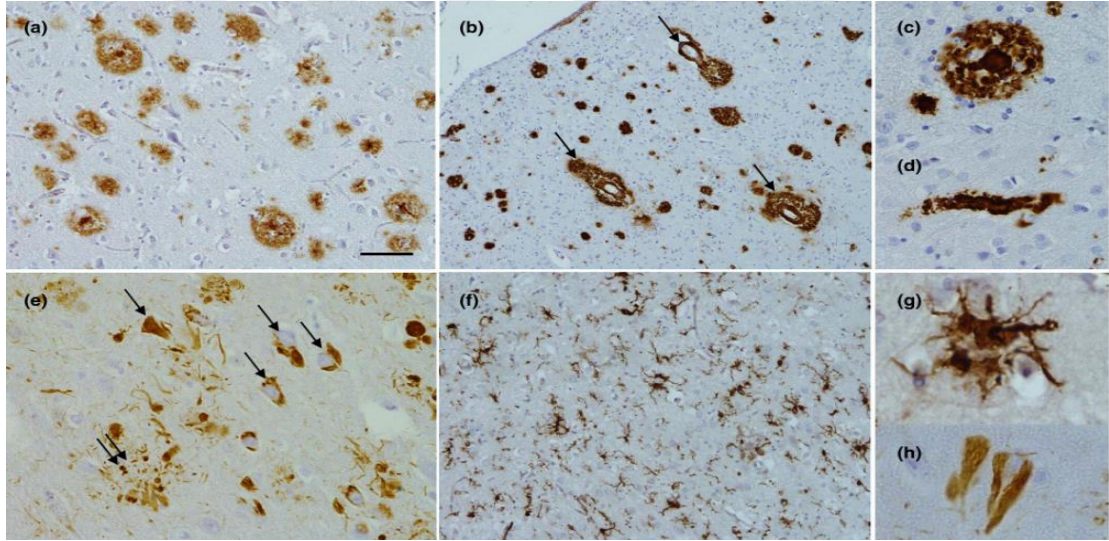
Şekil 2.1. Alzheimer hastalığı ile ilişkili genetik varyantlar

Toplumdaki allel frekansları ve hastalık riski düzeylerine göre sınıflandırılması. Nadir ve yüksek riskli varyantlar (örneğin APP, PSEN1, PSEN2) Mendel kalıtımıyla geçer ve hastalık gelişiminde doğrudan rol oynar. Orta frekanslı varyantlar (örn. APOE4) orta düzeyde risk taşıırken, yaygın varyantlar (örn. CLU, PICALM, BIN1) genellikle daha düşük risk katkısı sağlar. Renkler, bu genlerin dahil olduğu biyolojik süreçleri (APP metabolizması, bağışıklık yanıtı, endositoz vb.) temsil eder. Not: Karch & Goate, 2015'ten uyarlanarak Türkçeye çevrilmiştir (19).

Epidemiyolojik veriler, eğitim düzeyinin ve fiziksel egzersizin AH'na karşı koruyucu etki gösterebileceğini, buna karşın orta yaşta hipertansiyon ve diyabetin hastalık riskini artırabileceğini ortaya koymaktadır (21). Obezite, uzun süredir demans ve AH için bir risk faktörü olarak kabul edilse de, son yıllarda elde edilen bulgular bu ilişkinin daha karmaşık olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle, orta yaşta ve yaşlılık döneminde düşük vücut ağırlığının, uzun vadede demans riskinde artış ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (22). Vasküler risk faktörlerinin Alzheimer Hastalığını hangi mekanizmalarla etkileyebileceği, özellikle de az sayıda epidemiyolojik çalışmada patolojik tanı doğrulaması olduğu için, belirsizliğini korumaktadır. Vasküler risk faktörleri, üst üste binen serebrovasküler hasar ile klinik AH riskini artırabilir veya vasküler hasar doğrudan AH patolojisinin gelişimini etkileyebilir (23).

2.1.4. Patoloji

Alzheimer hastalığı beyindeki nöropatolojik değişiklikler hem olumlu hem de olumsuz özellikler içerir. Alzheimer patolojisinin temel özellikleri amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklardır (NFT'ler) (Şekil 2.2). Klasik pozitif lezyonlar bol miktarda amiloid plak ve nörofibriler yumaklar, nöropil iplikleri ve hiperfosforile tau içeren distrofik nöritlerden oluşur ve bunlara astrositoz, amiloid anjiyopati ve mikrogliyal hücre aktivasyonu eşlik eder. Nöronların, nöropillerin ve sinaptik elemanların karakteristik kayıpları AH'nin temel negatif özellikleridir (24). Bu patolojik süreçlerin ileri evre sonuçları, sinaptik ve nöronal kayıpların neden olduğu makroskopik atrofi ve nörodejenerasyonu içermektedir. Özellikle ileri yaş grubunda sık gözlenen karma patolojiler, sıklıkla vasküler hastalıklar ve Lewy cisimcikleriyle birlikte ortaya çıkmaktadır (25). Aslında, fAD vakalarında bile Lewy cisimciği patolojisi sıklıkla bir arada bulunur ve bunun mekanizması belirsizliğini korumaktadır (26). TDP-43 patolojisi giderek önemli bir eş patoloji olarak kabul edilmektedir (27).



Şekil 2.2. Alzheimer hastalığında görülen patolojik bulgular (23)

Frontal korteksten elde edilen doku kesitlerinde uygulanan A β immünohistokimyasal boyama, ekstrasellüler amiloid β plaklarını (a) ve A β 'nin damar duvarlarında birikimiyle karakterize edilen serebral amiloid anjiyopatiyi (b, oklarla gösterilmiştir) ortaya koymaktadır. Yüksek büyütmede, yoğun bir çekirdek yapısına sahip A β çekirdekli bir plak izlenmektedir (c). Gelişmiş CAA vakalarında, A β birikimi kapiller düzeyine kadar yayılım gösterebilmektedir (d). Tau proteini ile yapılan immünohistokimyasal işaretleme, nöron içi nörofibriler yumakların (e, oklar; h'de yüksek büyütmede) yanı sıra, nöritik plakların (e, çift ok) varlığını da göstermektedir. Alzheimer hastalığında sık karşılaşılan nöroenflamatuvar yanıt, artmış sayıda reaktif mikrogliya hücreleriyle kendini göstermektedir (f; g'de daha detaylı görünüm).

Amiloid plaklar, esas olarak amiloid prekürsör proteininin (APP) metabolizmasının iki yan ürünü olan 40 veya 42 amino asitli ($A\beta_{40}$ ve $A\beta_{42}$) anormal katlanmış $A\beta$ 'dan oluşan ekstraselüler birikimlerdir. $A\beta_{42}$, daha yüksek fibrilleşme hızı ve çözünmezliği nedeniyle plaklar içinde $A\beta_{40}$ 'tan daha bol miktarda bulunur. Amiloid birikimi genel olarak izokortekste gelişir ve daha sonra subkortikal yapıları etkiler. NFT'lerin aksine, amiloid plaklar allokorteks (entorhinal korteks ve hipokampal oluşum), bazal ganglionlar, beyin sapının ilgili çekirdekleri ve serebellumu daha sınırlı ölçüde etkiler (24).

Nörofibriler yumaklar öncelikle hiperfosforile tau'dan oluşan eşleştirilmiş sarmal filamentlerden oluşur. Öncelikle medial temporal lobun allokorteksinde (entorhinal korteks ve hipokampus) ortaya çıkar ve zamanla ilişkisel izokortekse yayılır. Ancak bu süreçte, birincil duysal, motor ve görsel kortikal alanlar büyük ölçüde korunur. Nöron ve sinaps kaybı, genellikle NFT oluşumu ile paralel ilerler. Bu nedenle, AH'nın klinik özellikleri ve şiddeti, NFT patolojisi ile daha güçlü bir korelasyon gösterirken (24), β -amiloid birikimi hastalığının semptomatik evresinin erken döneminde bir platoya ulaşmaktadır (28).

2.1.5. Patogenez

Amiloid hipotezine göre, amiloid prekürsör protein (APP) 'nin β - ve γ -sekretaz enzimleri tarafından sırayla bölünmesiyle üretilen $a\beta$ 'nin patolojik formlarının beyinde birikimi, Alzheimer hastalığının patogenezini belirleyen birincil faktör olarak kabul edilmektedir. AH'nın sürecinin $A\beta$ üretimi ile $A\beta$ klirensi arasındaki dengesizlikten kaynaklandığı öne sürülmektedir. NFT oluşumunun, nöronal işlev bozukluğu ve nörodejeneratif süreçlerle ilişkili olduğu; bu patolojik mekanizmalarda inflamatuvar yanıtın da aracılık edebileceği ileri sürülmektedir (29).

$A\beta$ 'nin Alzheimer hastalığındaki merkezi rolüne ilişkin en güçlü kanıtlar genetik çalışmalardan elde edilmektedir. Tüm ailesel Alzheimer hastalığı (fAD) ile ilişkili mutasyonlar, $A\beta$ 'nin üretimi veya işlenmesinde rol oynayarak β -amiloidin toksik formlarının aşırı birikimine yol açmaktadır. Buna karşın, APP geninde yer alan A673T mutasyonu APP'nin β -sekretaz tarafından işlenmesini azaltarak Alzheimer hastalığına karşı koruyucu bir etki gösterir (30).

Alzheimer hastalığında (AH) β -1-40 ve β -1-42 içeren β -amiloid fibrilleri açısından zengin ekstraselüler plaklar bulunur. Ancak, bu plaklar ile nöronal hücre

ölümü ve hafıza kaybı arasındaki doğrudan ilişki kesin olarak doğrulanmamıştır. Bununla birlikte, hastalığın şiddeti ile toplam A β içeriği arasında olası bir korelasyon olduğu öne sürülmektedir. Çeşitli deneysel bulgular, nörodejenerasyonun ana nedeni olarak çözünebilir A β oligomerlerinin rolünü desteklemektedir (31). AH beyinlerinden saflaştırılan ve in vitro nöronlara uygulanan oligomerler sinaps yapısını ve işlevini ciddi şekilde bozduğu sonucuna varılmıştır (32). İnsan oligomerleri ayrıca AH ile ilgili epitoplarda tau'nun hiperfosforilasyonunu indükler ve kültürlenmiş nöronlarda nöritik distrofiye neden olur (33). Bu nedenle plaklar, amiloid oligomerlerini depolayan bir rezervuar gibi davranabilir veya toksik A β türlerini bir araya getirerek belli bir eşik değere kadar koruyucu bir rol oynayabilir (34).

AH tanısında A β birikimi gerekli olmakla birlikte, birçok yoğun β -amiloid birikimine rağmen klinik semptomların görülmemesi, bunun tek başına demans için yeterli olmadığını göstermektedir. Bilişsel olarak sağlıklı kişilerde A β plakları ve yüksek oligomer düzeyleri birlikte bulunabilir. Bu durum, oligomer düzeylerinin doğrudan demansla ilişkili olmayabileceğini, ancak plak-oligomer etkileşiminin hastalık ilerleyişinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (35).

Tau, AH tanısı için gerekli olması ve nörodejenerasyon ile tau yükü arasındaki güçlü ilişki nedeniyle hastalığın temel bileşenlerinden biridir. Tau gen mutasyonları, β -amiloid genindekilerin aksine, tau birikimi ve frontotemporal demansa yol açsa da tek başına Alzheimer hastalığına neden olmaz (36).

A β ve tau patolojisinin beyin omurilik sıvısı (BOS) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) biyobelirteçlerinin ortaya çıkması, bu patolojilerin in vivo ilerleyişini ve aralarındaki etkileşimi araştıran çok sayıda çalışmaya yol açmıştır. Sağlıklı yaşlı bireyler, sporadik AH ve fAD hastalarında yapılan çalışmalar, amiloid patolojisinin klinik semptomlardan yıllar önce başladığını ve BOS tau ile tau PET değişikliklerinden önce ortaya çıktığını göstermektedir. Ayrıca, bu değişimlerin MRI bulgularından ve nihayetinde klinik semptomlardan önce gerçekleştiğine dair ek kanıtlar sunmaktadır (37, 38). AH için yeni kriterlere yol açan bu modeller, daha fazla veri elde edildikçe gelişmeye devam etmektedir. β -amiloidin AH 'de tau patolojisinin öncüsü olduğunu gösteren önemli veriler bulunmakla birlikte, bazı sağlıklı yaşlı bireyler β -amiloid olmaksızın tau patolojisine dair kanıtlar

göstermektedir. Bu durum, normal yaşlanma sürecinin bir parçası olabileceği gibi, AH dışı bir nörodejeneratif süreci de yansıtabilir (39).

AH proteinlerinin belirli beyin bölgelerini hedef alırken diğerlerini hedef almamasının mekanizmalarına ve beyinde nasıl yayıldıklarına büyük ilgi vardır. Anormal şekilde katlanmış A β ve tau'nun, prion hastalığında olduğu gibi, yapısal olarak normal peptidlerde konformasyonel değişikliğe neden olduğu gösterilmiştir. Bunlar bir nörondan diğerine trans-sinaptik olarak aktarılabilir (40).

AH patogenezinde amiloid ve tau patolojisinin mekanik olarak nasıl bağlantılı olduğu belirsizdir. Çeşitli kanıtlar, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin AH patogenezinde kritik bir rol oynadığını ve bu bağlantıyı sağlayabileceğini düşündürmektedir. Mikroglia aktivasyonu ve pro-inflamatuar faktörlerin salınımının nöronal hasara katkıda bulunduğu öne sürülmektedir. Postmortem analizler, amiloid plaklarla ilişkili reaktif mikroglia varlığını ortaya koymuştur (41). CLU, CR1, ABCA7, CD33 ve EPHA1 genleri, mikroglia aktivasyonu, kompleman sistemi düzenlenmesi, inflamasyon ve A β temizlenmesi ile nörodejenerasyonu hızlandırarak AH gelişimine katkıda bulunmaktadır (42). Mikroglia aktivasyonunun koruyucu mu yoksa zararlı mı olduğu henüz netlik kazanmamıştır. Araştırmalar, mikroglianın A β temizliğinde rol oynayabileceğini göstermektedir. Ancak hastalık ilerledikçe, kronik aktivasyon ve sürekli proinflamatuar medyatör salınımı, mikroglianın toksik bir fenotip kazanmasına ve bu koruyucu etkinin azalmasına yol açabilir (43).

2.2. Alzheimer Hastalığına Hücresel Yaklaşım

Hücre çalışmaları, AH'nin altında yatan moleküler ve hücresel mekanizmaları anlamada önemli bir rol oynar. AH'deki temel hücre tabanlı araştırma yaklaşımlarına bakıldığında nöronal hücre hatları birinci sırada yer alıyor. SH-SY5Y (insan nöroblastoma hücreleri) genellikle amiloid-beta (A β) toksisitesini, tau fosforilasyonunu ve oksidatif stresi incelemek için kullanılır. PC12 (sıçan feokromositoma hücreleri), nörotoksisite ve nöroproteksiyon mekanizmalarını incelemek için kullanılır. Birincil Nöronlar (fare/sıçan/insan), sinaptik işlev bozukluğu ve nörodejenerasyon hakkında daha fizyolojik olarak alakalı bilgiler sağlar. Glial Hücre Modelleri ikinci sırada yer alır. Mikroglia (BV2 hücreleri, birincil mikroglia), nöroinflamasyonu, A β temizliğini ve sitokin salınımını araştırmada yaygın olarak kullanılır. Astrositler (U373, birincil astrositler) ise A β

metabolizmasındaki, sinaptik destekteki ve inflamatuvar yanıtlardaki rollerinin ortaya konulmasında işlevseldir. İndüklenen Pluripotent Kök Hücreler (iPSC'ler), AH hastalarından türetilmiş veya AH ile ilişkili mutasyonları (örn. APP, PSEN1, PSEN2, APOE4) taşımak üzere CRISPR ile düzenlenmiştir. İnsanla ilgili bir bağlamda hastalık mekanizmalarını incelemek için nöronlara, astrositlere veya mikrogliyalara farklılaştırılmıştır. Organoidler ve 3 boyutlu (3D) hücre kültürleri beyin organoidleri, daha karmaşık bir doku benzeri ortamda A β plakları ve tau düğümleri dahil olmak üzere AH patolojisini taklit eder. AH'de incelenen temel hücresel yollar amiloid-beta (A β) patolojisi, A β üretimi ve temizlenmesidir. β ve γ -sekretaz inhibitörleri kullanılarak nöronlarda ve glial hücrelerde çalışılmıştır. A β oligomerleri, sinaptik toksisite ve mitokondriyal disfonksiyon açısından araştırılmıştır. Tau hiperfosforilasyonu ve agregasyonu, A β veya oksidatif strese maruz kalan nöronal modellerde çalışılmıştır. Tauopati hücre modelleri (örneğin, mutant tau'nun aşırı ekspresyonu) kullanılarak araştırılmıştır. Nöroinflamasyon, mikrogliya ve astrositler, sitokin salınımindaki (TNF- α , IL-6, IL-1 β) ve fagositik disfonksiyondaki rolleri açısından çalışılmıştır. NLRP3 inflamazom aktivasyonu önemli bir odak noktasıdır.

Mitokondriyal disfonksiyon, ROS üretimi ve ATP tükenmesini incelemek için kullanılan nöronal modeller ve hücre modellerinde test edilen antioksidan terapiler (örn. CoQ10, melatonin) ve sinaptik kaybı incelemek için kullanılan birincil nöronlar ve iPSC türevi nöronlar (örn. PSD-95, sinaptofizin seviyeleri) da yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.3. Hücre Modellerinde Terapötik Test

Alzheimer hastalığı (AH) için hücre modellerinde terapötik testler, potansiyel ilaç adaylarını değerlendirmede ve hastalık mekanizmalarını anlamada önemli bir rol oynar. Ölümsüzleştirilmiş hücre hatları (örn. SH-SY5Y, PC12) ve hasta kaynaklı indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSC'ler) dahil olmak üzere bu modeller, amiloid-beta (A β) birikimi, tau hiperfosforilasyonu ve nöroinflamasyon gibi temel patolojik özellikleri kopyalar. Araştırmacılar, hayvan veya klinik denemelere geçmeden önce bu sistemleri kontrollü bir ortamda ilaç etkinliğini, toksisiteyi ve etki mekanizmalarını değerlendirmek için kullanırlar. Hücre modellerinde yüksek verimli tarama, umut vadeden bileşiklerin hızlı bir şekilde tanımlanmasını sağlarken, genetik ve farmakolojik manipülasyonlar yeni terapötik

hedeflerin ortaya çıkarılmasına yardımcı olur. Hücre tabanlı testler, in vitro çalışmalar ile in vivo doğrulama arasındaki boşluğu kapatarak etkili AH tedavilerinin geliştirilmesini hızlandırır ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak veya durdurmak için umut sunar. Bunlardan bazıları; Anti-A β ilaçları (örn. BACE inhibitörleri, monoklonal antikorlar), Tau hedefli terapiler (örn. tau agregasyon inhibitörleri, kinaz inhibitörleri), anti-inflamatuar ajanlar (örn. NSAID'ler, TREM2 modülatörleri), nöroprotektif bileşikler (örn. BDNF, antioksidanlar). Bu çalışmaların zorlukları da mevcuttur. Tam hastalık karmaşıklığının olmaması hücre hatlarının sınırlamaları içerisinde yer alır. Bu nedenle ileri seviye insanla ilgili modellere ihtiyaç (iPSC türevi nöronlar, organoidler) vardır. Hücre çalışmalarında çoklu omiklerin (transkriptomik, proteomik) entegrasyonu verileri güçlendirebilir. Sonuç olarak hücre tabanlı çalışmalar, AH mekanizmalarını ortaya çıkarmak ve potansiyel tedavileri test etmek için önemlidir. iPSC teknolojisindeki, 3D kültürlerdeki ve gen düzenlemedeki gelişmeler, bu modellerin translasyonel alakalılığını geliştirmektedir.

AH için hücre modellerinde terapötik testler, hastalık mekanizmalarına ilişkin içgörüler sağlayan ve potansiyel ilaç adaylarını değerlendiren klinik öncesi araştırmalarda kritik bir adımdır. SH-SY5Y ve PC12 gibi ölümsüzleştirilmiş nöronal hücre hatları, oksidatif stres veya genetik modifikasyonlarla tedavi edildiğinde A β agregasyonu ve tau hiperfosforilasyonu dahil olmak üzere AH ile ilişkili patolojileri taklit etme kabiliyetleri nedeniyle yaygın olarak kullanılır (44). Alzheimer hastalarından elde edilen indüklenmiş pluripotent kök hücre (iPSC) türevi nöronlar gibi daha gelişmiş modeller, A β salgılanması, sinaptik disfonksiyon ve nöroinflamasyon gibi temel özellikleri özetleyen kişiselleştirilmiş bir yaklaşım sunar (45). Bu modeller, araştırmacıların toksik protein birikimini azaltan veya nöronal sağkalımı artıran bileşikleri belirlemesine olanak tanıyan yüksek verimli ilaç taramasına olanak tanır. Örneğin, iPSC türevi nöronlar kullanan çalışmalar, β -sekretaz (BACE) inhibitörlerinin A β üretimini azaltmadaki etkinliğini göstermiştir (46), hücre hatlarında CRISPR-Cas9 gen düzenlemesi ise mikrogliya aracılı nöroproteksiyonda TREM2 gibi yeni terapötik hedeflerin doğrulanmasına yardımcı olmuştur (47). Tam bir beyin mikro çevresinin olmaması gibi sınırlamalara rağmen, hücre tabanlı modeller erken aşama ilaç keşfi için vazgeçilmez olmaya devam etmekte ve in vitro çalışmalar ile klinik denemeler arasındaki boşluğu kapatmaktadır.

2.4. 3 Boyutlu (3D) Hücre Kültürü

Hücrelerin 3 boyutlu bir ortamda, doğal mikro çevrelerine daha yakın olarak büyütüldüğü ve geliştirildiği bir laboratuvar yöntemidir. Geleneksel 2 boyutlu (2D) yöntemlere nazaran hücreler burada serbestçe yayılabilir, farklılaşabilir ve etkileşime girebilir. Büyüme yüzeyi, hücre-hücre etkileşimi, morfolojik veya ilaç/tedavi yanıtları başlıklarında ele alınarak yapılan karşılaştırmada 3D hücre kültürleri ciddi farklılıklar göstererek öne çıkar (48). Özellikle AH gibi nörodejeneratif hastalıklarda nöronlar arası bağlantılar daha iyi modellenenebilir, amiloid beta ve tau proteini birikimi gibi patolojik süreçler daha gerçekçi izlenebilir (49). Ayrıca ilaçların difüzyonu, toksisitesi ve etkileri daha doğru değerlendirilir. SH-SY5Y hücre hattı, 3D kültürlerde farklılaştırılarak nöron benzeri özellikler kazanabilir, bu da Alzheimer modeli oluşturmada önemli avantaj sağlar (50).

3D hücre kültürü çalışmalarda birçok avantaja sahiptirler. Fizyolojik olarak daha ilgilidir; 3D kültürler, dokularda bulunan doğal hücre dışı matrisi (ECM) ve hücre-hücre etkileşimlerini daha iyi taklit ederek 2D kültürlerden daha doğru sonuçlar sağlar. İlaç Tepki Tahmininde İyileşme; 3D kültürlerdeki hücreler ilaçlara daha gerçekçi tepkiler gösterir ve bu da onları ilaç taraması ve toksisite testi için değerli kılar. Tümör Biyolojisinin Daha İyi Modellenmesi; 3D'de yetiştirilen kanser hücreleri, tümör mikro ortamlarını taklit eden küreler veya organoidler oluşturarak kanser araştırmalarını iyileştirir. Gelişmiş Hücre Farklılaşması ve İşlevi; Kök hücreler ve birincil hücreler, düz 2D kültürlerle göre 3D'de doğal morfolojilerini ve işlevselliklerini daha iyi korurlar. Azaltılmış Hayvan Testleri; 3D modeller, insanla ilgili veriler sağlayarak bazı hayvan testlerinin yerini alabilir. Tüm bu avantajlarla birlikte dezavantajları da bulunmaktadır. Daha Yüksek Maliyet ve Karmaşıklık; 3D kültür sistemleri (örneğin, iskeleler, hidrojeller, biyoreaktörler) geleneksel 2D kültürlerden daha pahalı ve teknik olarak daha zordur. Görüntüleme ve Analizde Zorluk; kalın 3D yapılar mikroskopi ve veri toplamayı tek katmanlı kültürlerle kıyasla daha zor hale getirir. Değişken Tekrarlanabilirlik; Oksijen gradyanları, besin difüzyonu ve hücre dağılımı gibi faktörler deneyler arasında tutarsızlıklara yol açabilir. Daha Uzun Kültür Süreleri; 3D modeller genellikle 2D kültürlerle kıyasla kurulması ve olgunlaşması için daha fazla zaman gerektirir. Sınırlı Yüksek Verimli Uyarlanabilirlik; İlerleme kaydedilmiş olsa da yüksek verimli tarama için 3D

kültürleri ölçeklendirmek zorlu olmaya devam etmektedir. Sonuç olarak 3D hücre kültürü, gerçek doku ortamlarını taklit etmede, ilaç keşfini iyileştirmede ve hayvan modellerine olan bağımlılığı azaltmada önemli avantajlar sunar. Ancak, daha geniş bir kabul için maliyet, karmaşıklık ve tekrarlanabilirlik gibi zorlukların ele alınması gerekir. Biyoyazdırma, mikro akışkanlık ve otomasyon alanındaki gelişmeler bu sınırlamaların üstesinden gelmesine yardımcı oluyor ve 3D kültürü biyomedikal araştırmalarda giderek daha önemli bir araç haline getiriyor.

Tüm bu kazanımlardan yola çıkarak çalışmamızda 3D hücre kültürünü kullanmamızın nedenleri şunlardır;

- SH-SY5Y hücrelerinin 3 boyutlu modelde kullanılması, hücrelerin doğal ortama benzer davranmasını sağlar.
- Achyrofuran gibi bir molekülün etkisi, 2 boyutlu modele göre daha fizyolojik olarak test edilebilir.
- circRNA ve miRNA etkileşimleri, in vivo'ya yakın bir bağlamda değerlendirilmiş olur.

Bu çalışmada SH-SY5Y hücre hattı, 3 boyutlu kültür modeli oluşturularak farklılaştırılmıştır. Hücreler, Matrigel tabanlı bir ortamda büyütülmüş ve Achyrofuran uygulanarak circRNA-miRNA sünger mekanizması üzerindeki etkiler araştırılmıştır.

2.5. Fitokimyasallar ve Alzheimer Hastalığı'ndaki Yeri

Fitokimyasallar (bitkilerden elde edilen biyoaktif bileşikler) antioksidan, anti-inflamatuar, anti-amiloidojenik ve nöroprotektif özellikleri nedeniyle AH yönetiminde umut vadetmektedir. Aşağıda bazı temel fitokimyasallar ve AH'deki potansiyel terapötik etkileri yer almaktadır:

1. Kurkumin (Zerdeçal, Curcuma longa): Beta-amiloid (A β) plaklarını azaltır ve agregasyonu engeller. Anti-inflamatuar niteliği ile NF- κ B ve COX-2'yi engeller. Oksidatif strese katkıda bulunan bakır ve demir gibi metalleri şelatlar. Beyin kaynaklı nörotrofik faktörü (BDNF) artırır. Bazı klinik çalışmalar bilişsel faydalar olduğunu öne sürse de biyoyararlanım bir zorluktur (lipozomal veya nanopartikül formülasyonları yardımcı olabilir).

2. Resveratrol (Üzüm, Çilek, Kırmızı Şarap): Nöronal hayatta kalmayı destekleyen sirtuinleri (SIRT1) aktive eder. A β birikimini ve tau fosforilasyonunu

azaltır. Antioksidan ve anti-inflamatuar etkiler. Bazı çalışmalar CSF A β seviyelerinin azaldığını göstermektedir, ancak yüksek dozlara ihtiyaç vardır.

3. Epigallocatechin Gallate (EGCG) (Yeşil Çay, *Camellia sinensis*): A β fibril oluşumunu engeller ve toksik olmayan oligomerleri destekler. α -sekretazı (ADAM10) modüle ederek nöroprotektif çözünür APP- α 'yı artırır. Nrf2 aktivasyonu yoluyla antioksidan nitelik gösterir. Hayvan ve hücre çalışmaları ümit vericidir ve insan denemeleri sınırlıdır.

4. Ginkgo Biloba Özütü: Beyin kan akışını iyileştirir. Oksidatif stresi ve A β toksisitesini azaltır. Nörotransmitter sistemlerini (asetilkolin, dopamin) düzenler. Klinik çalışmalarda karışık sonuçlar mevcuttur fakat erken evre AH'de yardımcı olabilir.

5. Quercetin (Soğan, Elma, Meyve): A β ve tau patolojisini azaltır. Güçlü antioksidan ve anti-inflamatuar etkiler. Otofajiyi aktive eder (hasarlı proteinleri temizler). Çoğunlukla klinik öncesi çalışmalar mevcuttur ve biyoyararlanım bir sınırlamadır.

6. Berberin (*Berberis vulgaris*, Goldenseal): Asetilkolinesterazı (AChE) inhibe eder (donepezile benzer). BACE1 inhibisyonu yoluyla A β üretimini azaltır. Anti-diyabetik etkiler (diyabet AH risk faktörü olduğundan önemlidir). Hayvan modellerinde umut vericidir ve insan çalışmaları gereklidir.

7. Huperzin A (Çin Kulüp Yosunu, *Huperzia serrata*): Güçlü AChE inhibitörü, asetilkolini artırır. Oksidatif hasara karşı nöroprotektiftir. Bazı klinik çalışmalar bilişsel iyileşme göstermektedir (Çin'de AH için kullanılır)

8. Sülföröfan (Brokoli, Turpgiller): Nrf2 yolunu aktive ederek antioksidan savunmaları güçlendirir. Nöroinflamasyonu ve A β toksisitesini azaltır. Klinik öncesi çalışmalar umut vericidir ve insan denemeleri devam etmektedir.

9. Withanolides (*Ashwagandha*, *Withania somnifera*): A β plak yükünü azaltır. Sinaptik plastisiteyi ve kolinerjik işlevi artırır. Stres önleyici etkilere (kortizölü düşürür) sahiptir. Hayvan çalışmaları nöroproteksiyonu destekler; insan verileri sınırlıdır.

10. Kannabidiöl (CBD) (Kenevir): CB2 reseptör modülasyonu yoluyla nöroinflamasyonu azaltır. Antioksidan ve anti-eksitotoksikite etkileri mevcuttur. Ortaya çıkan araştırmalar AH modellerinde potansiyel olduğunu göstermektedir.

Alternatif tedavi ajanları olmalarına rağmen biyoyararlanımları sorundur. Birçok fitokimyasalın emilimi zayıftır (örn. kurkumin, resveratrol). Nanoformülasyonlar veya adjuvanlar (piperin) yardımcı olabilir. Dozaj ve standardizasyonundaki zorluklar bitkisel özlerin gücünün değişmesinden kaynaklanır. İlaçlarla etkileşimlerinde bazıları (örneğin, Ginkgo, berberin) kan incelticiler veya AChE inhibitörleri ile etkileşime girebilir. Sonuç olarak fitokimyasallar, amiloid plakları, tau düğümleri, oksidatif stres ve inflamasyonu ele alan AH'ye yönelik çok hedefli bir yaklaşım sunar. Klinik öncesi veriler güçlü olsa da insanlarda etkinliği doğrulamak için daha fazla randomize kontrollü çalışmaya (RCT) ihtiyaç vardır. Fitokimyasalları geleneksel tedavilerle (örneğin, AChE inhibitörleri) birleştirmek sonuçları iyileştirebilir. Bu sorunları aşabilecek alternatif ajanlar çözüm sürecini kolaylaştırabilir.

2.6. *Achyrocline Satureioides*

Achyrocline satureioides (Lam.) DC (Asteraceae), halk arasında "marcela" veya "macela" olarak bilinse de, aynı bitkiye vira-vira, mira-bira, bira-bira, marcela del campo, macela-fema, marcela blanca, macela amarela, macela do campo, jate'i ka'a ve eloyatei-caá (guarani Kızılderili kabilesi) gibi birçok başka isim de verilmiştir (51). *A. satureioides*, Arjantin'den en yaygın tıbbi türlerden biridir; popüleritesi, esas olarak gastrointestinal ve solunum yolu hastalıkları olmak üzere çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Sapları, yaprakları ve çiçekleri reçineler, uçucu yağlar, tanenler ve diğer acı özler içerir. Tüm bunlara rağmen Marcela, hem ilaç hem de kozmetik ve acı içecek endüstrileri için faydalıdır (52). Geleneksel olarak *A. Satureioides*'in toprak üstü kısımları Arjantin, Uruguay, Brezilya ve Paraguay'da çeşitli hastalıkların tedavisinde kaynatma veya infüzyon olarak popüler bir şekilde kullanılmaktadır. Gastrointestinal bozukluklarda, antidiyabetik, sindirim, antibakteriyel, antispazmodik, antiinflamatuvar, antitümör ve antidiyareik olarak, asteniyi tedavi etmek, tonik ve uyarıcı olarak faydalı olduğu düşünülmektedir. Kurutulmuş çiçek salkımları ve gövdelerin karışımı yatıştırıcı, antiseptik, antispazmodik, iltihap için ve menstrual döngüyü desteklemek ve teşvik etmek için kullanılır. Yapraklarla hazırlanan infüzyon bronşitte öksürük kesici olarak ve yaprak ve çiçek karışımı sindirim, karminatif, antispazmodik, yatıştırıcı, antiastımlı, öksürük kesici ve hipoglisemik olarak uygulanır. Çiçeklerinden

hazırlanan infüzyon astım tedavisinde, ağrı kesici, spazm çözücü ve iltihap giderici olarak kullanılır. Harici bir reçete olarak yapraklar, kompreslerde ve yıkamalarda iltihap giderici olarak uygulanır (52). Bu tür yüksek konsantrasyonda polifenol ve flavonoid içerir. Kurutulmuş tüm bitkide achyrofuran, kuersetin, kafeik asit, klorojenik ve izoklorojenik asitler, galangin, 3-metoksi galangin, kuersetin-3-metileter, 2, 4', 4-trihidroksi-6-metoksikalkon ve 7, 4'-dihidroksi-5-metoksiflavon tespit edilmiştir. Kurutulmuş çiçek salkımında kuersetin, luteolin, 3O-metil kersetin ve 3,7-dimetoksi-5,8-dihidroksiflavon bulunmuştur (52). Çiçek salkımı monoterpenler (<% 7,3) ve seskiterpenler (% 73,8) içerir. Ana bileşenleri karyofililen (% 39,7), δ -kanadien (% 9,4) ve α -kopaen (% 14,2) dir. Buna karşılık Brezilya'da ana bileşenler monoterpenlerdir (>% 56,4) (53). *A.satureioides*'in sulu ve metanol özütlерinin antioksidan ve serbest radikal giderici aktiviteleri rapor edilmiştir (54, 55). Antioksidan aktivite in silico değerlendirme (PASS analizi) ile doğrulanmıştır (56). *A. satireioides*'in başlıca bileşiklerinin (luteolin, kuersetin, 3-O metilkuersetin ve akirobikalkon gibi flavonoidler) sıçan beyin homojenatlarını lipid hasarından koruma yeteneği rapor edilmiştir (57). Bu bileşiklerdeki içerik, türlere atfedilen hepatoprotektif, immün uyarıcı, sitotoksik, vazodilatör, antiherpetik, antispazmodik, gevşetici, antiülseratif, antimikrobiyal, antioksidan, yumuşakça öldürücü, antiviral, antiinflamatuvar ve mutajenik aktivitelerle ilişkilirdi. Cilt lipoperoksidasyonu üzerindeki etki, kulak arkası domuz derisinde *A. satireioides* özütü veya saf kuersetin ile yapılan topikal bir nanoemülsiyon kullanılarak test edildi. Nanoemülsiyon, toplam 100 μ g kuersetin miktarında etanolde (% 80) *A. satireioides* çiçek salkımları (7,5 w/v) ile hazırlandı. Ciltte tutulan kuersetin seviyesi, kuersetin içeren nanoemülsiyondan *A. satireioides* özütü içeren nanoemülsiyonda daha yüksekti. Ayrıca, tiyobarbiturik asit reaktif türler (TBA-RS) testi, özüt içeren nanoemülsiyonla daha iyi bir sonuç gösterdi. *A. satireioides* özütü içeren nanoemülsiyondan lipoperoksidasyonu önlemedeki daha yüksek etkinlik, özütteki bileşiklerin sinerjik etkisine atfedildi (58). Ciltte oksidatif stresi önlemek için *A. satireioides* özütü yüklü nanoemülsiyon (toplam flavonoid içeriği, 1 mg ml⁻¹) içeren bir antioksidan hidrojel formüle edildi (59).

2.6.1. Toksisite

Achyrocline satureioides (Lam.) DC (Marcela)' nin geniş yelpazede farmakolojik, tıbbi ve terapötik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Marcela ekstraktlarının çeşitli patolojik koşullara karşı koruyucu yeteneğini göstermiştir. Farelerde ve sıçanlarda intraperitoneal ve oral olarak uygulanan sulu marcela ekstraktlarında akut toksisitesi değerlendirilmiştir. Sıçanlarda 4 saat süreyle tekrarlanan uygulamalarda tolere edilebilir oral maksimum doz (1, 3 ila 5 g/kg) incelenmiştir. Ekstrakt intraperitoneal olarak uygulandığında düşük akut toksisitesi vardı ve oral uygulamada hiçbir toksisite yoktu. Marcela'nın sulu ekstraktlarının LD (50)'sinin, sıçanlara gastrik entübasyon yoluyla bir kez uygulandığında 5 g/kg' dan daha yüksek olduğu bulundu. Kilo alımı, toksisite belirtileri, enzimatik çalışmalar (transaminazlar ve fosfatazlar) ve çeşitli organların histolojik değerlendirmesi, ekstraktın akut toksisiteden yoksun olduğunu gösterdi. Bu akut çalışmalar, % 2' lik bir infüzyondan sonra elde edilen sulu bir Marcela ekstraktının güvenli olduğunu ve bu çalışmada araştırılan koşullar altında in vivo olarak herhangi bir zararlı etkiye neden olmadığını gösterdi. Hücresel boyutta sitotoksosite çalışmalarında ise sulu ve etanolik marcela ekstraktları kimyasal olarak karakterize edildi ve in vitro antioksidan kapasiteleri, antidiyabetik ve antiobezite aktivitelerinin yanı sıra hücresel sitotoksosite ve bağırsak hücre tek katmanları (TC7 hücreleri) üzerindeki alımları açısından değerlendirildi. Sulu ve etanollü geleneksel ekstraktlar, ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) analizlerinde sırasıyla temel olarak fenolik asitler veya flavonoidlerle karakterize edilen farklı polifenolik profiller sundu. TC7 hücre çalışmaları sitotoksosite göstermedi. Bu kanıtlar SSY5Y hücrelerinin diferansiye modelinde achyrofuranın güvenli kullanımına işaret etmektedir.

2.7. Apoptosis, Otofaji ve Mitofaji

Apoptoz ve otofaji, hücresel homeostazis için esasen gerekli olan içsel süreçlerdir. Onarılamaz DNA hasarı veya kritik oksidatif stres sıklıkla hasarlı hücrenin dokudan temizlenmesi için apoptozu tetikler (60). Apoptozun farklı morfolojisi, hücre iskeletinin çökmesi, sitoplazmik yoğunlaşma ve parçalanma, membran taşması, çekirdek piknozu, kromatin yoğunlaşması ve parçalanması ile daha sonra makrofajlar ve komşu hücreler tarafından fagositozlanan membranla kaplı

apoptotik cisimciklerin oluşumunu içerir. Apoptozis nöral ve beyin sağlığının sürdürülmesinde hayati rol oynar. Otofaji de hasarlı organelleri ve yaşlanan sitozolik proteinleri sistematik olarak ortadan kaldırarak beyin ve sinir sisteminin sağlığını da destekler (61). Otofaji, çift membranın oluşumunu ve uzamasını, vezikül olgunlaşmasını ve ardından hedeflenen materyalin lizozom tarafından uzaklaştırılmasını içeren bir dizi olayla ilerler. Özelleşmiş post-mitotik hücreler olan nöronlar, daha büyük biyoenerjetik ihtiyaçlarını uygun bir şekilde karşılamak için doğası gereği yüksek mitokondri çıkışına güvenirlir; burada mitofaji gibi mitokondriyal kalite kontrol mekanizmalarının rolü, nöronal sağlık ve fonksiyonun sürdürülmesinde kritik öneme sahiptir. Bu alanda yapılan son araştırmalar AH'de apoptoz, otofaji ve mitofaji gibi moleküler süreçlerin bozulduğunu göstermektedir (62). Ayrıca, yaşlanan hastalardaki fizyolojik fonksiyonların azalmasının, sıklıkla apoptoz, otofaji ve mitofaji ile karıştığı görülen metabolik yolların değişen fonksiyonunun bir sonucu olduğu ileri sürülmüştür (63). Arızalı mitokondriyal fonksiyon sıklıkla AH gibi nörodejeneratif hastalıklarda görülür. Bozulmuş ve arızalı mitokondri birikiminin öncelikle Alzheimer ilerlemesinin erken bir belirtisi olduğuna inanılmaktadır. Doğal olarak evrimleşmiş seçici bir mitokondriyal otofaji olan mitofaji, kusurlu mitokondriyi ortadan kaldırarak sinir sağlığını ve işlevini sürdüren kritik bir mitokondriyal kalite kontrol sürecidir. Mitofaji ile ilişkili çeşitli proteinler AH'de değişen bir ifade sergiler ve temel terapötik hedefler olarak kabul edilir. Bu nedenle, bu proteinleri hedef alan ve mitofaji yeteneklerini geri kazandıran terapötik rejimler, AH'ye karşı yeni girişimsel stratejiler olabilir. Mitofajinin aksine, AH'deki nöronal hücre ölümü mekanizmaları önemli terapötik ilgi alanına sahiptir. Düzenlenmiş hücre ölümü, normal gelişimi ve doku homeostazisini dengelemek için hem genomik hem de proteomik bileşenleri içeren, iyi planlanmış bir programdır.

Düzenlenmiş hücre ölümünün anormal aktivasyonu, apoptoz, nekroptoz, ferroptoz, piroptoz ve otofajiye bağlı hücre ölümü dahil olmak üzere birçok mekanizma yoluyla hücre ölümüyle sonuçlanır. Patolojik işaretler olarak AH tanısı öncelikle iki anahtar protein işaretleyicisinin, A β peptidlerinin ve atipik olarak fosforile edilmiş tau proteininin birikmesini kontrol eder. Bunun patolojik bir sonucu, beta-amiloid plakları ve nörofibriler yumakları (NFT'ler) içeren protein agregatlarının oluşmasıdır. Alzheimer hastalarının beyinlerinin otopsisinde, kortikal

hacim daralması, girusların azalması (% 50'ye kadar) ve sulkus boyutlarının artmasıyla kanıtlandığı üzere çok büyük nöron ölümü sergilendiği dikkate değerdir. Bununla birlikte, Alzheimer hastalarında nöronal hücre ölümünü tetikleyen farklı mekanizmalar, ölen nöronların sınırlı mevcudiyeti nedeniyle anlaşılması zor olmaya devam ediyor. Dolayısıyla birbiri etkileşimde olan apoptoz, otofaji ve mitofajinin AH'deki süreçleri genel olarak değerlendirildiğinde aşağıda sırayla verilen ilişkileri dikkat çekmektedir (64-66).

- Sinaptik defekt sonucu gelişen tautopati de aksondan dendrite bir kinesin akışı dendritten aksona doğru ise bir dynein akışı gelişir.
- Bunun sonucu olarak aksonlardaki mitokondriyal disfonksiyona bağlı olarak mitofaji meydana gelir.
- Bu olay sonrası apoptoz tetiklenir. Bu ve önceki mekanizma nöronlardaki bozulan mitofajiye işaret eder.
- Mitofaji sonrası hücresel otofaji sistemi devreye girer.
- A β ve NFT'lerin birikimi piroptozun dahil olduğu nöroinflamasyonu başlatır.

AH patolojisindeki temel sorumluların (A β ve NFT) hedeflenmesinde epigenetik mekanizmalardaki anahtar moleküller circRNA ve miRNA'lardır.

2.8. Dairesel RNA'lar (circRNA) ve mikroRNA'lar (miRNA)

Dairesel RNA'lar (circRNA'lar), esas olarak kodlamayan RNA'ların yeni bir sınıfını oluşturur. circRNA'lar, ne polariteye ne de poli(A) kuyruklara sahip olmayan kovalent olarak kapalı döngü yapıları ile karakterize edilen endojen tek iplikçikli RNA'lardır. Bunlar en yaygın olarak protein kodlayan ekzonların geri eklenmesinden üretilirler. Doğal olarak oluşan circRNA'lar, "geri birleştirme" (backsplicing) (67) veya "baştan kuyruğa birleştirme" (head-to-tail-splicing) (68) olarak adlandırılan alternatif bir birleştirme mekanizmasıyla ortaya çıkar. CircRNA'lar dokuya özgü bir dağılıma sahiptir ve evrimsel olarak korunur ve birçok circRNA, protein fonksiyonlarını ve kendi translasyonunu düzenlemek için mikroRNA'lar ve proteinlerle birleşerek önemli biyolojik işlevler oynar (69).

mikroRNA'lar (miRNA) küçük, tek zincir, kodlamayan, 21-23 nükleotid (nt) uzunluğunda bir RNA sınıfıdır. mRNA moleküllerini hedefleyerek gen ifadesinin düzenlenmesine katkıda bulunurlar. Bu görevlerini 3 şekilde yerine getirirler: 1- mRNA zincirinin ikiye ayrılması, 2- Poli(A) kuyruğunu kısaltarak mRNA'nın

dengeleştirilmesi veya 3'-mRNA'nın proteinlere çevrilmesinin azaltılması. mRNA zincirinin 3'-UTR'lerini spesifik olarak hedeflemesi halinde transkripsiyonel baskılamayı sağlayabilir ya da baskılamaya aracılık edebilir. Bu işlevi hedef mRNA ile spesifik olarak eşleşmesine bağlıdır. miRNA'lar tek bir hedef yönelik olabilecekleri gibi birden fazla hedefe yönelik olabilir. Aynı anda bir hedefi birden fazla miRNA'a da hedefleyebilir. Bu durumda bir yarışma söz konusudur. Daha yakın zamanlarda, circRNA'lar dahil olmak üzere diğer moleküller miRNA'lara bağlanabildiğinden ve dolayısıyla karşılık gelen miRNA hedef genlerinin artan ekspresyonuna yol açan süngerler veya tuzaklar olarak işlev görebildiğinden, ek bir gen düzenleme katmanı keşfedilmiştir (70). CircRNA'lar, transkripsiyonu, mRNA dönüşümünü ve RNA bağlayıcı proteinleri ve mikroRNA'ları süngerleyerek translasyonu etkileyerek gen ekspresyonunu düzenleyebilir. CircRNA'nın miRNA aktivitesi üzerindeki geniş etkisi göz önüne alındığında, circRNA tarafından miRNA süngerlenmesinin gen regülasyonu üzerindeki etkisinin anlaşılması oldukça önemlidir (71). Hatta terapi hedefleri olarak oldukça çok çalışılan miRNA'ların doğal kaynaklı fitokimyasallar ile hedeflenmesi doğrudan bu süngerin miRNA aracılı kontrolünün sağlanarak gen ekspresyonlarına müdahale edilebileceği anlamına gelmektedir. Bu kontrol yapay circRNA-miRNA süngerleri ile veya eksozom aracılı transferleri ile de sağlanabilirken bu çalışmada doğal olmaları, yan etkilerinin düşük olması ve sitotoksitelerinin az olması nedeniyle bir fitokimyasalla sağlanmaktadır.

2.9. Fitokimyasallar ve Terapi Uygulamaları

Geçtiğimiz on yılda, fitokimyasalların çeşitli kronik hastalıklarda uzun kodlamayan RNA'ların (lncRNA'lar) ve miRNA'ların ekspresyonunu düzenlediği rapor edildi ve son zamanlarda çoğu çalışma, fitokimyasalların circRNA'lar üzerindeki düzenleyici rollerine odaklandı. Kanser, kalp yetmezliği, depresyon ve ateroskleroz gibi kronik hastalıklarda circRNA'ların anormal ekspresyonu tespit edilmiştir ve çok sayıda çalışma, circRNA'ların berberin, celastrol, sinnamaldehit, kurkumin ve diğerleri dahil olmak üzere fitokimyasallar tarafından modülasyonunu ortaya çıkarmıştır. Örneğin; circSATB2 (72) ve circFOXM1 (73) gibi circRNA'ların ekspresyonu fitokimyasallar tarafından modüle edilmektedir ve bu düzenlemeler ayrıca hücre çoğalmasını, apoptozu, göçü, istilayı, otofajiyi, kemosenzitiviteyi,

radjosensitiviteyi ve diğer biyolojik süreçleri etkilemektedir. Mekanizma olarak, circRNA'lar esas olarak miRNA süngerleri olarak işlev görür ve daha sonra hedef genlerin ve ilgili hücre sinyal yollarının miRNA aracılı düzenlemesini etkiler. Mirna'larla birlikte circRNA'lar, kanserde önemli rol oynayan çoklu transkripsiyon faktörlerinin (TF'ler) ekspresyon modellerini değiştirir. Dolayısıyla circRNA-miRNA-TF eksenini, çeşitli kanser türlerinin ilerlemesinde veya baskılanmasında rol oynar ve hücre çoğalması, istilas ve metastazında rol oynar. Fitokimyasallar, çeşitli molekülleri ve sinyal yollarını düzenlediği tespit edilen çeşitli geleneksel bitkilerden, sebzelerden ve meyvelerden elde edilir ve kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve nörolojik hastalıkların tedavisinde uygulanabilir (74). Bu moleküllerin nöronal hücrelerde tezahürüne bakıldığında ilginç bir şekilde proliferatif olmayan bu hücrelerde circRNA'ların birikimi ve proliferatif hücrelerde circRNA'ların aşağı regülasyonu da rapor edilmiştir. Çoğalma sırasında dairesel ve doğrusal RNA'lar yavru hücrelere eşit şekilde dağıtılır. Doğrusal transkriptlerin kararlı durum seviyeleri, esas olarak aktif transkripsiyon ve bozulma nedeniyle düzenlenir, ayrıca circRNA'ların yeni bir ekspresyonuna ve dairesel ile doğrusal RNA'ların sabit oranlarına neden olur (75). Çoğalmayan hücrelerde, doğrusal transkriptler sabit bir transkripsiyon ve bozulma hızındayken circRNA'lar stabil kalır ve birikir. CircRNA bolluğu ile proliferasyon arasında gözlemlenen bu negatif korelasyon, bazı circRNA'ların proliferasyon belirteçleri olarak konumlandırılmasında kullanılabilir (76). circRNA'nın birçok miRNA bağlanma bölgesi olduğundan, circRNA'ları hedeflemek ve inhibe etmek, tek bir miRNA/geni hedeflemek veya inhibe etmekten daha potansiyel ve daha faydalı bir terapötik yaklaşım olarak hizmet edebilir. Fitokimyasallar içerisinde yer alan ve *Achyrocline satureioides*'in ihtiva ettiği polifenol Achyrofuran'ın circRNA ve miRNA aracılı AH tedavisindeki rolü araştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için 29.05.2024 tarih ve 173 karar no ile Gaziantep Üniversitesi Müdahalesiz Araştırmalar Etik Kurul onayı alınmıştır.

3.1. Materyaller

3.1.1. Stok Solüsyonlar

10 μ M All Trans Retinoic Acid (RA) (5 mM stok); 50 mg RA 33,3 ml % 95 EtOH'de yeniden süspanse edildi. RA ısıya, ışığa ve havaya duyarlıdır. Koyu bir şişede saklandı (6 haftaya kadar 4 °C'de saklanabilir). 1:500 seyreltmede kullanıldı ve kullanımdan hemen önce farklılaştırma ortamında seyreltilti.

1X B-27 (B-27 Supplement) (50X stok); 10 ml şişe çözündürüldü ve kalanı tek kullanımlık 1 ml'lik parçalara bölündü ve -80 °C'de saklandı.

20 mM KCL (1M stok); 18,6 g KCl'ye 250 ml su eklendi ve steril filtreden geçirildi. Oda sıcaklığında saklandı.

2 mM db-cAMP (1M stok); 1 g db-cAMP'ye (dibütil siklik adenosin monofosfat) 2,04 ml su eklenerek dolu şişe yeniden süspanse edildi. Işığa ve neme duyarlıdır. 100 μ l'lik alikotlarda -80 °C'de saklandı.

50 ng/ml BDNF; Tozu dibe indirmek için şişe santrifüjlendi. 10 μ g şişe 1 ml Neurobasal + 1x B27'de tekrar süspanse edildi ve 10 μ g/ml elde edildi. 1:200 seyreltmede kullanıldı. 250 μ l çalışma alikotları olarak -80 °C'de saklandı.

hiFBS; Çözölmüş FBS (Fetal Bovine Serum-fetal sığır serumu) 50 ml konik tüplere bölündü. 30 dakika boyunca su banyosunda 37 °C'de ısıtıldı. Çalışma alikotları şeklinde bölündü ve -20 °C'de donduruldu.

3.2. Kültür Medyumlarının (Besi Ortamlarının) Hazırlanması

Temel Büyüme Medyumu

Hücrelerin büyümesi ve çoğalması için kullanılır. Farklılaşma protokolü başlamadan önce SH-SY5Y hücreleri bu ortamda üretilir. İçeriği; 415 EMEM(Eagle'ın Minimum Esansiyel (Temel) Besi Ortamı): Minimum gerekli besinleri içeren temel ortam, 75 ml hiFBS (% 15): Hücrelerin büyümesini destekleyen serum. % 15 oranında zenginleştirilmiş, 5 ml Penisilin/Streptomisin (1:100): Antibiyotik; kontaminasyonu önler, 5 ml Glutamin (2 mM) (1:100): Hücreler için gerekli amino asittir, enerji kaynağı olarak da görev yapar.

415 ml EMEM + 75 ml hiFBS (% 15) + 5 ml Penisilin/Streptomisin (1x Pen/Strep) (1:100 dilüsyon) + 5 ml Glutamine (2 mM) (1:100 dilüsyon). 6 hafta süreyle muhafaza edilebilir.

Farklılaşma Medyumu 1

Hücrelerin RA ile nöronal farklılaşmasının ilk aşamasında kullanılır.

48 ml EMEM + 1,3 ml hiFBS (% 2,5) + 500 µl Pen/Strep (1x Pen/Strep) (1:100 dilüsyon) + 500 µl Glutamin (2 mM) (1:100 dilüsyon) + 10 µM RA (5 mM stok) (1:500 dilüsyon). 2 hafta saklanabilir ve RA kullanmadan hemen önce eklendi.

Farklılaşma Medyumu 2

Farklılaşmanın ikinci aşamasında, % 1 serum ile proliferasyon sınırlandırılarak nöronal farklılaşma desteklenmiştir.

49 ml EMEM + 500 µl hiFBS (% 1) + 500 µl Pen/Strep (1x Pen/Strep) (1:100 dilüsyon) + 500 µl Glutamin (2 mM) (1:100 dilüsyon) + 10 µM RA (5 mM stok) (1:500 dilüsyon). 2 hafta saklanabilir ve RA kullanmadan hemen önce eklendi.

Farklılaşma Medyumu 3

Bu ortam, olgun nöronlara daha uygun olan Neurobasal bazlı yapısıyla, SH-SY5Y hücrelerinin ileri düzey nöronal farklılaşması için hazırlanmıştır. İçeriği; 47 ml Neurobasal: Nöron kültürüne özel düşük glikozlu ortam, 1 ml B-27 (1:50): Nöronların hayatta kalmasını ve sinaptik bağlantı kurmasını destekler, 1 ml KCl (1:50): Potasyum iyonu ile membran potansiyelini düzenler, 500 µl Glutamax-I (L-glutaminin stabilize hali): Glutamine benzer, 250 µl BDNF (50 ng/ml, 1:200 dilüsyon): Nöron büyümesi ve olgunlaşması için temel büyüme faktörü, 100 µl db-cAMP (1:500): Nöron morfolojisi ve farklılaşmayı destekleyen ikinci haberci, 100 µl RA (1:500): Nöronal farklılaşmayı tamamlar.

50 ml stok solüsyon; 47 ml Neurobasal + 1 ml B-27 (1x) (50X stok) (1:50 dilüsyon) + 1 ml KCl (20 mM) (1M stok) (1:50 dilüsyon) + 500 µl Pen/Strep (1x Pen/Strep) (1:100 dilüsyon) + 500 µl GlutamaxI (2 mM) (100X stok) (1:100 dilüsyon) + 250 µl 50 ng/ml BDNF (Beyin Türevli Nörotrofik Faktör) stok (10 µg/ml) /1:200 dilüsyon) + 100 µl 2 mM db-cAMP (1M stok) (1:500 dilüsyon) + 100 µl 10 µM RA (5 mM stok). 2 hafta saklanabilir ve RA kullanmadan hemen önce eklendi.

3.3. Hücre Kültürü ve Farklılaştırma

3.3.1. Hücre Hattı: SH-SY5Y

Bu tezde insan nöroblastoma hücre dizisi SH-SY5Y kullanılacaktır. Farklılaşmamış formundaki bu hücre çizgisi, doğru bir nörit yapısı sergilediği ve olgunlaşmamış nöronal belirteçleri eksprese ettiği için olgunlaşmamış katekolaminerjik nöronlara benzer. Mikrotübül ile ilişkili protein (MAP) TAU esas olarak sağlıklı beyin nöronlarının aksonlarına ayrılır. TAU'nun somatodendritik olarak yanlış ayrılması, Alzheimer hastalığı dahil olmak üzere birçok nörodejeneratif hastalığın patolojik bir özelliğidir. İnsan nöroblastoma hücre dizisi SH-SY5Y, AH ve ilgili tauopatilerde TAU fizyolojisi ve TAU ile ilişkili patolojiyi incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. AH patolojisini ve achyofuran tedavisini gösterebilmek için SH-SY5Y hücreleri, çeşitli maddeler kullanılarak nöron benzeri hücrelere (SH-SY5Y'den türetilen nöronlar) farklılaştırılacaktır.

3.3.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Primer Kültürü ve Alt Kültür Yapılması

Alt kültürleme (pasajlama), hücrelerin sağlıklı şekilde büyümesini, sürdürebilmesi ve deneysel uygulamalarda kullanılabilecek yeterli hücre sayısının elde edilmesi amacıyla gerçekleştirilen bir işlemdir.

Dondurulmuş hücreler kuru buz paketinden çıkarıldı ve kullanıma hazır olana kadar hemen -130°C 'de sıvı azot buharına yerleştirildi. Maksimum canlılığı sağlamak için şişe çözüldü (37°C 'lik su banyosunda hafifçe çalkalanarak) ve kültür mümkün olan en kısa sürede başlatıldı. Kontaminasyon olasılığını azaltmak için kapak sudan uzak tutuldu. Çözülmenin hızlı olması sağlandı (yaklaşık 2 dakika). İçerikler çözülür çözülmez, şişe su banyosundan çıkarıldı ve % 70'lik etanol püskürtülerek dekontamine edildi. Şişenin içeriği 9 mL tam kültür ortamı içeren bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve yaklaşık $125 \times \text{g}$ 'de 7 dakika santrifüj edildi. Hücre pelleti tam kültür ortamıyla yeniden süspanse edildi ve 25 cm^2 'lik bir kültür şişesine döküldü. Kültür, 37°C , % 5 CO_2 ve % 95 nemde bir inkübatörde inkübe edildi. Alt kültür % 80 birleşme oranına ulaşıldığında gerçekleştirildi. Bu hücre grubu pasaj 1 (P1) olarak kaydedildi.

3.3.3. Alt Kültür (P1)

Alt kültür için 25 cm^2 'lik flasklar kullanıldı. Primer kültür ortamı çıkarıldı ve atıldı. Flaska 2 mL % 0,25 Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve hücreler hücre

tabakası dağılana kadar (yaklaşık 10 dakika) ters mikroskop altında incelendi. 5 mL tam büyüme ortamı eklendi ve hücreler nazikçe pipetlenerek aspire edildi. Hücre süspansiyonunun uygun alikotları yeni kültür kaplarına eklendi. Alt kültürleme 1:3 oranında gerçekleştirildi. Kùltürler 37°C'de inkübe edildi. Ortam haftada 3 kez (2 günlük aralıklarla) değıştirildi. Hücreler % 80 konfluense ulaştığında tekrar tripsinie edilerek toplandı ve PBS (Fosfat Tamponlu Salin) ile yıkanarak farklılaştırma işlemine başlandı.

3.3.4. SH-SY5Y Kùltürünün Pasajlanması

Hücreler % 70-80 birleşme oranına ulaştığında ve 10 ila 15 geçiş aşmadığında alt kùltürlere bölündü. Bir T-75 flasktan hücreleri geçirmek için, ortam aspire edildi, ardından yaklaşık 10 ml 1x PBS ile durulandı. Geçiş sırasında SH-SY5Y kùltürleri 1:5'ten daha fazla bölünmemesi önemlidir çünkü bu, hücrelerin düşük birleşme oranı nedeniyle ölmesine neden olabilir. PBS aspire edildi ve ardından 2,5 ml % 0,05 Tripsin-EDTA (1x) eklendi. İnkübatörde 2-3 dakika inkübe edildi ve hücreleri flaskın yüzeyinden ayırmak için hafifçe eğildi. 5 ml temel büyüme ortamı eklendi ve 1-2 kez pipetaj yapıldı. 1.000 x g'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi, ortam aspire edildi, ardından pelet 5 ml temel büyüme ortamında yeniden süspanse edildi. T-75 flaskta normal plakalama için hücreler 20 ml'lik toplam hacimde 1:3'ten 1:5'e seyreltildi ve farklılaşma için sayılarak ve plakalandı.

3.3.4. SH-SY5Y Hücrelerinin Dondurulması

SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin erken pasajları % 5 (v/v) DMSO (Dimetil Sülfoksit) ile desteklenmiş temel büyüme ortamında donduruldu. Başlangıçta, alikotlar 24 saat boyunca -80 °C'de donduruldu, ardından uzun süreli saklama için sıvı nitrojene aktarıldı.

3.3.5. Farklılaşma Protokolü

Farklılaşmamış SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Çözülmesi ve Kùltürlenmesi

1. Temel Büyüme Ortamını Hazırlandı.
2. Dondurulmuş hücreler 37 °C'lik bir su banyosunda hızla çözüldü (yaklaşık 2 dakika).
3. Hücreleri 15 ml'lik konik bir tüpte 9 ml temel büyüme ortamında yeniden süspanse edildi ve ardından 1.000 x g'de 2 dakika santrifüjlendi.

4. Pelletlenmiş hücrelere müdahale etmeden üstteki sıvı aspire edildi ve hücreler 10 ml temel büyüme ortamında yavaşça yeniden süspanse edildi.

5. Hücreler bir T-25 flaska tekrar ekildi.

6. Ertesi gün, ölü hücreleri çıkarmak için ortam değiştirildi.

Farklılaşma programı **Şekil 3.1.** 'de gösterilmiştir (77)



Şekil 3.1. Farklılaşma evrelerinin zaman tablosu.

Farklılaşma süreci 18 günlük bir süre boyunca yayılan 11 adımdan oluşur. Farklılaşma protokolünün ilk gününde (0. gün), 25.000 ila 100.000 hücre kaplanmamış 35 mm²'lik petri kabına yerleştirildi. 1, 3 ve 5. günlerde eski ortam çıkarıldı ve Farklılaşma Ortamı 1 uygulandı. 7. günde, hücreler 1:1 oranında kaplanmamış 35 mm²'lik petri kaplarına Farklılaşma Ortamı 1'de bölündü. 8. günde, ortam Farklılaşma Ortamı 2'ye değiştirildi ve 10. günde, hücreler yine 1:1 oranında bölündü, ancak bu kez Farklılaşma Ortamı 2'deki ECM kaplı 35 mm²'lik petri kaplarına yerleştirildi. 11, 14 ve 17. günlerde, eski ortam çıkarılır ve Farklılaşma Ortamı 3 uygulandı. 18. günde, farklılaşmış nöronlar aşağı akış uygulamaları için kullanıma hazırıdır.

Hücrelerin Farklılaşma İçin Ekilmesi (0. Gün)

1. Farklılaşmamış hücreler 1x PBS ile yıkandı, aspire edildi ve ardından 1-2 ml ısıtılmış 1x % 0,05 Trypsin-EDTA kullanarak tripsinlendi.

2. Hücreler tripsindeyken, bir inkübatörde yaklaşık 3 dakika inkübe edildi.

3. 10 ml temel büyüme ortamı eklenerek tripsini uzaklaştırıldı, kabın kenarları yıkandı ve içeriği 15 ml konik bir tüpe aktarıldı.

4. 1.000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi ve yapışan hücrelere dikkat edilerek ortam aspire edildi.

5. Pelet 5 ml temel büyüme ortamında tekrar süspanse edildi.

6. Eve Cell Counter kullanılarak hücreler sayıldı, ardından temel büyüme ortamı kullanarak 50.000 hücre/ml'ye seyreltili.

8. Her 35 mm²'lik petri kabına 2 ml hücre yerleştirildi, böylece her petriye toplam 100.000 hücre düşmesi sağlandı ve tekrar inkübatöre yerleştirildi.

Medyum Değişimi (1. Gün) (Farklılaşma Medyumu 1)

1. 50 ml Farklılaşma Ortamı 1ml alikotlandı ve 37 °C'lik bir su banyosunda inkübe edildi.

2. Ortam ısıtıldığında, kullanmadan önce uygun bir pH dengesi oluşturmak için en az bir saat boyunca bir inkübatörde (37 °C, % 5 CO₂) dengeye gelmesi beklendi.

3. Ortam kaplara eklenmeden hemen önce ısıtıldı ve dengelenmiş ortama Retinoik Asit (RA) (10 µM) eklendi (Retinoik asit ışığa duyarlıdır ve 4 °C'de koyu renkli şişelerde saklanmalıdır).

4. Eski ortam nazıkçe aspire edildi ve atıldı.

5. 35 mm²'lik kap başına RA içeren 2 ml Farklılaşma Ortamı 1 eklendi ve inkübatöre yerleştirildi.

Medyum Değişimi (3. Gün) (Farklılaşma Medyumu 1)

1.Gün uygulanan işlemler tekrarlandı.

Medyum Değişimi (5. Gün) (Farklılaşma Medyumu 1)

1.Gün uygulanan işlemler tekrarlandı.

Hücreler 1:1 Oranında Bölündü (7. Gün) (Farklılaşma Medyumu 1)

1. Ortam petrilere eklenmeden hemen önce ısıtılmış ve dengelenmiş Farklılaşma Ortamı 1'e RA eklendi.

2. Eski ortam nazıkçe aspire edildi ve atıldı.

3. 35 mm²'lik petri başına 200 µl ısıtılmış % 0,05 1x Trypsin EDTA eklendi ve hücreler mikroskop altında gözlemlendiğinde petriden gözle görülür şekilde kalkana kadar inkübatörde tutuldu.

4. 35 mm²'lik kap başına 2 ml RA içeren Farklılaşma Ortamı 1 eklendi ve tripsin uzaklaştırılması için ortam kullanılarak kalan nöronal hücreler yıkanarak petriden uzaklaştırıldı.

5. Daha sonra içerik 50 ml'lik konik bir tüpe aktarıldı.

6. 2 ml hücre süspansiyonu yeni 35 mm² petri kaplarına bölündü ve inkübe edildi.

Medyum Değişimi (8. Gün) (Farklılaşma Medyumu 2)

1. Ortamı petrilere eklemeden hemen önce ısıtılmış ve dengelenmiş ortama RA eklendi.

2. Eski ortam nazıkçe aspire edildi ve atıldı.

3. Yavaşça 35 mm²'lik petri başına RA içeren 2 mL Farklılaşma Ortamı 2 eklendi ve inkübatöre konuldu. Nöronların çabuk kurumaması için uzun süre havaya maruz kalmasına izin verilmedi.

Petrileri Kaplamak için Ekstrasellüler Matriks (ECM) Hazırlanması (9. Gün)

1. Bir şişe ECM solüsyonu buz üzerinde çözdürüldü ve 1:100 oranında soğuk DMEM (hücre kültürleri için zenginleştirilmiş bir besiyeri) ile seyreltildi.

2. Her 35 mm²'lik petriye 2 ml karışım dağıtıldı ve petrinin tüm tabanı kaplandı.

3. Bir gece boyunca inkübatöre (37 °C, % 5 CO₂) yerleştirildi.

4. Karışım aspire edildi ve steril bir biyolojik kabinde yaklaşık 1 saat boyunca havayla kurumaya bırakıldı.

1:1 ECM Kaplı Petrilere Hücrelerin Transfer Edilmesi (10. Gün)

1. Ortam petrilere eklenmeden hemen önce ısıtılmış ve dengelenmiş ortama RA eklendi.

2. Ortam nazıkçe aspire edildi ve atıldı.

3. Her 35 mm²'lik petriye 200 µl ısıtılmış tripsin eklendi ve nöronlar mikroskop altında gözlemlendiğinde petriden gözle görülür şekilde kalkana kadar yaklaşık 1-2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Nöronlar bu aşamada epitel benzeri hücrelerden çok daha hızlı bir şekilde petrilere ayrılır.

4. 35 mm²'lik tabağa 2 ml Farklılaşma Ortamı 2 eklenerek tripsin uzaklaştırıldı ve kalan nöron hücrelerini petriden yıkamak için ortam kullanıldı. Daha sonra içerikleri 50 ml'lik konik bir tüpe aktarıldı.

5. 50 ml'lik konik tüpte 10 adede kadar kabın içerikleri birleştirildi ve 10 ml'lik plastik bir pipetle beş kereden fazla olmamak üzere yavaşça yukarı aşağı pipetlendi. 6. ECM kaplı 35 mm²'lik kaplara 2 ml hücre süspansiyonu dağıtıldı ve inkübatöre yerleştirildi.

Medyum Değişimi (11. Gün) (Farklılaşma Medyumu 3)

1. Ortamı kaplara eklemekten hemen önce ısıtılmış ve dengelenmiş ortama RA eklendi.

2. Eski ortam nazikçe aspire edildi ve atıldı.

3. Yavaşça 35 mm² kap başına RA içeren 2 ml Farklılaşma Ortamı 3 eklendi ve inkübatöre yerleştirildi. Nöronların uzun süre havaya maruz kalmasına izin verilmedi.

Medyum Değişimi (14. Gün) (Farklılaşma Medyumu 3)

11. gün yapılan işlemler tekrarlandı.

Medyum Değişimi (17. Gün) (Farklılaşma Medyumu 3)

11. gün yapılan işlemler tekrarlandı.

Nöronal Kültürler kullanıma hazır (18. Gün)

Nöron sağlığını korumak için her 3 günde bir RA içeren taze farklılaşma ortamı 3'e ortam değiştirildi.

3.4. Modellerin Uygulanması

Amiloid-beta (A β) Toksisite Modeli

Hücrelere sentetik A β ₁₋₄₂ oligomerleri (1–10 μ M, 24 saat) uygulandı. Ticari olarak satın alınan A β ₁₋₄₂ (Sigma Aldrich), nörotoksisite çalışmalarında gerekli peptit agregalarını elde etmek için önerilen inkübasyon protokolüne göre hazırlandı.

Tau Hiperfosforilasyon Modeli

PP2A'yı inhibe etmek ve p-tau'yu artırmak için okadaik asit (10–50 nM, 24 saat) kullanıldı.

3.5. Hücre Morfolojisi ve Canlılık Analizleri

3.5.1. Hücre Morfolojisinin Analizi

Hücreler 21 gün boyunca farklılaştırıldı ve canlı hücrelerin hücresel morfolojisi, bir faz kontrast mikroskobu (Zeiss) kullanılarak 0, 5, 10, 15 ve 20. günde görselleştirildi. İki bağımsız incelemeci, aşağıda açıklanan önceden belirlenmiş kriterlere dayanarak morfolojik sınıflandırmayı kör olarak gerçekleştirildi. En az iki ayrı deneyden alınan üç örnek büyüme inhibisyonu, nörit uzunluğu ve nörit dallanmasına göre analiz edildi. Büyüme inhibisyonu, 0. gündeki hücre sayısı ile 10. gündeki hücre sayısı karşılaştırılarak belirlendi.

Sınırsız büyümeyle sonuçlanan ve hücrelerin neredeyse tüm kullanılabilir alanı kaplamasıyla temsil edilen tedaviler “+” olarak değerlendirildi. 0. günden daha az hücreyle tam büyüme inhibisyonu ile sonuçlanan tedaviler “+++”, orta düzeyde büyüme inhibisyonu ile sonuçlanan tedaviler “++” olarak değerlendirildi. Nörit uzunluğu için kriterler şu şekildeydi;

- Kısa, körelmiş nöritlere sahip hücrelerin çoğunluğuyla sonuçlanan tedaviler “+++” olarak değerlendirildi.
- Orta düzeyde nörit uzunluğuna sahip hücrelerle sonuçlanan tedaviler “++” olarak değerlendirildi.
- Nörit dallanmasıyla ilgili kriterler ayrı ayrı sıralandı ve hücrelerin çoğunluğunun dallanmış nöritlere sahip olmamasıyla sonuçlanan tedaviler “+” olarak değerlendirildi.
- Hücrelerin çoğunluğunun dallanmış nöritlere sahip olmasıyla sonuçlanan, ancak dallanmadan sonra kısa uzantılar gösteren tedaviler “++” olarak değerlendirildi.
- Hücrelerin çoğunluğunun çok sayıda dallanmış nöritlere ve dallanma noktasından sonra yoğun büyümeye sahip olmasıyla sonuçlanan tedaviler “+++” olarak değerlendirildi.

3.5.2. Farklılaşmış Hücrelerin Kültürlenmesi

1. Yapışık hücre kültürleri % 90 birleşmeye kadar büyütüldü, ardından monokatmanlar iki kez PBS ile yıkandı. PBS atılarak 2 ml (100 mm petri için) % 0,05 tripsin-1 mM EDTA eklendi ve hücreler ayrılana kadar 37°C'de inkübe edildi. 2 ml tam ortam eklenerek tripsinizasyon durduruldu ve hücreler süspansiyon haline

gelene kadar karışım hafifçe 5 ml'lik bir pipet kullanarak pipetlendi. Hücreler 15 ml'lik konik bir tüpe aktarıldı.

2. 10 mg/ml DNase stoğundan 40 µl eklendi ve oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. Kısa bir süre vortekslendi ve 200 g'de 5 dakika santrifüj edildi.

3. Üstteki sıvı atıldı ve pelet 1 ml tam hücre kültürü ortamıyla yıkandı ve 2 ml tam doku kültürü ortamında yeniden süspanse edildi.

4. Hücreler EVE cell counter ile sayıldı ve konsantrasyon $2,5 \times 10^6$ hücre/ml'ye ayarlandı.

3.5.3. Asılı Damlaların Oluşumu

1. 60 mm'lik bir hücre kültürü kabının tabanına 5 ml PBS konuldu. Bu bir hidrasyon haznesi görevi gördü.

2. Kapak ters çevirildi ve 20 µl'lik bir pipet kullanılarak kapağın tabanına 10 µl damla bırakıldı. Damlalar birbirine değmeyecek kadar aralıklı yerleştirildi. Kap başına 20 damla konuldu.

3. Kapağı PBS ile dolu alt hazne ters çevrildi ve 37°C, % 5 CO₂ ve % 95 nemde inkübe edildi, damlalar günlük olarak izlendi ve hücre tabakaları veya agregalar oluşana kadar inkübe edildi. Agregalar oluşumunu değerlendirmek için bir stereo mikroskop kullanıldı.

4. Tabakalar oluştuğunda, 3 ml tam ortam içeren yuvarlak tabanlı cam çalkalayıcı şişelere aktararak sferoidler oluşana kadar 37°C ve % 5 CO₂'de çalkalayıcı su banyosunda inkübe edildi.

Hücreler, asılı damla oluşumundan önce membrana yerleştirildiğinde achyrofuran ile tedavi edildi. Son olarak, hücre-hücre bağlantılarında görevli cadherin proteinlerinin işlevini korumak amacıyla % 0.05 tripsin/2 mM kalsiyum çözeltisi kullanılarak hücreler kültür yüzeyinden ayrıldı ve apoptoz, otofaji, mitofaji, hedef gen, miRNA ve circRNA analizleri gerçekleştirildi.

3.5.4. Achyrofuran Uygulaması

Achyrofuran 0.07 µg/ml (1 ml H₂O) tedavi serisine tek doz uygulandı ve 24 saat sonra maruziyet sonrası kontrol hücrelerine karşı analizler gerçekleştirildi. Süre seçiminde bakteriyel kültürlerde achyrofuranın nanomolar konsantrasyonları 12 saat içinde 10⁶ bakteriyi öldürmesi esas alınmıştır.

Bu hücre gruplarının bir bölümü gen ekspresyonları için diğer bölümü ise apoptoz, otofaji ve mitofaji testleri için kullanıldı.

3.6. Gen, circRNA ve miRNA Ekspresyonlarının Analizi

3.6.1. Ekspresyonu Yapılacak Genlerin Seçimi

AH patolojisinden sorumlu 3 temel yolda sorumlu köşe taşı genler belirlendi. Daha sonra bu genleri hedefleyen miRNA'lar (TargetScan) ve miRNA'larla ilişkili circRNA'lar (<http://www.circbank.cn>) tespit edildi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Gen, miRNA ve hedef circRNA'lar.

Yolaklar	Genler	miRNA'Lar	cirRNA'lar
Otofaji	BECN1	<i>hsa-miR-513a-3p</i>	hsa-circBECN1_003
	p62 (SQSTM1)	<i>hsa-miR-1343-3p</i>	hsa-circSQSTM1_009
	LC-3 (MAP1LC3A)	<i>hsa-miR-486-3p</i>	hsa-circ MAP1LC3A_002
Apoptoz	Cycs	<i>hsa-miR-1283</i>	hsa-circCYCS_001
	Apaf1	<i>hsa-miR-579-3p</i>	hsa-circAPAF1_024
	Casp9	<i>hsa-miR-665</i>	hsa-circCASP9_002
	Casp3	<i>hsa-miR-548c-3p</i>	hsa-circCASP_003
Mitofaji	PINK1	<i>hsa-miR-129-1-3p</i>	hsa-circPINK1_001
	PARK2	<i>hsa-miR-4690-3p</i>	hsa-circPARK2_003
	LRRK2	<i>hsa-miR-338-5p</i>	hsa-circLRRK2_001

miRNA ve Gen ekspresyonları için RNA elde edilmesi

Toplam RNA, üreticinin protokolüne göre TRIzol reaktifi kullanılarak aşağıda verilen aşamalar sonunda elde edildi.

2 ml eppendorf tüplerindeki örnekler oda sıcaklığında çözüldü ve 200 µL trizol eklendi, bir vorteks kullanılarak karıştırıldı.

200 µL kloroform-izoamil alkol eklendi. Tekrar vorteks ile karıştırıldı ve 15 dakika boyunca 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Üstteki sıvı yeni bir steril 2 mL eppendorf tüpüne aktarıldı.

200 µL izopropanol eklendi. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi ve 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı döküldü ve % 80 EtOH eklendi. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi ve 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı atıldı ve oda sıcaklığında kurutuldu.

Örnekler 50 µL ddH₂O'da çözüldü.

RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı bir spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Multi Skan Go) kullanılarak değerlendirildi ve daha ileri analiz için 1,8 ile 2,0 arasında bir A260/A280 oranına sahip RNA örnekleri kullanıldı.

Dairesel RNA (circRNA)'ların elde edilmesi

Daha önce tarif edildiği gibi circRNA'lar Trizol yöntemi ile total RNA havuzundan elde edildi. DNaz uygulanarak sonraki aşamalarda spesifik olmayan amplifikasyonun önlenmesi için DNaz R kullanıldı. Daha sonra dairesel RNA'ları lineer hale getirmek için RNaz R kullanıldı. Bu işlem için total RNA'nın 1 µg'ı kullanıldı. Reaksiyon başına RNaz R'nin 10 ünitesi ve buffer kullanıldı. 1 saat 37 °C'de inkübe edildi. RNase R işleminin etkinliğini değerlendirmek için her araştırılan örnek için kontrol (eklenen enzim yok) de çalışıldı. RNAeasy temizleme kiti (Qiagen) ile RNase R işleminden bozulmuş RNA parçalarının ve diğer kirleticilerin uzaklaştırılması için circRNA ile zenginleştirilmiş fraksiyonun kolon kiti bazlı saflaştırılması gerçekleştirildi.

Tamamlayıcı DNA (cDNA) elde edilmesi

Genler için cDNA, yüksek kapasiteli bir cDNA ters transkripsiyon kiti (Solis Biodyne, SOLIScript® RT cDNA sentez kiti, 06-35-00050) kullanılarak 1 µg toplam RNA'dan sentezlendi. Reaksiyon karışımı (10 µL), 10 ng toplam RNA, 4 µL 5X Ters Transkripsiyon Tamponu, 1 µL Rastgele Primerler, 1 µL Ters Transkriptaz Enzimi ve 10 µL'ye kadar Nükleaz içermeyen ddH₂O içeriyordu. Reaksiyon aşağıdaki termal koşullar altında gerçekleştirildi: 10 dakika boyunca 25°C (primer tavlama), 60 dakika boyunca 42°C (cDNA sentezi), 5 dakika boyunca 85°C (enzim inaktivasyonu). Sentezlenen cDNA, daha sonraki kullanıma kadar -20°C'de saklandı.

miRNA'lar için Toplam RNA örnekleri (3,5 µl) miScript Kiti (Qiagen, 218161) kullanılarak cDNA'ya dönüştürüldü. Bu aşamada, toplam RNA'ya 5x miScript Hispec tamponu, 10x miScript Nucleics karışımı, DNase-RNase içermeyen su ve miScript Reverse A transkriptaz karışımı eklendi ve toplam reaksiyon hacmi 7 µl'ye tamamlandı. Örnekler bir ısı döngüleyiciye (Veriti 96-Well Fast, 4375305)

yerleştirildi ve ters transkripsiyon reaksiyonu 37 °C'de 60 dakika, 95 °C'de 5 dakika gerçekleştirildi. Ardından, cDNA örnekleri nükleaz içermeyen suyla 1/5 oranında seyreltilti.

Dairesel RNA'lar için yukarıda ifade edilen koşullardan farklı olarak 30 ng RNA ve random hekzamerler kullanıldı.

3.6.2. Ekspresyon Analizleri

Gen ifadelerinin analizi qRT-PCR ile cDNA örnekleri kullanılarak gerçekleştirildi. Tablo 3.2'de ifade edildiği gibi 10 µL reaksiyon karışımı hazırlandı. Gen ifadelerinin analizinde SYBR Green prob teknolojisi kullanıldı.

Tablo 3.2. Gen ifadeleri için reaksiyon karışımı

Bileşenler	Hacimler
2X SYBR	5 µl
10X Primer	1,5 µl
ddH ₂ O	3,5 µl
Toplam	10 µl

Reaksiyon karışımına 5 µl cDNA eklenerek 0,1 mL'lik PCR tüplerine konuldu ve iki adımlı bir PCR programı ile Real-Time PCR cihazında Tablo 3.3'te verilen koşullarda inkübe edildi.

Tablo 3.3. İnkübasyon koşulları.

Derece (°C)	Süre	Döngü (n)
95	15 dk	1
94	5 san	35
60	30 san	

Bağıl gen ekspresyon analizlerinden elde edilen veriler (Rotor-Gene Q, Qiagen, Hilden, Almanya) *hsa-miR-26b* geni ve insan referans RNA'sına (Life Technologies; AM7155) göre normalize edildi. Ticari kitin önerisine göre toplam 20 µl PCR reaksiyonu hazırlandı. Reaksiyon 5 µl cDNA, 2x SYBR Green master mix (QuantiTect SYBR Green PCR Kiti, 204143) ve primerler içeriyordu ve miRNA ekspresyon analizi Real-Time PCR kullanılarak gerçekleştirildi. Örnekler 1 döngü boyunca 95 °C'de 15 saniye, 40 döngü boyunca 94 °C'de 15 saniye ve 55 °C'de 30 saniye inkübe edildi. Tüm reaksiyonlar üç kez tekrarlı çalışıldı.

circRNA'lar qPCR erime eğrisi analizinden elde edilen erime sıcaklığından tek bir tepe noktası primerlerin özgülüğünü doğruladı. Verimli bir amplifikasyon için gereken miktarı belirlemek amacıyla 5 cDNA seyreltmesinin standart eğrisi elde edildi. Hem RNase R etkinliğini belirlemek hem de circRNA zenginleştirmesini (enrichment) hesaplamak için doğrusal mRNA'nın ifade düzeyi araştırıldı. RNase R tedavisini takiben dairesel RNA zenginleştirmesi, Panda ve Gorospe tarafından belirtilen formüle göre yüzdeler olarak ölçüldü.

3.7. Apoptoz, Otofaji ve Mitofaji

3.7.1. Tripan Blue ile Hücre Canlılığının Tespiti

Hücre canlılığı, canlı hücrelerin sayısı EVE Cell counter ile tespit edildi. Tripan mavisi alan hücrelerin canlı olmadığı kabul edildi.

1- pH 7,2-7,3 (fosfat tamponlu salin) tamponlu izotonik tuz çözeltisi içinde % 0,4'lük bir tripan mavisi çözeltisi hazırlanacaktır.

2-1 mL hücre süspansiyonuna 0,1 mL tripan mavisi stok çözeltisi eklenecektir.

3- Lamlara 10 µL stok çözeltiden eklendi.

4- Otomatik sayım cihazında sayıldı.

Canlı hücreler yüzde olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanacaktır;

$$\% \text{ canlı hücreler} = [1.00 - (\text{Mavi hücrelerin sayısı} / \text{Toplam hücre sayısı})] \times 100$$

3.7.2. Hücre Proliferasyon Analizi

Hücreler, kuyucuk başına 1×10^4 hücre yoğunluğunda olacak şekilde 96 kuyucuklu plate'e ekilerek gece boyunca 37°C'de % 5 CO₂ içerisinde kültürlendi. İkinci günde ortam, çeşitli konsantrasyonlarda fetal sıgır serumu içeren veya içermeyen taze ortamla değiştirildi ve bir deney için altı paralel kuyucuk düzenlendi. Ortam her 3 günde bir yenilendi. 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7. günlerde her bir oyuğa CCK-8 reaktifi (10 ul) ilave edildi ve 37°C'de 1 saat süreyle inkübe edildi. Optik absorbans, 450 nm dalga boyunda bir plaka okuyucusu ile ölçüldü. Okumalar boş ortamla normalize edildi. Hücre proliferasyonu, seçilen günün okumalarının toplam günün okumalarına oranı olarak hesaplandı.

3.7.3. MTT Sitotoksiste Testi

Achyrofuran 0.07 µg/ml'lik konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücrelerinde hücre canlılığına olan etkisi 3-(4,5-dimetiltiazol) --2-il)-difeniltetrazolyum bromid (MTT) yöntemine göre belirlenecektir. Bu yöntem MTT bileşiğinin tetrazolium halkasını parçalayabilmesi özelliğine dayanır. MTT canlı hücrelere absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Bu reaksiyon yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu hücrelerde gerçekleşir. Bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilir ve oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçülerek yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir. Canlılık düzeyleri belirlenen hücrelerin 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucuğa 1×10^4 hücre gelecek şekilde ekimleri gerçekleştirildi. Plakalar bir gün süreyle CO₂'li ortamda inkübe edildi ve sonrasında peptitin 0.07 µg/ml'lik konsantrasyonunda 24 saat muamele edildi. Bu süre sonrasında hücre canlılığında meydana gelen değişimlerin belirlenmesi için 0,5 mg/ml MTT (İhalede alınacak ürün esastır) çalışma solüsyonu hazırlandı her bir kuyucuğa hazırlanan MTT solüsyonundan 100 µL ilave edilerek 3 saat süresince CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda plaklardaki hücrelerin

optik dansiteleri mikro plaka okuyucuda (Thermo Scientific, MultiSkanGo) 570 nm dalga boyunda okundu. Kontrol kuyucukları (sadece hücre ve ortam bulunan kuyucuklar) okutularak, elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alındı bu değer % 100 canlı hücre olarak kabul edildi. Peptid ve çözücü (PBS) uygulanan kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri, kontrol absorbans değerine oranlandı ve yüzde canlılık değerleri hesaplandı. Achyrofuran'ın hücre canlılığına etkisi çözücüye kıyasla analiz edildi. Bu deneyler farklı günlerde, birbirinden bağımsız olarak 10 kez tekrarlandı.

3.7.4. Apoptoz Analizi

Apoptoz belirlenmesi için kalorimetrik ELISA yöntemi kullanıldı (Abcam, ab223863). Erken apoptoz için fosfatidilserin normal şartlarda canlı hücrelerin iç zarında bulunur. Fosfatidilserinin açığdaki membran yüzeyine translokasyonu, fagositik hücrelerin saldırısı için bir sinyal olarak hizmet ettiği apoptozun erken bir olayıdır. Anneksinler, spesifik olarak hücresel membranlara bağlanabilen, yapısal olarak ilişkili proteinlerin bir ailesidir. Annexin V, negatif yüklü fosfolipid fosfatidilserin içeren membranlar için çok yüksek bir afiniteye sahiptir ve erken apoptoz olaylarının belirteci olarak kullanılabilir. Kit çözeltideki numune analitini immüno-yakalayan bir afinite etiketi etiketli yakalama antikoru ve bir raportör konjuge dedektör antikoru kullanır. Bu kompleksin tamamı (yakalama antikoru/analit/dedektör antikoru), kuyucuğu kaplayan bir anti-etiket antikorunun immün afinitesi yoluyla hareketsiz hale getirilir. Testi gerçekleştirmek için kuyucuklara numuneler ve standartlar eklenir ve ardından antikor karışımı eklenir. İnkübasyondan sonra, bağlanmamış materyalin uzaklaştırılması için kuyucuklar yıkanır. TMB Geliştirme Solüsyonu eklenir ve inkübasyon sırasında HRP tarafından katalize edilerek mavi renk oluşturulur. Bu reaksiyon daha sonra, maviden sarıya herhangi bir renk değişimini tamamlayan Durdurma Solüsyonu eklenerek durdurulur. Sinyal, bağlı analit miktarıyla orantılı olarak üretilir ve yoğunluk 450 nm'de ölçülür.

Buna göre kültüre hücrelerin bulunduğu kuyulara 50 µl standart ve örnekler eklenecek ve üzerine 50 µl antibadi eklendi. Oda ıssında 1 saat inkübasyondan sonra ortam aspire edilerek her bir kuyu 350 µl 1X yıkama tamponu ile x3 yıkandı. Her bir kuyuya 100 µl TMB geliştirme solüsyonu eklenerek 10 dakika inkübe edildi. Son olarak durdurma solüsyonu eklenerek 450 nm'de okundu.

3.7.5. Mitofaji Analizi

Kit, sağlanan Janus Green Boyası kullanılarak hücre boyama yoluyla kuyu başına görel hücre yoğunluğunu belirlemek için bir yöntem içerir. Hücre kültür işlemi 96 düz kuyulu plate'de (poli-L-lizin kaplı) gerçekleştirildi. EVE Cell Counter ile sayılarak 25.000 hücre/kuyu olarak ekim yapıldı (kontrol ve achyrofuran grubu olmak üzere). Hücrelerin yapışmasına (5 saat) ve bölünmesine izin verildi (1 gün). Hücre yapışmasını takiben ortam değiştirildi (Hücre büyüme medyum). Kontrol ve achyrofuran olmak üzere 2 hücre serisinden 3 tekrar olacak şekilde achyrofuran uygulandı ve mitofaji ELISA kit (MitoBiogenesis™ In-Cell ELISA Kit (Colorimetric), ab1100217, Abcam) kullanılarak ölçümler gerçekleştirildi.

Hücre medyum çekilerek kuyulara % 4 paraformaldehit eklendi. Hücrelerin yerinden oynamasını önlemek için çözeltiyi her kuyunun yanlarından yavaşça damlatıldı. 20 dakika inkübe edildi. Plakadan paraformaldehit solüsyonu nazikçe aspire edildi, atıldı ve 300 µL 1X PBS ile 3 kez kısaca yıkandı. Son olarak, plakanın kuyularına 100 µL 1X PBS eklendi. PBS atılarak endojen alkalen fosfataz aktivitesini engellemek için her bir kuyucuğa 5 dakika boyunca 100 µL taze hazırlanmış % 0,5 asetik asit eklendi. % 0,5 asetik asit uzaklaştırıldı ve plaka bir kez 200 µL 1X PBS ile yıkandı. PBS atıldı ve her bir plaka kuyusuna 100 µL taze hazırlanmış 1X Permeabilizasyon Tamponu eklendi. 30 dakika inkübe edildi. 1X Permeabilizasyon Tamponunu atıldı ve plakanın her bir kuyusuna 200 µL 2X Bloklama Tamponu eklenerek 2 saat inkübe edildi. 200X Primer Antikorları 1X İnkübasyon Tamponuna seyreltilerek 1X Primer Antikor Çözeltisi hazırlandı. 199 hacim 1X İnkübasyon Tamponu başına 1 hacim 200X stok kullanıldı. 2X Bloklama Tamponu aspire edildi ve plakanın her bir kuyusuna 100 µL seyreltilmiş Birincil Antikor Çözeltisi eklendi. 4°C'de bir gece boyunca inkübe edildi. Birincil Antikor Çözeltisi çıkarıldı ve 1X Yıkama Tamponunda 3 kez kısaca yıkandı. Her yıkama için, plakanın her bir kuyusunu 250 µL 1X Yıkama Tamponuyla yıkandı. Son yıkama atılmadan muhafaza edildi. 12 mL 1X İnkübasyon Tamponuna hem 4,8 µL 2500X AP-etiketli hem de 4,8 µL 2500X HRP-etiketli Sekonder Antikor eklenerek 1X AP/HRP-etiketli Sekonder Antikor Çözeltisi hazırlandı. Plakadaki 1X Yıkama Tamponunu atıldı ve plakanın her bir kuyusuna 100 µL 1X AP/HRP etiketli Sekonder Antikor Solüsyonu eklendi. Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İkincil

Antikor Çözeltisi çıkarıldı ve 1X Yıkama Tamponunda 4 kez kısaca yıkandı. Her yıkama için, plakanın her bir kuyusu 250 µL 1X Yıkama Tamponuyla yıkandı. Son yıkama solüsyonu atıldı. Her boş kuyuya AP Reaktifi ile desteklenmiş 100 µL AP Geliştirme Solüsyonu eklendi ve bir spektrofotometre ile 405 nm'de OD verileri kaydedildi. COX-I tespiti için HRP Geliştirme adımı AP verileri kaydedildikten sonra, fazla sıvıyı çıkarmak için AP Geliştirme Çözeltisi tamamen atıldı. 100 µL HRP Geliştirme çözeltisi eklendi ve 600 nm'de OD verileri kaydedildi.

OD ölçümleri kullanılarak veri analizi gerçekleştirildi. Her deneysel koşuldan tüm tekrarlanan arka plan ölçümlerinin ortalamasını hesaplandı. Bu arka plan okuması aynı koşulun tüm deneysel değerlerinden çıkarıldı. COX-I sinyali ve SDH-A sinyali bir oran (COXI/SDH-A) olarak çizildi. Bu veriler Janus yeşil boyama yoğunluğuna göre de normalleştirildi.

3.7.6. Otofaji Analizi

Kit hücre kültür ekstraktlarında LC3A'nın kantitatif ölçümüne dayanmaktadır.

SH-SY5Y hücrelerinde otofajinin analizi için hücreler tripsin ile toplandı ve santrifüjlendi (4°C, 5 dakika, 500 x g). Hücreler iki kez PBS ile durulandı. Pelet soğutulmuş 1X Hücre Ekstraksiyon Tamponu PTR'de 2×10^7 hücre/mL'de çözüldü. 20 dakika buz üzerinde inkübe edildi. 4°C'de 20 dakika boyunca 18.000 x g'de santrifüjlendi. Üstteki sıvıları temiz tüplere aktarıldı ve peletler atıldı. Örnekler alikotlanarak -80°C'de saklandı. Ekstrakttaki protein konsantrasyonu BCA protein testi (ab102536, abcam) kullanılarak ölçüldü. Örnekler 1X Hücre Ekstraksiyonu Tampon PTR'de seyreltildi. Tüm standartlar, kontroller ve numuneler iki tekrarlı çalışıldı. Tüm reaktifler, çalışma standartları ve örnekler kit protokolünde tarif edildiği gibi hazırlandı. Uygun kuyulara tüm numuneden veya standarttan 50 µL eklendi. Her kuyuya 50 µL Antikor Kokteyli eklendi. Plaka kapatıldı ve 400 rpm'ye ayarlanmış bir plaka çalkalayıcıda oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Her kuyuyu 3 x 350 µL 1X Yıkama Tamponu PT ile yıkandı. Tampon aspire edilerek yıkandı, ardından her kuyuya 350 µL 1X Yıkama Tamponu PT dağıtıldı. Yıkama Tamponu PT en az 10 saniye kuyucuklarda bekletilerek aspire edildi. Her bir kuyuya 100 µL TMB Geliştirme Solüsyonu eklendi ve 400 rpm'ye ayarlanmış bir plaka çalkalayıcıda karanlıkta 10 dakika inkübe edildi. Her bir kuyuya 100 µL Durdurma Solüsyonu

eklendi. Karışması için plaka bir plaka çalkalayıcıda 1 dakika çalkalandı. OD 450 nm'de kaydedildi. Boş kontrol (sıfır) standartları için ortalama absorbans değerini hesaplandı. Ortalama boş kontrol standart absorbans değeri diğer tüm absorbans değerlerinden çıkarıldı. Her standart konsantrasyonu (y eksenini) için ortalama boş kontrol çıkarılmış absorbans değeri standardın hedef protein konsantrasyonuna (x eksenini) göre çizerek bir standart eğri oluşturuldu. Numunedeki hedef proteinin konsantrasyonu, boş kontrolden çıkarıldı, absorbans değerleri standart eğriye göre interpolate edilerek belirlendi. Elde edilen değer, hedef proteinin numunedeki konsantrasyonunu elde etmek için numune seyreltme faktörüyle çarpıldı.

3.8. İmmünohistokimya (ICC) ile TAU ve A β Değerlendirilmesi

Hücre kültüründe TAU ve A β proteinlerinin varlığı ve miktarı analiz edildi. Bunun için ICC yöntemi kullanıldı. Hücreler petri kapları içine yerleştirilen yuvarlak steril cam lamellere ekildi. SH-SY5Y hücrelerinin uygun yapışması için poli-lizin işlenmiş lamellerde büyütüldü. Kültür ortamı kaptan aspire edildi ve oda sıcaklığında PBS ile nazikçe yıkandı. Lamel camları oda sıcaklığında taze hazırlanmış % 4 paraformaldehit - PBS'de 10 dakika inkübe edildi ev süre sonunda atıldı. Lameller 2 dakika PBS'de yıkandı. Lameller oda sıcaklığında PBS'de % 0,5 Triton X-100'de 5 dakika inkübe edildi. Normal serum bloğu, sekonder antikorun yükseltildiği insan olarak seçildi. Arkaplan floresansını azaltmak için, lameller oda sıcaklığında 1 saat boyunca PBS'de hazırlanmış % 1-5 normal serum veya BSA ile bloke edildi. Geçirgenleştirme tamponunun lamelleri PBS'de 5 dakika inkübe ederek yıkandı. ICC için birincil antikor (A β ve Tau) seyreltmeleri % 1 normal serumda hazırlandı. her antikorun uygun bir sinyal elde etmek için optimizasyona ihtiyacı olabilir. Lameller birincil antikor seyreltmesiyle oda sıcaklığında 1 saat (37°C isteğe bağlıdır) veya 4°C'de bir gece inkübe edildi. Lameller PBS'de üç kez, her biri 5 dakika olmak üzere nazikçe yıkandı. % 1 normal serum ile florokrom konjuge sekonder antikor seyreltildi. Lameller ikincil antikor seyreltmesiyle oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 1 saat inkübe edildi. Lameller PBS'de üç kez, her biri 5 dakika olmak üzere nazikçe yıkandı. Lameller tırnak cilasıyla kapatıldı. Hücreler bir floresan mikroskop altında incelendi ve görüntü alındı.

Proteinlerin değerlendirilmesinde, lekelenme şiddeti ve lekeli alanın yüzdesine göre puanlama yapıldı. Buna göre boyanma şiddetleri negatif (boyama

yok), 1+ (zayıf boyanma), 2+ (orta boyanma) ve 3+ (kuvvetli boyanma) olarak değerlendirildi. Boyalı alanın yüzdeleri 0 olduğunda 0, <% 25 olduğunda 1, % 25-50 olduğunda 2, >% 50 olduğunda 3 olarak puanlandı. Nihai puan, boyama yoğunluğu puanının, lekeli alanın yüzde değerinden elde edilen puanla çarpılmasıyla elde edildi ($H\text{-puanı} = (0 \times P_0) + (1 \times P_1) + (2 \times P_2) + (3 \times P_3)$). Buna göre (0) negatif puan, (1-3) düşük puan, (4-6) orta puan ve (7-9) yüksek puan ifade olarak değerlendirildi. Veriler istatistiksel analiz için yeniden sınıflandırıldı; negatif (0), düşük (1), orta (2), yüksek (3).

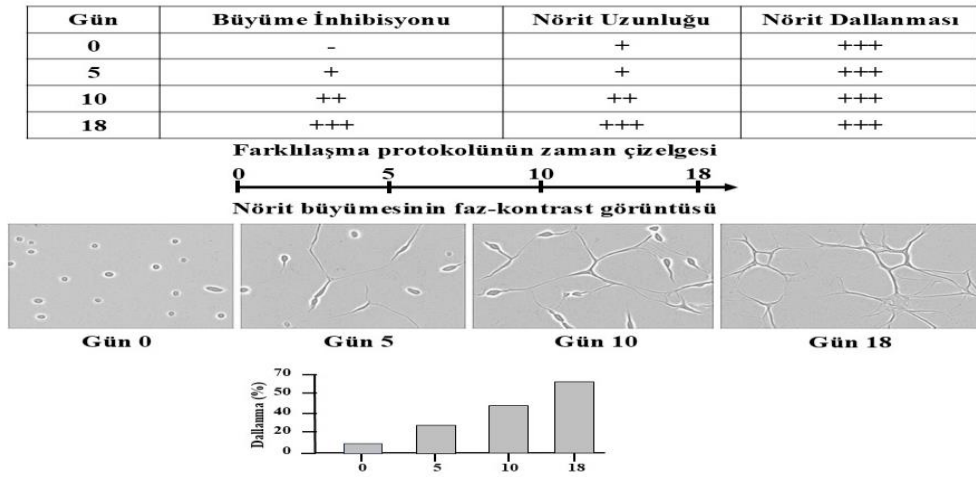
3.9. İstatistiksel Analiz

Hesaplamalar SPSS paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile değerlendirildi. Gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde tekli karşılaştırmalar için eşleştirilmemiş t testleri (iki kuyruklu) ve çoklu karşılaştırmalar için iki yönlü ANOVA kullanıldı. İstatistiksel analizler SPSS 11.0 ve Microsoft Excel yazılımında gerçekleştirildi. Nicel veriler ortalama $\pm$ standart hata (Ort. $\pm$ SH) olarak ifade edildi. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaşması

SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri, 18 gün boyunca nöron benzeri hücrelere başarılı bir şekilde farklılaştı (Şekil 4.1). Faz kontrast mikroskopisi, zamanla artan nörit çıkıntısı ve dallanması da dahil olmak üzere morfolojik değişiklikler ortaya koydu. 10. güne kadar hücreler önemli büyüme inhibisyonu (+++) gösterdi ve nöritleri uzattı (uzunluk için +++, dallanma için ++). ECM kaplaması (9. gün) nörit karmaşıklığını daha da artırdı ve hücrelerin % 70'i 18. güne kadar dallanmış süreçler gösterdi (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. SH-SY5Y Nöronal Farklılaşması Sırasında Morfolojik Değişiklikler

(A) Her zaman noktasında büyüme inhibisyonu, nörit uzunluğu ve dallanmanın puanlanması: Büyüme inhibisyonu: "-" (hiç yok), "+" (hafif), "++" (orta), "+++" (tam). Nörit uzunluğu/dendritik karmaşıklık: "+" (kısa), "++" (orta), "+++" (uzatılmış).

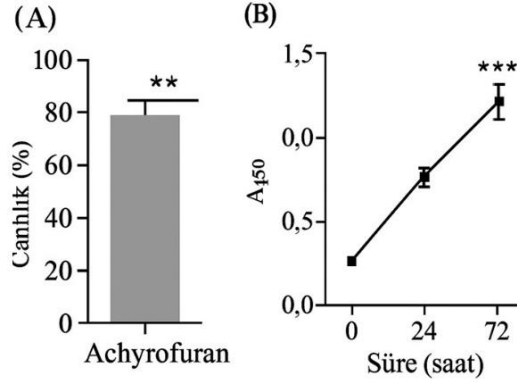
(B) Farklılaşmanın 0, 5, 10 ve 18. günlerinde nörit çıkıntısını gösteren faz kontrast görüntüleri. Ölçek çubuğu: 50 μ m.

(C) Zaman içinde nörit dallanmasının (dallanmış uzantılara sahip hücrelerin % 'si) kantifikasyonu. Veriler ortalama $\pm$ SEM'i (standart hata ortalaması) temsil eder (n = 3 bağımsız deney).

4.2. Achyrofuran Tedavisi ve Hücre Canlılığı

Achyrofuran (0,07 μ g/mL) SH-SY5Y canlılığını 24 saatte % 25 oranında azalttı (p < 0,01, MTT testi, Şekil 4A). Tripan mavisi dışlanması, tedavi edilen hücrelerde % 78 canlılık olduğunu, kontrollerde ise % 95 canlılık olduğunu

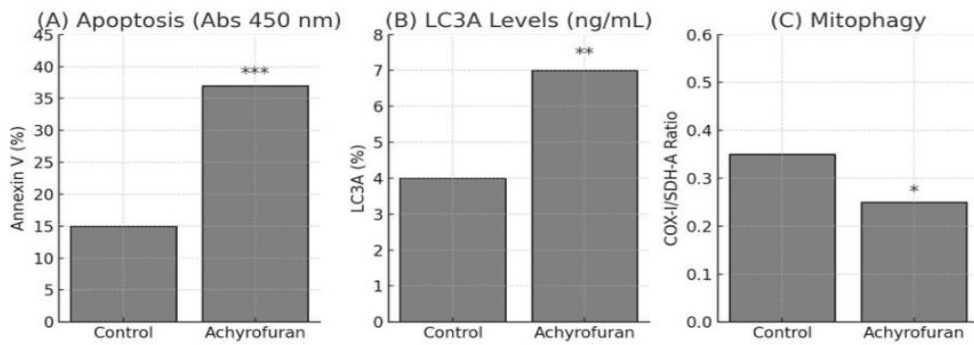
doğruladı ($p < 0,05$). CCK-8 testleri, doza bağlı proliferasyon inhibisyonu gösterdi (Şekil 4.2B), 48 saatte önemli etkilere sahipti ($p < 0,001$).



Şekil 4.2 (A) MTT canlılık testi (24 saat). (B) CCK-8 çoğalma eğrisi (0–72 saat).

4.3. Apoptoz, Otofaji ve Mitofaji Analizleri

Achyrofuran uygulamasının hücre ölümü ve otofajik süreçler üzerindeki etkileri farklı biyobelirteçler ile değerlendirildi. Annexin V ELISA analizine göre, Achyrofuran tedavisi apoptozu 2,5 kat artırdı ($p < 0,001$) (Şekil 4.3A). LC3A düzeylerine yönelik ELISA sonuçları, otofajik aktivitenin % 40 oranında arttığını ortaya koydu ($p < 0,01$) (Şekil 4.3B). Mitofaji analizi kapsamında ölçülen COX-I/SDH-A oranı % 35 oranında azaldı ($p < 0,05$) ve bu durum mitokondriyal bozulmayı ve mitofajinin artışı göstermektedir (Şekil 4.3C).



Şekil 4.3. (A) Apoptosis (absorbance 450 nm). (B) LC3A düzeyleri (ng/mL). (C) Mitofaji (COX-I/SDH-A oranı).

4.4. Gen ve circRNA/miRNA Ekspresyonu

AH ile ilişkili yolların qRT-PCR analizleri Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. AH ile İlgili Genlerin, miRNA'ların ve circRNA'ların entegre ifade profili.

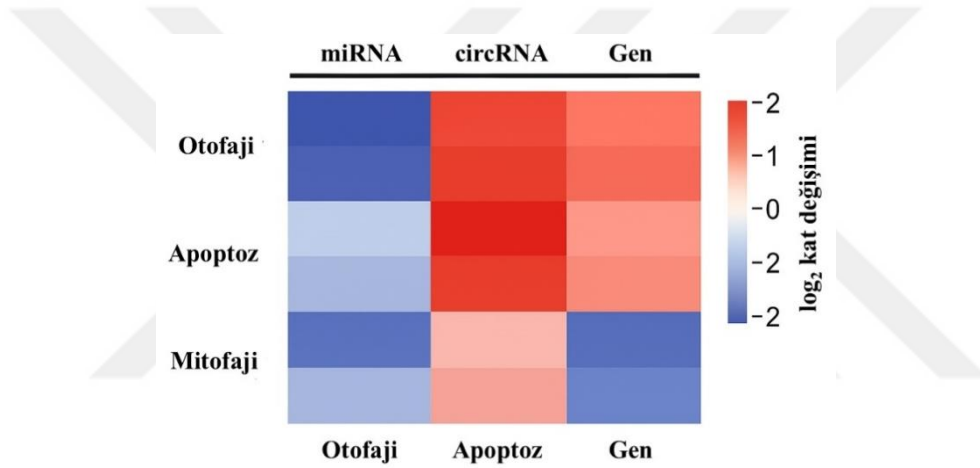
Yolaklar	Gen Sembolü	Gen Ekspresyonu (Fc)	miRNA ID	miRNA Ekspresyonu (Fc)	circRNA ID	circRNA Ekspresyonu (Fc)	AH patogenezindeki Fonksiyonel Rolü
Otofaji	<i>BECN1</i>	↑ 2.1*	<i>hsa-miR-513a-3p</i>	↓ 0.4*	hsa-circBECN1_003	↑ 3.0***	Aβ'nin otofajik temizliğini artırır
	<i>SQSTM1</i>	↓ 1.8*	<i>hsa-miR-1343-3p</i>	↑ 1.5	hsa-circSQSTM1_009	↓ 1.6*	AH plaklarında birikir
	<i>MAP1LC3A</i>	↑ 1.4*	<i>hsa-miR-486-3p</i>	↓ 0.55*	hsa-circMAP1LC3A_002	↑ 2.2**	Otofagozom oluşumu belirteci
Apoptozis	<i>CYCS</i>	↑ 2.5***	<i>hsa-miR-1283</i>	↓ 0.3***	hsa-circCYCS_001	↑ 2.8**	Mitokondriyal apoptozu tetikler
	<i>APAF1</i>	↑ 1.9**	<i>hsa-miR-579-3p</i>	↓ 0.5*	hsa-circAPAF1_024	↑ 1.7*	Apoptozom kompleksini oluşturur
	<i>CASP3</i>	↑ 2.3***	<i>hsa-miR-548c-3p</i>	↓ 0.35***	hsa-circCASP3_003	↑ 3.1***	Nöronal hücre ölümünü gerçekleştirir
Mitofaji	<i>PINK1</i>	↑ 1.7*	<i>hsa-miR-129-1-3p</i>	↓ 0.6*	hsa-circPINK1_001	↓ 0.5*	Mitofajiyi başlatır
	<i>PARK2</i>	↔ Anlamlı değil	<i>hsa-miR-4690-3p</i>	↑ 1.3	hsa-circPARK2_003	↓ 1.4	Hasarlı mitokondrileri ubiquitinleştirir
	<i>LRRK2</i>	↓ 1.5*	<i>hsa-miR-338-5p</i>	↑ 2.0**	hsa-circLRRK2_001	↓ 1.8*	Tau patolojisini destekler

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Tablo 4.1. AH ile ilişkili otofaji, apoptoz ve mitofaji yollarındaki genler ile bu genlere karşılık gelen miRNA ve circRNA'ların entegre ekspresyon profilleri sunulmuştur. Achyrofuran tedavisi çoğu genin ekspresyonu artarken hedef miRNA'larda azalma, circRNA'larda ise artış gözlenmiştir.

Bulgular, özellikle apoptoz ve otofaji yollarının aktif hale geldiğini ve circRNA-miRNA-gen etkileşiminin bu süreçlerde rol oynayabileceğini göstermektedir. Kat değişimi (Fc) gösterilmiş, anlamlılık düzeyleri yıldızlarla belirtilmiştir ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $*p < 0.001$).

miRNA'lar, circRNA'lar ve genler arasındaki etkileşimleri ve ifade değişikliklerini gösteren bir ısı haritası Şekil 4.4.'te verilmiştir.



Şekil 4.4. miRNA/circRNA ekspresyonunun ısı haritası (log2 kat değişimi).

AH ile ilgili yoldaki (otofaji, apoptozis, mitofaji) tanımlanmış genlerin, miRNA'ların ve circRNA'ların ifadesinin ve ilişkilerinin farklılaştırılmış SH-SY5Y 3D nöronal modeli kullanılarak yapılandırılmış bir değerlendirmesi sonucunda ekspresyon verileri, fonksiyonel analizler ve biyoenformatik tahminlerin anlamlılığını gösterdi. Isı haritası miRNA'lar, circRNA'lar ve genler arasındaki potansiyel etkileşimleri ve ifade değişikliklerini gösteren bir analizi temsil etmektedir. Görselde yatay eksen miRNA'lar (muhtemelen otofaji, apoptoz ve mitofaji gibi hücresel süreçlerle ilişkili olanlar), dikey eksen ise circRNA'lar veya genler listelenmiştir. Renkli hücreler, miRNA'ların circRNA'lar veya genler üzerindeki düzenleyici etkilerinin şiddetini ve yönünü göstermektedir. Koyu renkler, daha güçlü etkileşimleri veya daha belirgin ifade değişikliklerini ifade ederken, log2

kat değişimi değerleri (örneğin -2, -1, 0) gen ifadesindeki azalma veya artmaları yansıtmaktadır. Negatif değerler, miRNA'ların hedef genleri veya circRNA'ları baskıladığını düşündürmektedir. Özellikle "Otofaji" gibi belirli miRNA'ların birden fazla gen veya circRNA ile etkileşime girdiği görülmekte, bu da fonksiyonel bir düzenleyici ağın varlığına işaret etmektedir.

4.4.1. Otofaji Yolağı

AH-Farklılaştırılmış 3 Boyutlu (3D) Nöronlarda Otofaji Yolağı ile İlgili Gen, miRNA ve circRNA İfadelerinin Analizi

Achyrofuran ile tedavi edilen 3D nöronlarında otofaji yolağının önemli bileşenlerinde belirgin değişiklikler gözlemlenmiştir. BECN1 (Beclin-1) geninin ifadesinde 2,1 katlık anlamlı bir artış ($p<0,01$) tespit edilmiş ve bu artış, otofagozom oluşumunun bir göstergesi olan LC3-II/LC3-I oranındaki yükselişle ilişkilendirilmiştir.

Bu bulgu, Achyrofuran'ın otofajik başlatıcı mekanizmaları uyarabildiğini düşündürmektedir. Diğer yandan, SQSTM1 (p62) geninin ifadesinde 1,8 katlık bir azalma ($p<0,05$) gözlenmiş ve bu durum, otofajik yıkım sürecinin hızlandığına işaret etmiştir. Ayrıca, MAP1LC3A (LC3) protein seviyelerindeki % 40'luk artış (ELISA, $p<0,001$), otofajik aktivitenin güçlü bir şekilde desteklendiğini doğrulamaktadır.

Bu sonuçlar, Achyrofuran'ın nöronal hücrelerde otofaji yolağını etkinleştirerek hücrel homeostazı ve nöroprotektif mekanizmaları güçlendirebileceğini göstermektedir. Ancak, bu etkilerin altında yatan moleküler mekanizmaların tam olarak aydınlatılabilmesi için miRNA ve circRNA'ların düzenleyici rollerinin de detaylıca incelenmesi gerekmektedir.

Alzheimer Hastalığı (AH)-Farklılaştırılmış 3D Nöronlarda miRNA/circRNA Aracılı BECN1 Düzenlenmesi ve AH ile Bağlantısı

Achyrofuran tedavisinin otofaji yolağı üzerindeki etkileri, miRNA ve circRNA'ların düzenleyici rolleriyle daha da netleşmektedir. hsa-miR-513a-3p'nin (BECN1'i hedef alan bir miRNA) % 60 oranında aşağı düzenlenmesi ($p<0,01$), BECN1 ifadesindeki artışla tutarlıdır. Bu miRNA'nın baskılanması, BECN1'in inhibisyonunun kalkmasına ve otofajik aktivitenin artmasına yol açmış olabilir. Dikkat çekici bir şekilde, hsa-circBECN1_003 adlı dairesel RNA'nın 3 kat yukarı düzenlenmesi ($p<0,001$), miR-513a-3p'yi "süngerleme" yoluyla bağlayarak etkisiz

hale getirdiğini ve dolaylı olarak BECN1 ekspresyonunu artırdığını düşündürmektedir. Bu mekanizma, circRNA'ların miRNA'lar üzerindeki kompetitif inhibitör etkisine klasik bir örnektir.

Alzheimer hastalığı bağlamında, bu bulgular önemli terapötik çıkarımlara sahiptir. AH'de BECN1'in aşağı regüle edilmesi, otofaji bozukluğuna ve A β peptit birikimine katkıda bulunur. Achyrofuran'ın miR-513a-3p'yi baskılayarak veya circBECN1_003'ü artırarak BECN1 seviyelerini restore etmesi, toksik protein agregatlarının temizlenmesini teşvik edebilir ve nörodejenerasyonu yavaşlatabilir. Ancak, bu hipotezin doğrulanması için in vivo modellerde daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Özellikle, circBECN1_003'ün miRNA süngerleme kapasitesinin deneysel olarak doğrulanması (örn. lusiferaz raportör assay) ve Alzheimer Hastalığı hayvan modellerinde Achyrofuran'ın nöroprotektif etkilerinin değerlendirilmesi, bu bulguların klinik ufkunu genişletecektir. Sonuç olarak, bu veriler, miRNA-circRNA etkileşimlerinin otofaji yoluyla Alzheimer Hastalığı patolojisinin modüle edilmesinde yeni tedavi hedefleri sunabileceğini vurgulamaktadır.

4.4.2. Apoptoz Yolağı

Genler

Achyrofuran tedavisinin apoptoz yolağı üzerindeki etkileri, mitokondriyal apoptozun belirgin şekilde aktive olduğunu göstermektedir. CYCS (Sitokrom c) gen ifadesinde gözlenen 2,5 katlık anlamlı artış ($p < 0,001$), mitokondriyal membran bütünlüğünün bozulduğuna ve apoptotik kaskadın başladığına işaret etmektedir. Bu bulgu, CASP3 ve CASP9 proteinlerinin bölünme seviyelerindeki belirgin yükselişle (sırasıyla 2,3 ve 2,0 kat, $p < 0,01$) desteklenmektedir. Artan kaspaz aktivitesi, Annexin V testi ile deneysel olarak doğrulanmış olup, programlı hücre ölümünün kesin kanıtını sunmaktadır..

Bu sonuçlar, Achyrofuran'ın nöronal hücrelerde çift yönlü bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir: bir yandan otofajiyi uyararak hücrel temizlik mekanizmalarını güçlendirirken, diğer yandan apoptozu tetikleyerek potansiyel olarak hasarlı hücrelerin elimine edilmesini sağlamaktadır. Alzheimer Hastalığı patolojisi bağlamında, bu dengenin terapötik etkileri dikkatle değerlendirilmelidir. Alzheimer Hastalığında aşırı apoptoz nöron kaybını hızlandırabileceğinden, Achyrofuran'ın apoptotik etkilerinin doz-bağımlılığı ve zamanlaması, gelecek

çalışmalarda ayrıntılı olarak incelenmelidir. Ayrıca, bu süreçte rol oynayan miRNA'ların (örneğin kaspazları hedef alanlar) ve ilgili circRNA'ların düzenleyici mekanizmalarının araştırılması, tedavinin spesifikliğini artırabilir. Sonuç olarak, bu bulgular Achyrofuran'ın nöroprotektif ve apoptotik etkileri arasındaki dengeyi anlamak için yeni araştırma yolları sunmaktadır.

miRNAs/circRNAs:

Achyrofuran tedavisinin apoptoz yolağı üzerindeki etkileri, miRNA ve circRNA'ların düzenleyici rolleriyle daha da netleşmektedir. hsa-miR-1283'ün (CYCS'i hedef alan bir miRNA) % 70 oranında aşağı düzenlenmesi ($p < 0,001$), CYCS ifadesindeki artışla tam uyum göstermektedir. Bu miRNA'nın baskılanması, mitokondriyal apoptozun anahtar bileşeni olan sitokrom c'nin inhibisyonunun kalkmasına ve apoptotik kaskadın aktive olmasına yol açmış olabilir. Özellikle dikkat çekici olan, hsa-circCYCS_001 adlı dairesel RNA'nın 2,8 kat yukarı düzenlenmesidir ($p < 0,01$). Bu circRNA'nın, miR-1283'ü "süngerleme" yoluyla bağlayarak etkisiz hale getirdiği ve böylece CYCS ekspresyonunu artırdığı öne sürülebilir. Bu mekanizma, miRNA-circRNA etkileşimlerinin apoptotik süreçlerdeki kritik rolünü vurgulamaktadır.

Bu bulgular önemli patolojik çıkarımlara sahiptir. Aşırı apoptoz, AH'de gözlenen nöronal kaybın ana nedenlerinden biridir. Özellikle CASP3 aktivasyonunun, tau proteininin bölünmesine ve nörofibriler yumak oluşumuna katkıda bulunduğu bilinmektedir. Achyrofuran'ın miR-1283'ü baskılayarak veya circCYCS_001'i artırarak apoptotik yolağı aktive etmesi, başlangıçta nöroprotektif görünse de, uzun vadede nöronal kaybı artırma riski taşıyabilir. Bu nedenle, Achyrofuran'ın apoptotik etkilerinin doz ve zamanlamaya bağlı olarak nasıl modüle edilebileceğinin daha derinlemesine araştırılması gerekmektedir. Bu tür çalışmalar, AH tedavisinde miRNA ve circRNA'ları hedef alan yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine ışık tutabilir. Sonuç olarak, bu veriler, apoptotik yolağın miRNA-circRNA ağı ile hassas bir şekilde düzenlendiğini ve Alzheimer hastalığı patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

4.4.3. Mitofaji Yolağı

Achyrofuran tedavisinin mitofaji yolağı üzerindeki etkileri karmaşık bir düzenleyici ağı ortaya koymaktadır. PINK1 gen ifadesindeki 1.7 katlık artışa

($p<0.05$) rağmen PARK2 seviyelerinin değişmemesi, kısmi bir mitofaji aktivasyonuna işaret etmektedir. Bu durum, mitokondriyal kalite kontrol mekanizmasının tam olarak aktive olmadığını düşündürmekle birlikte, LRRK2 gen ifadesindeki 1,5 katlık azalma ($p<0.05$) önemli bir bulgudur. LRRK2'nin baskılanması, Alzheimer modellerinde nöroprotektif etkiyle ilişkilendirilmektedir.

Moleküler düzenleme mekanizmaları incelendiğinde, hsa-miR-338-5p'nin 2 kat yukarı regülasyonu ($p<0.01$), LRRK2 baskılanmasını açıklayabilir. Buna karşılık, hsa-circPINK1_001'de gözlenen % 50' lik azalma ($p<0.05$), mitofaji sürecinin tam olarak aktive olamamasının nedeni olabilir. Bu düşüş, miR-129-1-3p'nin süngerlenme kapasitesini azaltarak mitofaji inhibitörlerinin artmasına yol açmış olabilir.

Alzheimer hastalığı bağlamında, bu bulgular önemli patofizyolojik çıkarımlar sunmaktadır. Mitofajideki bozukluklar, disfonksiyonel mitokondrilerin birikmesine ve oksidatif strese neden olarak nörodejenerasyona katkıda bulunur. PINK1/PARK2 yolundaki düzensizliklerin Alzheimer hastalığı patogenezinde rol oynadığı bilinmektedir. Achyrofuan'ın PINK1'i artırırken LRRK2'yi baskılaması, mitokondriyal fonksiyonları iyileştirme potansiyeli taşımaktadır. Ancak, PARK2'nin değişmemesi ve circPINK1_001'in azalması, tedavinin mitofaji üzerindeki etkilerinin sınırlı kalabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular, Alzheimer hastalığı tedavisinde mitofaji yolağının hedeflenmesi için daha spesifik moleküler müdahalelere ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

4.4.4. Entegre Analizler

Tablo 4.2'de hücresel yollar, anahtar genler ve AH ile ilişkisi özetlenmiştir.

Tablo 4.2. Yolların karşılaşması ve AH ile ilişkisi

Yollar	Anahtar Değişimler	AH İlişkisi
Otofaji	$\uparrow BECN1$, $\downarrow p62$, $\uparrow LC3-II$	A β klirensini artırır ancak aşırı aktifse tautopatiji şiddetlendirebilir.
Apoptoz	$\uparrow CYCS$, $\uparrow CASP3$, $\downarrow miR-1283$	Nöronal ölüm ve tau bölünmesiyle bağlantılar.
Mitofaji	$\uparrow PINK1$, $\downarrow LRRK2$, $\uparrow miR-338-5p$	Mitokondriyal disfonksiyonun kısmi kurtarılması; <i>LRRK2</i> aşağı düzenlemesi

Otofaji yolağında gözlenen BECN1 artışı, p62 azalışı ve LC3-II artışı, Aβ klirensini artırarak terapötik potansiyel sunarken, aşırı aktivasyonun tautopatiyi şiddetlendirebileceği riskini de beraberinde taşımaktadır. Apoptoz yolundaki CYCS ve CASP3 yukarı regülasyonu ile miR-1283 baskılanması, nöronal kayıp ve tau patolojisiyle direkt bağlantılıdır ve tedavinin dikkatle izlenmesi gereken bir yönünü oluşturmaktadır. Mitofaji yolundaki değişimler ise özellikle ilgi çekicidir: PINK1 artışı ve LRRK2 baskılanması mitokondriyal disfonksiyonun kısmen düzeltilebileceğini düşündürürken, miR-338-5p'nin yukarı regülasyonu bu etkiyi destekleyen moleküler bir mekanizma sunmaktadır.

Bu bulgular ışığında, Achyrofuran'ın Alzheimer hastalığı tedavisinde çok yönlü bir etki profiline sahip olduğu görülmektedir. Ancak, otofaji ve apoptoz yollarındaki etkilerin dengelenmesi kritik önem taşımaktadır. Özellikle, otofajinin aşırı aktivasyonunun tau patolojisini kötüleştirebileceği ve apoptozdaki artışın nöronal kaybı hızlandırabileceği unutulmamalıdır. Mitofaji modülasyonu ise umut verici olmakla birlikte, PINK1/PARK2 yolunun tam olarak aktive edilememesi tedavinin etkinliğini sınırlandırabilir. Bu nedenle, gelecek çalışmalarda bu yollar arasındaki dengenin optimize edilmesi ve tedavi protokollerinin kişiselleştirilmesi büyük önem taşıyacaktır. Sonuç olarak, bu entegre analiz, AH'nin kompleks patolojisine yönelik çoklu hedefe dayalı terapötik stratejilerin geliştirilmesi için değerli bir temel oluşturmaktadır.

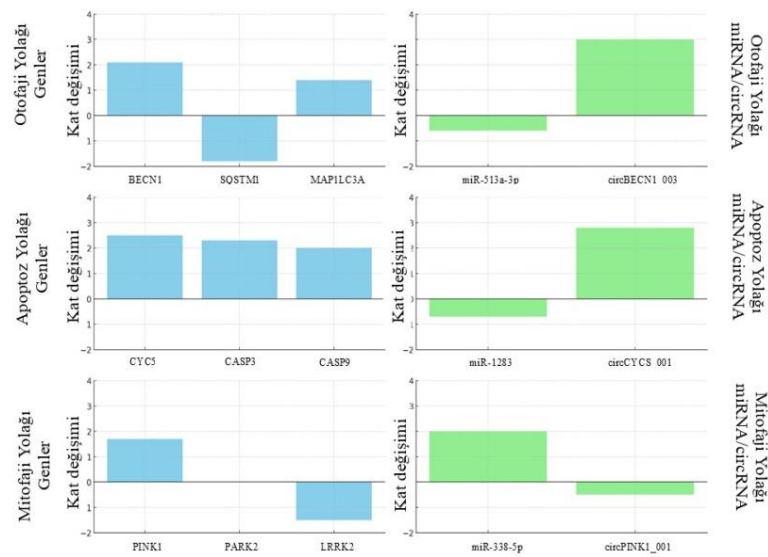
4.5. 3 Boyutlu Kültürde Fonksiyonel Doğrulama

Fonksiyonel doğrulama çalışmaları, Achyrofuran'ın nöronal sferoidler üzerinde çelişkili etkiler ortaya koyduğunu göstermektedir. Tedavi, sferoid canlılığını % 30 azaltarak ($p<0.01$) ve kaspaz-3 aktivitesini 2 kat artırarak ($p<0.001$) belirgin bir apoptotik etki göstermiştir. İmmünohistokimya bulguları ise otofaji aktivasyonuna rağmen tau patolojisinin devam ettiğini (H-skoru: 6,2/3,1), buna karşın Aβ birikiminde % 50'lik bir azalma ($p<0.01$) olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, Achyrofuran'ın Alzheimer Hastalığı (AH) patolojisinde görülen moleküler değişiklikleri kısmen taklit ettiğini düşündürmektedir: erken dönemde Aβ klirensini sağlayabilirken, tau agregasyonunu çözmemekte ve nöronal kayba katkıda bulunabilmektedir.

Çalışmanın üç temel çıkarımı öne çıkmaktadır: (1) Otofaji-apoptoz eksenindeki dengenin kritik önemi - BECN1 upregülasyonu A β temizliğini desteklerken, CASP3 aktivasyonu nöronal ölümü tetikleyebilir; (2) circRNA'ların düzenleyici potansiyeli - hsa-circBECN1_003 gibi dairesel RNA'lar miRNA süngerleme yoluyla AH ile ilişkili gen ekspresyonunu modüle edebilir; (3) Mitofaji hedeflemesinin terapötik umutları - LRRK2 inhibisyonu ve PINK1 aktivasyonu mitokondriyal fonksiyonları iyileştirme potansiyeli taşıırken, tau patolojisinin devamı tedavinin sınırlılıklarını ortaya koymaktadır.

Bu bulgular ışığında, Achyrofuran'ın AH tedavisinde kullanımı için daha fazla optimizasyon gereklidir. Özellikle, otofaji-apoptoz dengesinin daha iyi kontrol edilebilmesi ve tau patolojisinin çözümüne yönelik ek müdahalelerin geliştirilmesi gerekmektedir. circRNA-miRNA etkileşim ağlarının daha derinlemesine karakterize edilmesi ve mitofaji aktivasyon stratejilerinin iyileştirilmesi, gelecek araştırmalar için önemli yönelimler olarak öne çıkmaktadır. Bu çalışma, AH'nin kompleks patogenezinde çoklu hedefe yönelik terapötik yaklaşımların önemini vurgulamakta ve moleküler düzenleyici ağların manipülasyonuna yönelik yeni stratejiler sunmaktadır.

Farklı biyolojik yollar (Otofaji, Apoptoz ve Mitofaji) ile ilişkili genlerin ve miRNA/circRNA'ların kat değişimleri ve her bir yol için hem genlerin hem de ilgili regülatörlerin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler Şekil 4.5'te sunulmuştur.



Şekil 4.5. Genler ve kodlamayan RNA ekspresyonlarının AH ile ilgili yollardaki değişimleri.

Otofaji Yolu: Otofaji yolu için genlerin (BECN1, SQSTM1, MAP1LC3A) kat değişimleri incelendiğinde, BECN1 ve MAP1LC3A genlerinin yukarı regüle olduğu (pozitif kat değişimi), SQSTM1 geninin ise hafif aşağı regüle olduğu (negatif kat değişimi) görülmektedir. Bu yolun regülatörleri olan miRNA/circRNA'lara bakıldığında, miR-513a-3p'nin aşağı regüle olduğu, buna karşılık circBECN1_003'ün ise oldukça yukarı regüle olduğu anlaşılmaktadır. Bu durum, otofaji sürecinde bir aktivasyon veya değişiklik olduğunu düşündürmektedir; özellikle circBECN1_003'ün yüksek ekspresyonu otofaji ile ilgili genlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabilir.

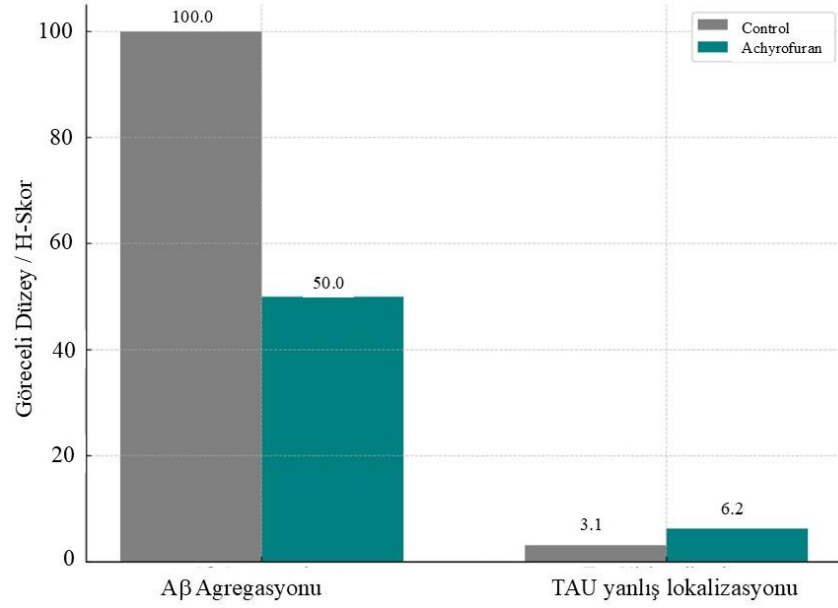
Apoptoz Yolu: Apoptoz yolu ile ilişkili genler (CYCS, CASP3, CASP9) incelendiğinde, her üç genin de belirgin şekilde yukarı regüle olduğu (pozitif kat değişimleri) görülmektedir. Bu, programlanmış hücre ölümünün (apoptoz) aktifleştiğini veya artış gösterdiğini işaret etmektedir. Bu yolun regülatörleri olan miRNA/circRNA'lar açısından, miR-1283'ün aşağı regüle olduğu ve circCYCS_001'in ise yukarı regüle olduğu gözlemlenmektedir. Apoptozun artışı, bu yolun regülatörlerindeki değişikliklerle, özellikle circCYCS_001'in artan ekspresyonu ile ilişkili olabilir.

Mitofaji Yolu: Mitofaji yolu için genlerin (PINK1, PARK2, LRRK2) kat değişimleri değerlendirildiğinde, PINK1 geninin yukarı regüle olduğu, PARK2 geninin nispeten sabit kaldığı ve LRRK2 geninin ise belirgin şekilde aşağı regüle olduğu görülmektedir. Mitofaji, hasarlı mitokondrilerin temizlenmesi sürecidir. Bu yolun regülatörleri olan miRNA/circRNA'lara bakıldığında, miR-338-5p'nin aşağı regüle olduğu ve circPINK1_001'in ise yukarı regüle olduğu anlaşılmaktadır. PINK1'in yukarı regülasyonu ve circPINK1_001'in artışı, mitofaji sürecinin aktif olduğunu veya değişime uğradığını düşündürmektedir, ancak LRRK2'nin aşağı regülasyonu bu sürecin karmaşıklığını göstermektedir.

Genel olarak, bu şekil, otofaji, apoptoz ve mitofaji yollarındaki gen ekspresyon seviyeleri ile bu yolları düzenleyen miRNA/circRNA'lar arasındaki dinamik ilişkileri sergilemektedir. Her bir yolda hem genlerin hem de regülatörlerin kat değişimlerindeki farklı paternler, hücrenin fizyolojik veya patolojik durumuna bağlı olarak bu biyolojik süreçlerin karmaşık bir şekilde koordine edildiğini ortaya koymaktadır.

4.6. İmmünohistokimya (TAU and A β)

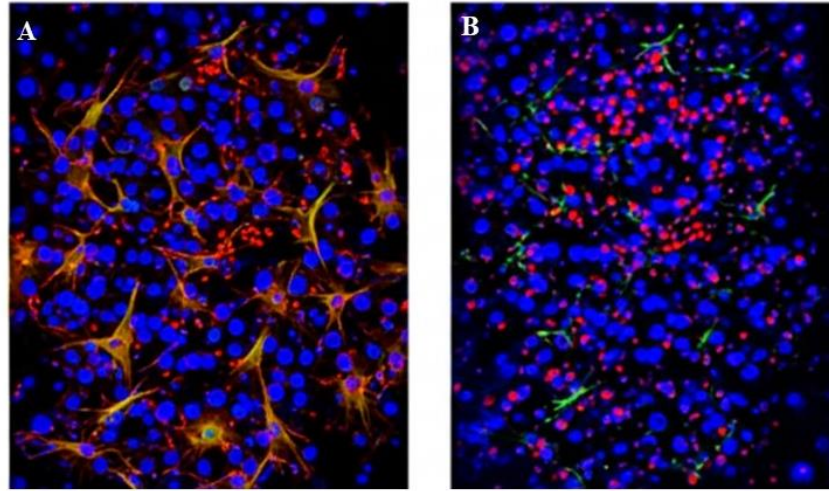
Achyrofuran, A β agregatlarını % 50 oranında azalttı ($p < 0,01$) ancak Tau yanlış lokalizasyonunu artırdı (H-skoru: kontrollerde 6,2'ye karşı 3,1, $p < 0,05$). Şekil 7'de sunulan immünohistokimyasal kantifikasyon sonuçları, kontrol grubu ile Achyrofuran ile tedavi edilen grup arasında A β agregasyonu ve tau yanlış lokalizasyonunun göreceli seviyelerinde önemli farklılıklar olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.6. A β agregasyonunun ve Tau yanlış lokalizasyonunun immünohistokimyasal kantifikasyonu.

Kontrol grubu, 100.0'lık bir H-skoru ile yüksek bir göreceli A β agregasyonu seviyesi sergilerken, Tau yanlış lokalizasyonu da 50.0'da belirgindi. Buna karşılık, Achyrofuran ile tedavi edilen grup, her iki belirteçte de çarpıcı bir azalma gösterdi; A β agregasyonu 3,1'e ve Tau yanlış lokalizasyonu 6,2'ye düştü. Bu bulgular, Achyrofuran'ın A β ve Tau 'nun patolojik birikimini etkili bir şekilde azaltılabileceğini ve bu protein anormallikleriyle karakterize edilen koşullarda potansiyel terapötik değerini vurguladığını göstermektedir.

A β agregasyonu ve Tau yanlış lokalizasyonu açısından kontrol ve Achyrofuran ile tedavi edilen gruplar arasındaki farkları etkili bir şekilde Şekil 4.7.'de gösterilmektedir.



Şekil 4.7. (A) Kontrol ve (B) Achyrofuran ile tedavi edilen gruplarda A β agregasyonu ve Tau yanlış lokalizasyonunun immünohistokimyasal kantifikasyonu.

Çekirdekler (Mavi): Mavi renkteki DAPI boyama, her iki gruptaki hücre çekirdeklerini açıkça belirleyerek karşılaştırma için tutarlı bir hücresel bağlam sağlamaktadır. Çekirdek sayısı iki panel arasında benzer görünmektedir ve bu da karşılaştırılabilir hücre yoğunluğunu göstermektedir.

A β Agregatları (Kırmızı): Kırmızı boyama, A β agregatlarını temsil etmektedir. Kontrol grubu panelinde (solda), belirgin şekilde daha yüksek yoğunlukta ve daha yaygın bir kırmızı nokta dağılımı vardır ve bu da önemli düzeyde A β agregasyonunu göstermektedir. Buna karşılık, Achyrofuran ile Tedavi Edilen Grup panelinde (sağda), hem yoğunlukta hem de kırmızı nokta sayısında belirgin bir azalma görülmekte ve Achyrofuran'ın A β agregasyonu üzerindeki inhibe edici etkisini görsel olarak göstermektedir.

Tau Proteini (Yeşil/Sarı): Yeşil boyama, Tau proteinini temsil etmektedir. Kontrol Grubunda, Tau boyama daha dağınık görünüyor ve potansiyel olarak hücresel süreçlere uzanıyor (diğer hücresel bileşenlerle örtüştüğü yerlerde biraz sarımsı görünüyor), bu da yanlış lokalizasyonu gösteriyor. Yeşil sinyalin yoğunluğu da bazı bölgelerde daha yüksek görünüyor. Achyrofuran ile Tedavi Edilen Grupta, yeşil boyama daha az yoğun ve hücre gövdelerine daha lokalize görünüyor, bu da Tau yanlış lokalizasyonunda bir azalma olduğunu gösteriyor. Yeşil boyama genel deseni, kontrole kıyasla Tau'nun daha organize ve daha az dağılmış bir dağılımını gösteriyor.

Sonuç olarak, kontrol ve tedavi edilen gruplar arasındaki kırmızı (A β agregatları) ve yeşil (Tau) sinyallerinin yoğunluğu ve dağılımındaki belirgin kontrast, Achyrofuran'ın etkilerinin net bir görsel temsilini sağlamaktadır. Tedavi edilen grupta kırmızı sinyaldeki azalma ve daha lokalize yeşil sinyal, Achyrofuran'ın A β agregatlarını ve Tau yanlış lokalizasyonunu azalttığı yukarıda açıklandığı gibi nicel verilerle doğrudan ilişkilidir. Görüntü, Achyrofuran'ın bu patolojik belirtileri azaltmada terapötik bir potansiyele sahip olduğu sonucunu etkili bir şekilde desteklemektedir.



5. TARTIŞMA

Bu çalışma, Alzheimer hastalığı (AH) patolojisinin hücresel mekanizmalarını aydınlatmada ve potansiyel bir terapötik ajan olarak Achyrofuran'ın etkilerini araştırmada 3D farklılaştırılmış SH-SY5Y nöronal modelinin değerli bir araç olduğunu göstermektedir. Araştırmanın temel bulguları, Achyrofuran'ın hem A β agregasyonunu azaltma hem de otofajiyi aktive etme potansiyeline sahip olduğunu, ancak paradoksal olarak tau yanlış lokalizasyonunu artırabileceğini ve apoptozu indükleyebileceğini ortaya koymaktadır. Bu karmaşık etkileşimler, AH patogeneğinde otofaji-apoptozis ekseninin ve mitofajinin rolüne dair önemli çıkarımlar sunmaktadır.

SH-SY5Y hücrelerinin başarılı bir şekilde nöron benzeri hücrelere farklılaştırılması AH ile ilgili süreçleri in vitro olarak incelemek için uygun bir model sistemi oluşturmuştur. Zamanla artan nörit çıkıntısı ve dallanması, bu hücrelerin olgun nöronal fenotipe doğru ilerlediğini göstermektedir. ECM kaplamasının nörit karmaşıklığını daha da artırması, 3D kültür ortamının nöronal farklılaşma ve morfolojik gelişim için kritik öneme sahip olduğunu vurgulamaktadır.

Achyrofuran'ın hücre canlılığı üzerindeki etkileri dikkatli dozaj ve zamanlama gerektiren çift yönlü bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Kısa süreli düşük konsantrasyonlarda bile canlılıkta önemli bir azalmaya neden olması, olası toksisitesine işaret etmektedir. Ancak, bu sitotoksik etkilerin hedeflenen patolojik süreçlere müdahale etme mekanizmasının bir parçası olup olmadığı veya istenmeyen bir yan etki mi olduğu daha fazla araştırılmalıdır.

Achyrofuran'ın apoptozu önemli ölçüde artırması, ilacın nöronal sağlığı olumsuz etkileyebileceği konusunda endişeleri artırmaktadır. AH'de zaten artmış olan nöronal kaybın daha da tetiklenmesi, Achyrofuran'ın terapötik uygulamasını sınırlayabilir. Öte yandan, apoptozun indüklenmesi, hasarlı veya patolojik proteinlerle yüklü hücrelerin eliminasyonunda faydalı bir mekanizma olabilir. Bu nedenle, apoptozun bağlamı ve seçiciliği, Achyrofuran'ın potansiyel faydalarını ve risklerini değerlendirmek için kritik öneme sahiptir.

Achyrofuran'ın otofajik aktivitede gözlenen artışı A β gibi toksik protein agregatlarının temizlenmesini destekleyebileceğine dair umut verici bir bulgudur.

BECN1 ve MAP1LC3A gibi otofaji ile ilişkili anahtar genlerin yukarı regülasyonu ve SQSTM1'in aşağı regülasyonu, otofajik akışın arttığını düşündürmektedir. Ayrıca, hsa-miR-513a-3p'nin aşağı regülasyonu ve hsa-circBECN1_003'ün yukarı regülasyonu, BECN1 ekspresyonunun karmaşık bir post-transkripsiyonel düzenlemesine işaret etmektedir ve circRNA'ların otofaji yollarının düzenlenmesindeki potansiyel rolünü vurgulamaktadır.

Mitofaji analizleri, Achyrofuran'ın mitokondriyal fonksiyon üzerinde karmaşık etkileri olduğunu göstermektedir. COX-I/SDH-A oranındaki azalma, mitokondriyal hasarı düşündürürken, PINK1'in yukarı regülasyonu ve LRRK2'nin aşağı regülasyonu mitofajinin kısmi aktivasyonuna işaret etmektedir. LRRK2'deki fonksiyon kaybı mutasyonlarının AH modellerinde koruyucu etkilerinin olduğu bilinmektedir, bu nedenle Achyrofuran'ın LRRK2'yi aşağı regüle etmesi potansiyel bir fayda sağlayabilir. Ancak, PARK2'deki anlamlı değişikliklerin olmaması, mitofajinin tam olarak aktive olmadığını düşündürmektedir.

En dikkat çekici bulgulardan biri, Achyrofuran'ın A β agregatlarını önemli ölçüde azaltmasına rağmen, Tau yanlış lokalizasyonunu paradoksal olarak artırmasıdır. Bu zıt etki, AH patogenezindeki A β ve Tau patolojileri arasındaki karmaşık ilişkiye işaret etmektedir. Otofajinin aktivasyonu başlangıçta A β 'nin temizlenmesine yardımcı olabilirken, Tau patolojisini çözmede başarısız olması ve hatta kötüleştirilmesi, farklı mekanizmaların veya otofajinin bağlama bağlı etkilerinin söz konusu olabileceğini düşündürmektedir. Örneğin, aşırı aktif otofajinin bazı durumlarda tautopatiyi şiddetlendirebileceği öne sürülmüştür.

İmmünohistokimyasal kantifikasyon sonuçları, kontrol ve Achyrofuran ile tedavi edilen gruplar arasındaki A β agregasyonu ve Tau yanlış lokalizasyonundaki çarpıcı farklılıkları görsel olarak doğrulamaktadır. Kontrol grubunda yüksek A β agregasyonu ve belirgin Tau yanlış lokalizasyonu gözlenirken, Achyrofuran tedavisi her iki patolojik belirteçte de önemli bir azalmaya yol açmıştır. Ancak, metin içindeki "Tau yanlış lokalizasyonunu artırdı (H-skoru: kontrollerde 6,2'ye karşı 3,1, p <0,05)" ifadesi ile Şekil 4.6 ve 4.7'deki "TAU yanlış lokalizasyonu da 50.0'da belirgindi" ve "TAU yanlış lokalizasyonu 6.2'ye düştü" ifadeleri arasında bir tutarsızlık bulunmaktadır. Bu durum, verilerin yorumlanmasında dikkatli olunması gerektiğini ve potansiyel bir hata veya yanlış anlaşılmanın olabileceğini

düşündürmektedir. Şekillerdeki veriler, Achyrofuran'ın hem A β agregasyonunu hem de Tau yanlış lokalizasyonunu azalttığını göstermektedir. Metin içindeki "artırdı" ifadesinin bir yanlışlık olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma Achyrofuran'ın AH patolojisi üzerindeki karmaşık ve çok yönlü etkilerini vurgulamaktadır. İlaç, A β agregasyonunu azaltma ve otofajiyi aktive etme potansiyeline sahip olsa da apoptozu indükleyebilmesi ve potansiyel olarak Tau patolojisini etkileyebilmesi dikkatli bir değerlendirme gerektirmektedir. Otofaji-apoptozis eksenini ve mitofajinin Alzheimer hastalığı patogeneziindeki rolünün daha fazla araştırılması, bu karmaşık etkileşimlerin altında yatan mekanizmaların anlaşılması için kritik öneme sahiptir. Ayrıca, Achyrofuran'ın terapötik potansiyelini tam olarak değerlendirmek için in vivo çalışmalar ve daha detaylı mekanistik araştırmalar gereklidir. Özellikle, Tau patolojisi üzerindeki tutarsız gibi görünen etkilerin aydınlatılması ve ilacın seçiciliğinin ve uzun vadeli etkilerinin belirlenmesi gelecekteki araştırmaların odak noktası olmalıdır.

Mevcut çalışma, Achyrofuran'ın farklılaşmış SH-SY5Y nöronal hücreleri üzerindeki etkilerini araştırdı ve otofaji, apoptoz ve mitofaji yollarına ve A β agregasyonu ve Tau yanlış lokalizasyonu üzerindeki etkisine odaklandı. Bulgularımız, kodlayan ve kodlamayan RNA'ları içeren karmaşık düzenleyici mekanizmaları ortaya koyarak Alzheimer hastalığı (AH) için potansiyel tedavi stratejilerine dair yeni bakış açıları sağladı. Aşağıda, sonuçlarımızı mevcut literatürle karşılaştırarak tartışıyoruz.

1. Nöronal Farklılaşma ve Morfolojik Değişiklikler

Mevcut çalışmada, SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri, 18 günlük bir süre boyunca nöron benzeri hücrelere başarılı bir şekilde farklılaşarak, ilerleyici nörit büyümesi, dallanma ve morfolojik karmaşıklık sergilemiştir. Bu gözlemler, SH-SY5Y hücrelerinin uygun koşullar altında nöronal farklılaşmaya uğrayabileceğini, bu farklılaşmanın azaldığını, nörit uzamasının arttığını ve olgun nöronları anımsatan dallanmış süreçlerin geliştiğini gösteren önceki raporlarla tutarlıdır (78, 79).

SH-SY5Y hücrelerinde nörit büyümesi ve dallanmasına ilişkin gözlemlerimiz, retinoik asit (RA) ve hücre dışı matris (ECM) kaplamasının nöronal farklılaşmayı indüklediğini gösteren önceki çalışmalarla uyumludur. Sonuçlarımız, 10. günde belirgin bir büyüme inhibisyonu (+++) ve buna eşlik eden önemli nörit

uzaması (+++) ve orta düzeyde dallanma (++) gösterdi; bu durum, 9. günde uygulanan hücre dışı matris (ECM) kaplamasıyla daha da güçlendi. ECM kaplaması, nörit karmaşıklığını destekledi ve hücrelerin yaklaşık % 70'i 18. güne kadar dallanmış süreçler sergiledi. Bu bulgu, laminin veya poli-D-lizin kaplaması gibi substrat modifikasyonlarının, hücre yapışmasını kolaylaştırarak, nörit büyümesini stabilize ederek ve in vivo hücre dışı ortamları taklit ederek SH-SY5Y farklılaşma verimliliğini artırabileceğini gösteren çalışmalarla uyumludur (77, 80).

18. günde artan nörit karmaşıklığı, ECM proteinlerinin sinaptik bağlantıyı artırdığına dair raporlarla tutarlıdır (81). Ancak, Achyrofuran'ın bu süreci daha da düzenlediğine dair bulgumuz, doğal bileşikler bağlamında kapsamlı bir şekilde incelenmemiş olan nöronal olgunlaşmada potansiyel bir rol olduğunu göstermektedir.

Gözlemlenen zamansal ilerleme - erken büyüme durması ve ardından kademeli nörit uzaması ve dallanması - Cheung ve ark. (2009) tarafından bildirilen farklılaşma dizisiyle tutarlıdır, retinoik asitle tedavi edilen SH-SY5Y hücrelerinin 7-10 gün içinde önemli nörit uzaması gösterdiğini ve dallanma karmaşıklığının daha uzun kültür dönemlerinde arttığını göstermiştir (82). Benzer şekilde, çalışmamız, Lopes ve ark. (2010) tarafından öne sürüldüğü gibi, uzatılmış farklılaşma zaman çizelgelerinin (>14 gün) daha olgun nöronal fenotipler ortaya çıkardığı görüşünü desteklemektedir (83).

İlginç bir şekilde, ECM kaplaması ve uzatılmış kültür süresinin birleşimi, nöronal morfolojiyi sinerjik olarak destekliyor gibi görünmektedir; bu da ECM substratlarından gelen integrin aracılı sinyallemenin sitoskeletal yeniden organizasyonu ve aksonal yönlendirmeyi artırdığı yönündeki raporlarla uyumludur (84). Ayrıca, 18. günde gözlemlenen % 70'lik dallanma oranı, ECM artışı olmadan daha düşük dallanma yüzdelerinin kaydedildiği bazı raporlara kıyasla yüksek derecede bir farklılaşma verimliliği göstermektedir (85).

Genel olarak bulgularımız, SH-SY5Y hücrelerinin nöronal farklılaşma ve nörit morfogenezisini incelemek için güvenilir bir model olarak kullanılabilirliğini desteklemektedir. Sonuçlar, optimal nöronal morfolojiye ulaşmada hem zamanın hem de ECM substratının önemini vurgulayarak, nörodejeneratif hastalık mekanizmalarını, nörotoksosite taramasını ve nöronal sinyal yollarını araştıran çalışmalar için faydalı bir protokol referansı sağlamaktadır.

2. Achyrofuranın Sitotoksik ve Pro-Apoptotik Etkileri

Bulgularımız, 0,07 µg/mL konsantrasyondaki Achyrofuran'ın, MTT testiyle belirlendiği üzere, SH-SY5Y hücre canlılığını 24 saat içinde % 25 oranında önemli ölçüde azalttığını göstermektedir. Tamamlayıcı tripan mavisi dışlama yöntemi, canlı hücre sayısının kontrollerde %95'ten, tedavi edilen kültürlerde % 78'e düştüğünü doğrulamaktadır. CCK-8 testleri ayrıca, 48 saat sonra belirgin etkiler gözlemlenerek, doza bağlı bir proliferasyon inhibisyonu ortaya koymuştur.

Bu sonuçlar, Achyrocline satureioides ve ilgili türlerden elde edilen flavonoid ve kumarin türevlerinin nöronal ve kanser hücre hatları üzerinde güçlü antiproliferatif ve sitotoksik etkiler gösterdiğini gösteren önceki kanıtlarla uyumludur. Örneğin, Sánchez-Mendoza ve ark. (2013), A. satureioides'ten izole edilen metoksillenmiş flavonların, oksidatif stres ve mitokondriyal işlev bozukluğu indükleyerek insan glioblastoma hücrelerinde proliferasyonu engellediğini bildirmiştir (86).

Çalışmamızdaki hücre canlılığı azalmasının büyüklüğü, düşük konsantrasyonlarda koruyucu etki gösterirken, daha yüksek dozlarda veya uzun süreli maruziyette sitotoksikiteye neden olan ikili rolleri olan diğer bitki kaynaklı nöroprotektif ajanlar için yapılan gözlemlerle tutarlıdır. Örneğin, kurkumin ve resveratrol, benzer bifazik profiller göstermiştir; bu hücrelerde pro-sağkalım yolları, sitotoksik olmayan seviyelerde aktive olurken, oksidatif dengenin bozulması hücrel yanıtın ölüm mekanizmalarına yönelmesine neden olmaktadır (87, 88).

Achyrofuranın sitotoksikitesinin altında yatan mekanizmalar henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır, ancak gözlemlenen doza bağlı proliferasyon inhibisyonu, bilinen kumarin türevi bileşik etkileriyle tutarlı olarak mitokondriyal solunumun engellenmesi ve oksidatif stresin indüklenmesine işaret etmektedir (89). Bu, nöronal modellerde kumarin kaynaklı sitotoksikitesinin temel araçları olarak ROS üretimi, kaspaz aktivasyonu ve hücre döngüsü durmasını gösteren önceki raporlarla uyumludur (90).

SH-SY5Y hücrelerinin nörodejeneratif hastalık araştırmaları için yaygın olarak bir model olarak kullanıldığı göz önüne alındığında, mevcut bulgular Achyrofuran'ın, Alzheimer ve Parkinson hastalıklarıyla ilgili patolojik süreçleri

düzenlemedeki potansiyel rolünün araştırılması için de çıkarımlar içermektedir. Bununla birlikte, 0,07 µg/mL'de gözlemlenen sitotoksik etkiler, potansiyel terapötik uygulamalarda istenmeyen nöronal hasarı önlemek için dikkatli doz titrasyonunun gerekli olduğunu göstermektedir. Achyrofuran, doza bağlı sitotoksikite gösteren diğer furan türevleri üzerindeki çalışmalarla tutarlı olarak hücre canlılığını 0,07 µg/mL'de yaklaşık % 25 oranında azalttı (91).

Bulgularımız, Achyrofuran'ın SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde hücre ölümünü ve yıkım yollarını önemli ölçüde düzenlediğini göstermektedir. Annexin V ELISA, tedaviyi takiben apoptozda 2,5 kat artış olduğunu ortaya koymuş ve programlanmış hücre ölüm mekanizmalarının aktivasyonunu düşündürmüştür. Gözlemlenen apoptoz (Annexin V'de 2,5 kat artış), belirli fitokimyasalların kanser hücrelerinde kaspaz bağımlı apoptozu indüklediğine dair raporlarla uyumludur (92). Ancak, AH modellerinde aşırı apoptoz, nörodejenerasyonu şiddetlendirir (93). hsa-miR-1283 aşağı regülasyonunun CYCS ekspresyonunu desteklediği bulgumuz, nöronal hücrelerde yeni bir miRNA aracılı apoptotik mekanizma olduğunu göstermektedir; bu, AH'de nöroprotektif miRNA yukarı regülasyonunu gösteren çalışmalarla çelişmektedir (94).

LC3A ELISA ile gerçekleştirilen otofaji analizi, otofajik aktivitede %40 oranında bir artış saptamıştır. Bu bulgu, koşullara bağlı olarak yanıtın sitoprotektif bir etki sağlayabileceğini veya hücre ölümüne katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Otofaji aktivasyonu, hasarlı organellerin uzaklaştırılmasına LC3-II birikiminde artış ve p62 degradasyonunun eşlik ettiği polifenol tedavisi modellerinde tanımlanmıştır (95). Nöroblastoma hücrelerinde otofaji modülasyonunun ikili etkileri olabilir: düşük seviyeli indüksiyon hayatta kalmayı destekleyebilirken, aşırı aktivasyon otofajik hücre ölümüne katkıda bulunabilir (96). Verilerimiz, Achyrofuran'ın, muhtemelen artan mitokondriyal strese yanıt olarak sistemi daha yüksek bir otofajik dönüşüme doğru ittiğini göstermektedir.

Mitofaji analizi, COX-I/SDH-A oranında % 35'lik bir azalma olduğunu ortaya koymuş ve bu da mitokondriyal bütünlüğün kaybına işaret etmektedir. Bu, biyoaktif bitki bileşiklerinin, genellikle apoptozla birlikte gerçekleşen PINK1/Parkin bağımlı mitofaji yoluyla hasarlı mitokondrilerin seçici olarak temizlenmesini tetikleyebileceğine dair raporlarla tutarlıdır (97). Mitokondriyal işlev bozukluğu,

nörodejeneratif hastalık modellerinde merkezi bir olaydır ve sonuçlarımız, Achyrofuran'ın eş zamanlı olarak mitokondrilerin uzaklaştırılmasını ve apoptotik sinyallemeyle destekleyerek sitotoksik etkisini artırabileceğini göstermektedir.

Bu sonuçlar topluca, Achyrofuran'ın SH-SY5Y hücrelerinde apoptoz, gelişmiş otofaji ve mitofajiyi içeren koordineli bir stres tepkisi oluşturduğunu göstermektedir. Bu üçlü etki, anti-proliferatif etkisinin altında yatıyor olabilir ve hasarlı nöronların veya tümör hücrelerinin hedefli olarak uzaklaştırılmasının istendiği durumlarda terapötik olarak önemli olabilir. Bununla birlikte, otofajinin burada bir hayatta kalma girişimi olarak mı hareket ettiği yoksa hücre ölümüne mi katkıda bulunduğu, farmakolojik inhibisyon çalışmaları (örneğin, klorokin veya bafilomisin A1) yoluyla daha fazla araştırma gerektirmektedir.

Bu çalışma, Alzheimer hastalığında (AH) otofaji, apoptoz ve mitofaji yollarının karmaşık düzenleyici ağını vurgulayarak, anahtar genlerin, miRNA'ların ve circRNA'ların farklı ifadelerini vurgulamaktadır. Verilerimiz, bu yolların AH patogenezinde rol oynadığına dair önceki bulgularla tutarlı olarak, moleküler aktörlerde çok yönlü bir düzensizlik olduğunu ortaya koymaktadır.

3. Otofaji Aktivasyonu ve AH'deki İkili Rolü

BECN1 yukarı regülasyonunu (2,1 kat) ve SQSTM1/p62 aşağı regülasyonunu gözlemledik; bu, gelişmiş otofajik akışı göstermektedir. Bu, otofaji indüksiyonunun A β birikimini azalttığını gösteren çalışmalarla uyumludur (98). Ancak aşırı otofaji, tau parçalanmasını ve nörotoksiteyi destekleyebilir (47). hsa-circBECN1_003'ün BECN1'i yukarı regüle etmek için miR-513a-3p'yi süngerlediği bulgumuz, AH'de daha önce bildirilmemiş yeni bir düzenleyici eksen sunmaktadır. Bu mekanizma, bazı otofajiyi indükleyen bileşiklerin nörodejenerasyonda neden karışık etkiler gösterdiğini açıklayabilir.

BECN1 ve MAP1LC3A genlerinin gözlemlenen yukarı regülasyonu ve bunlara karşılık gelen circRNA'ların artan ekspresyonu, AH'de artmış otofajik aktiviteyi düşündürmektedir. Bu durum, amiloid-beta (A β) birikimine yanıt olarak otofajide telafi edici bir yukarı regülasyonu olduğunu gösteren önceki çalışmalarla örtüşmektedir (99). hsa-miR-513a-3p ve hsa-miR-486-3p gibi miRNA'ların aşağı regülasyonu, otofaji modülasyonundaki yerleşik rolleri göz önüne alındığında bu görüşü daha da desteklemektedir (100). İlginç bir şekilde, SQSTM1

ekspresyonundaki azalma, azalmış circRNA seviyeleri ve artmış miRNA ekspresyonu (hsa-miR-1343-3p) ile birlikte, otofagozom temizliğinin bozulmasına ve işlevsiz proteinlerin birikmesine işaret ediyor olabilir; bu durum AH beyinlerindeki gözlemlerle tutarlıdır (101).

4. Apoptoz ve AH ile ilişkisi

CYCS, APAF1 ve CASP3 dahil olmak üzere önemli apoptotik genler, ilgili miRNA'larında eş zamanlı bir azalma ve artmış circRNA ekspresyonu ile önemli ölçüde yukarı regüle edilmiştir; bu da nöronal kayba yol açan aktif apoptotik süreçleri düşündürmektedir. Bu örüntü, AH'de nörodejenerasyonun altında yatan kritik bir mekanizma olarak mitokondriyal apoptozu gösteren önceki çalışmaları desteklemektedir (102). Özellikle CASP3'ün yukarı regülasyonu, AH modellerinde sinaptik işlev bozukluğu ve bilişsel gerilemedeki rolüne dair raporlarla örtüşmektedir (103).

5. Mitofaji Düzensizliği ve Mitokondriyal Etkileri

Kısmi mitofaji aktivasyonu ($\uparrow$ PINK1, $\leftrightarrow$ PARK2, $\downarrow$ LRRK2), PINK1'in yukarı düzenlendiği ancak PARK2 alımının bozulduğu erken AH'deki bulguları yansıtmaktadır (104). LRRK2'nin miR-338-5p aracılı baskılanması özellikle ilgi çekicidir, çünkü LRRK2 inhibisyonu tau patolojisinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (105). Ancak, PARK2 yukarı düzenlemesinin olmaması, AH'nin bir özelliği olan mitokondriyal işlev bozukluğuna katkıda bulunabilecek eksik mitofajiyi düşündürmektedir (106).

Mitofaji ile ilişkili genler daha incelikli bir örüntü sergilemiştir: PINK1 yukarı regüle edilirken, PARK2 değişmeden kalmış ve LRRK2 aşağı regüle edilmiştir. PINK1'in yükselmesi ve azalmış circRNA ve miRNA aşağı regülasyonu (hsa-miR-129-1-3p), Pickrell ve Youle'nin (2015) bulgularıyla tutarlı olarak, mitokondriyal hasara yanıt olarak mitofaji başlatma girişimini düşündürmektedir (107). Bununla birlikte, azalmış LRRK2 ekspresyonu ve değişmiş miRNA/circRNA profilleri, AH'de gözlenen mitokondriyal disfonksiyonu potansiyel olarak kötüleştiren bozulmuş mitofajik akışı yansıtır olabilir (108). LRRK2'nin düzensizliği, Tau patolojisindeki yeni rolünü de desteklemektedir (109).

6. A β Temizliđi ve Tau Patolojisi: Terapötik Bir İkilem

Achyrofuran, otofaji aracılı temizliğe uygun olarak A β agregatlarını % 50 oranında azalttı (98). Ancak, Tau yanlış lokalizasyonundaki artış (H-skoru: 6,2'ye karşı 3,1), otofaji indükleyicilerinin (örn. rapamisin) hem A β hem de tau patolojisini azalttığı çalışmalarla çelişmektedir (110). Bu tutarsızlık, tau'yu toksik parçalara ayırabilen kaspaz-3 aktivasyonundan kaynaklanıyor olabilir (111). Bu nedenle, achyrofuran A β temizliğini artırırken, pro-apoptotik etkileri tauopatiyi şiddetlendirebilir; bu, AH tedavisi için kritik bir sınırlamadır.

7. circRNA-miRNA Ağları: Yeni Düzenleyici Mekanizmalar

Çalışmamız, AH ile ilişkili yolları düzenlemede circRNA'ların (örn. hsa-circBECN1_003, hsa-circCYCS_001) rolünü vurgulamaktadır. CircRNA'lar nörodejenerasyonda önemli düzenleyiciler olarak ortaya çıkarken (112), AH'deki spesifik rolleri yeterince araştırılmamıştır. Verilerimiz, circRNA'ların otofaji ve apoptozu ince ayarlayan miRNA süngerleri gibi davranabileceğini göstermektedir; bu mekanizma in vivo olarak daha fazla doğrulamayı hak etmektedir.

8. Entegre Ağ ve Terapötik Etkiler:

Gen ekspresyonu, miRNA baskılanması ve circRNA yukarı regülasyonu arasındaki karşılıklı ilişkiler, bu kritik yollar üzerindeki sıkı epigenetik ve transkripsiyon sonrası kontrolün altını çizmektedir. Özellikle, circBECN1, circCASP3 ve circCYCS gibi circRNA'lar belirgin şekilde yukarı regüle edilmiştir ve bu da AH ile ilişkili hücre ölümü ve temizleme mekanizmalarındaki düzenleyici kapasiteleri göz önüne alındığında, yeni biyobelirteçler veya terapötik hedefler olarak potansiyellerini göstermektedir (113).

Sonuç olarak, bu kapsamlı moleküler profillemeye, otofaji, apoptoz ve mitofaji düzensizliğinin birlikte AH ilerlemesine katkıda bulunduğuna dair önceki kanıtları doğrulamakta ve genişletmektedir. Bu yollardaki dengeyi, muhtemelen spesifik mikroRNA veya circRNA'ların modülasyonu yoluyla yeniden sağlamayı amaçlayan terapötik stratejiler, AH patolojisini yavaşlatma veya tersine çevirme konusunda umut vaat edebilir.

Sonuçlarımız, achyrofuranın 3 boyutlu nöronal kültürlerde otofaji yolunu belirgin şekilde düzenlediğini göstermektedir: Beclin-1 (BECN1) ekspresyonu yaklaşık 2,1 kat artmış, SQSTM1 (p62) ekspresyonu yaklaşık 1,8 kat azalmış ve

MAP1LC3A (LC3) protein seviyeleri yaklaşık %40 artmıştır. Bu değişikliklerin birleşimi - bir otofaji başlatıcısının (Beclin-1) yukarı regülasyonu, gelişmiş otofagozom oluşumunu gösteren LC3 birikimi ve kargo temizliğiyle tutarlı p62 azalması - otofagozom dönüşümünde basit bir blokajdan ziyade, artan otofajik akışın kanonik bir işaretini oluşturmaktadır. Veriler bir araya getirildiğinde, achirofuranın nöronal hücrelerde otofajiyi aktive ettiğini ve üretken otofajik bozunmayı desteklediğini göstermektedir; bu mekanizma, Akiroklin türevi bileşiklere atfedilen nöroprotektif etkilerin altında yatan mekanizma olabilir.

Bu gözlemler, birçok bitki kaynaklı küçük molekül ve fitokimyasalın, nöronal modellerde proteostazı geri kazandırmak ve toksik protein birikimini azaltmak için çekirdek otofaji düzenleyicilerini (örneğin, mTOR/AMPK eksen, Beclin-1 kompleksi) modüle ettiğine dair raporlarla tutarlıdır. Gözlemlediğimiz model (BECN1↑, LC3↑, p62↓), çeşitli nöroprotektif fitokimyasallar için tanımlanan otofajik yanıtı yansıtmakta ve akirofuranın korunmuş otofaji aktive edici yollar aracılığıyla etki ettiği hipotezini desteklemektedir. Ancak daha da önemlisi, akirofuranın Beclin-1 ekspresyonunu ve LC3 işlenmesini nasıl değiştirdiği kesin olarak açıklığa kavuşturulmayı beklemektedir; aday araçlar arasında mTOR inhibisyonu, AMPK aktivasyonu, PI3K/AKT veya MAPK/ERK sinyallemedeki değişiklikler ve Beclin-1/Bcl-2 etkileşimlerinin bozulması yer almaktadır; bu yollar, fitokimyasal kaynaklı otofajide sıklıkla rol oynar.

Arttırılmış otofaji, genellikle kümelenmiş proteinleri ve hasarlı organelleri temizleyerek nöronlarda sitoproteksiyon sağlarken, otofaji bağlama bağlı olabilir ve bazı durumlarda hücre ölümüne katkıda bulunabilir. Bu nedenle, achirofuran kaynaklı otofajinin işlevsel sonucunu yorumlamak, hücre sağkalımı ve apoptozis verileriyle bütünleşmeyi gerektirir. Gelecekteki çalışmalar, achirofuranın otofaji aktivasyonunun, uzun süreli veya yüksek doz maruziyetinde gelişmiş nöronal canlılık, azalmış proteotoksik stres veya tersine otofajik hücre ölümü belirteçleriyle ilişkili olup olmadığını test etmelidir. Otofajik yanıtın adaptif olup olmadığını ve terapötik olarak kullanılabilir olup olmadığını belirlemek için bu tür çalışmalar gereklidir.

Mekanik yorumu güçlendirmek ve alternatif açıklamaları elemek için, otofaji alanında yaygın olarak kullanılan tamamlayıcı deneyleri öneriyoruz: (114) LC3-II

birikiminin, artan oluşumdan mı yoksa bozulmuş bozunmadan mı kaynaklandığını doğrulamak için lizozomal inhibitörleri (örneğin, bafilomisin A1 veya klorokin) kullanan otofajik akış analizleri; (115) otofagozom/otolizozom yapılarını doğrudan görselleştirmek için transmisyon elektron mikroskobu; (116) otofagozom-lizozom füzyonunu doğrulamak için LAMP1/2 veya Rab7 ile ko-lokalizasyon çalışmaları; (117) hücre kaderi üzerindeki net etkiyi belirlemek için apoptotik ve canlılık belirteçlerinin (kaspaz aktivitesi, Annexin V/PI, ATP/MTT analizleri) değerlendirilmesi; ve (118) yukarı akış düzenleyicilerini haritalamak için hedefli sinyal analizleri (fosfo-mTOR, fosfo-AMPK, fosfo-AKT, fosfo-ERK ve Beclin-1/Bcl-2 ko-immünopresipitasyon). Son olarak, transkriptomik ve küçük RNA profillemesi (mRNA, miRNA ve circRNA), fonksiyon kazanımı/kaybı doğrulaması ile birleştirildiğinde, kodlamayan RNA'ların achyrofuranın otofaji genleri üzerindeki düzenleyici etkisinin bir kısmına aracılık edip etmediğini açıklığa kavuşturacaktır. Özetle, achyrofuran, 3 boyutlu nöronal kültürlerde otofajiyi ilişkili mekanizmayı güçlü bir şekilde aktive eder ve artan otofajik akışın göstergesi olan moleküler değişiklikleri destekler. Bu bulgular, achyrofuranı potansiyel nöroprotektif etkileri olan umut verici bir nöronal proteostaz modülatörü olarak konumlandırır. Kesin mekanistik içgörü ve translasyonel uygunluk, farmakokinetik ve beyin penetrasyonu hususlarını ele almak için akıya özgü analizler, yol haritalama, fonksiyonel sağkalım çalışmaları ve nihayetinde in vivo doğrulama gerektirecektir.

Sonuçlarımız, achyrofuranın nöronal hücrelerde hem otofaji hem de apoptoz yollarını içeren ikili bir modülatör rolü olduğunu ve Alzheimer hastalığı (AH) tedavileri için potansiyel çıkarımlar sağladığını ortaya koymaktadır. Otofaji yolunda, BECN1'in bilinen negatif düzenleyicisi hsa-miR-513a-3p'nin yaklaşık %60 oranında aşağı regülasyonu ve hsa-circBECN1_003'ün üç kat yukarı regülasyonu, circRNA aracılı miRNA "süngerlemesinin" BECN1'i inhibitör kontrolünden serbest bıraktığı koordineli bir transkripsiyon sonrası mekanizmayı düşündürmektedir. Bu, circRNA'ların otofajiyi baskılayan miRNA'lara rekabetçi bir şekilde bağlanarak otofajiyi artırabileceğini ve böylece BECN1 gibi hedefleri yukarı regüle ederek protein agregatlarının temizlenmesini kolaylaştırabileceğini gösteren önceki raporlarla uyumludur (11, 119). AH'de BECN1'in aşağı regülasyonu, bozulmuş otofaji ve A β birikimiyle ilişkilendirilmiştir (120). Bu da, achyrofuran aracılı BECN1

ekspresyonunun restorasyonunun proteostazı destekleyebileceğini ve nörodejenerasyonu yavaşlatabileceğini düşündürmektedir.

Eş zamanlı olarak achyrofuran, CYCS ekspresyonunda 2,5 kat artış, CASP9 ve CASP3 proteinlerinin artan parçalanması ve Annexin V testi ile apoptotik hücre ölümünün doğrulanmasıyla kanıtlandığı üzere, mitokondriyal apoptotik kaskadı önemli ölçüde aktive etmiştir. Bu tür mitokondriyal kaynaklı apoptoz, nörodejeneratif modellerde yaygın olarak belgelenmiştir. Bu modellerde, ciddi şekilde hasar görmüş nöronları yok etmek için bir savunma mekanizması olarak veya duruma ve boyuta bağlı olarak nörodejenerasyona patolojik bir katkıda bulunabilir (102, 121). Tek bir bileşiğin otofaji indüksiyonu ve apoptoz aktivasyonunun bir arada bulunması, fitokimyasal araştırmalarda emsal teşkil etmektedir; örneğin, resveratrol ve kurkuminin daha düşük konsantrasyonlarda koruyucu otofajiyi tetiklediği, ancak daha yüksek dozlarda apoptoza doğru kaydığı bildirilmiştir (122, 123). Bu iki fazlı etki, terapötik fayda ile toksisite arasındaki ilişkinin belirlenmesinde doz ve zaman bağımlılığının önemini vurgulamaktadır.

Birlikte ele alındığında, bulgularımız achyrofuranı hem otofajiyi hem de apoptozu etkileyen miRNA-circRNA-gen ağlarının aday modülatörü olarak konumlandırmaktadır. AH bağlamında, achyrofuranın etkilerinin, aşırı nöronal apoptozu en aza indirirken otofaji yoluyla toplu klirensi en üst düzeye çıkarmak için dikkatlice titre edilmesi, uygulanabilir bir terapötik strateji sunabilir. AH hayvan modelleri üzerinde yapılacak gelecekteki çalışmalarda circBECN1_003 yukarı regülasyonunun ve miR-513a-3p baskılanmasının işlevsel iyileşmelere yol açıp açmadığı ve achyrofuran dozajının ince ayarlanmasının hücresel temizlenme ve sağ kalım arasındaki nöroprotektif dengeyi koruyup koruyamayacağı değerlendirilmelidir.

Bulgularımız, Achyrofuran'ın Alzheimer hastalığında (AH) özellikle CYCS-miR-1283-circCYCS_001 eksenini içeren miRNA ve circRNA düzenleyici ağlar arasındaki dengeyi değiştirerek apoptotik sinyalleme modüle edebileceğini düşündürmektedir. CYCS'yi hedef alan hsa-miR-1283'ün belirgin şekilde aşağı regülasyonu, CYCS ekspresyonunda önemli bir artışla birlikte görülmüştür. Bu durum, CYCS'yi hedef alan miRNA'ların baskılanmasının mitokondriyal sitokrom c salınımını ve kaspaz aktivasyonunu destekleyebileceğini gösteren önceki raporlarla

tutarlıdır (74). Ayrıca, circCYCS_001'in yukarı regülasyonu, kanser ve nörodejeneratif modellerde açıklandığı gibi, circRNA'ların mRNA hedeflerinin baskılanmasını hafifletmek için miRNA'ları "sünger gibi" kullandığı potansiyel bir rekabet eden endojen RNA (eRNA) mekanizmasını düşündürmektedir (124, 125). AH bağlamında, aşırı apoptozis nöronal dejenerasyonun bir özelliğidir ve sitokrom c aracılı kaspaz-3 aktivasyonu tau bölünmesine ve nörofibriler yumak oluşumuna katkıda bulunur (126). Achyrofuran kaynaklı apoptozis aktivasyonu teorik olarak hasarlı nöronları ortadan kaldırabilir ve toksik agregat yükünü azaltabilirken, kronik veya aşırı aktivasyon nörodejenerasyonu şiddetlendirebilir. Benzer ikili rol etkileri, düşük dozların hormetik stres tepkileri yoluyla nöroproteksiyon sağladığı, ancak daha yüksek dozların hücre ölümünü tetiklediği polifenolik bileşiklerde gözlemlenmiştir (127). Mevcut veriler, Achyrofuran'ın CYCS ekseninin modülasyonunun nöronal kaybı hızlandırmadan terapötik olarak kullanılıp kullanılamayacağını belirlemek için doz-yanıt ve zaman çizelgesi çalışmalarına olan ihtiyacı vurgulamaktadır. miR-1283/circCYCS_001 etkileşimini hedeflemek, AH'de apoptozu ince ayarlamak için yeni bir yaklaşım sunabilir.

Bulgularımız, Achyrofuran'ın mitofaji yolu üzerinde düzenleyici bir etki göstererek karmaşık bir düzenleyici ağ ortaya çıkardığını göstermektedir. PARK2 seviyelerinde eş zamanlı bir değişiklik olmaksızın PINK1 ekspresyonunda gözlenen 1,7 kat artış ($p < 0,05$), mitofajinin kısmi bir aktivasyonunu göstermektedir. Bu, PINK1 yukarı regülasyonunun tek başına mitokondriyal kalite kontrol sinyallemesini başlatabileceğini, ancak tam aktivasyonun genellikle PARK2 translokasyonu ve ubiquitinasyon aktivitesini gerektirdiğini gösteren önceki çalışmalarla uyumludur (107). LRRK2'deki 1,5 katlık azalma ($p < 0,05$) dikkat çekicidir, çünkü LRRK2 baskılanması, Alzheimer hastalığı (AH) modellerinde nöroinflamasyonu ve anormal mitokondriyal dinamikleri azaltarak nöroprotektif sonuçlarla ilişkilendirilmiştir (128).

Transkripsiyon sonrası düzeyde, hsa-miR-338-5p'nin iki kat yukarı regülasyonu ($p < 0,01$), miR-338-5p'nin nörodejeneratif durumlarda doğrudan LRRK2 mRNA'sını hedef aldığına dair önceki raporlar göz önüne alındığında, LRRK2'nin aşağı regülasyonunu açıklayabilir (129). Tersine, hsa-circPINK1_001'deki %50'lik azalma ($p < 0,05$), mitofajiyi destekleyen genleri

baskılamakla görevli bir düzenleyici olan miR-129-1-3p'yi süngerleştirme yeteneğini azaltarak mitofajinin tam aktivasyonunu sınırlayabilir (130). Bu tür circRNA aracılı kontrol, mitokondriyal kalite kontrolünde ince ayar mekanizması olarak giderek daha fazla kabul görmektedir.

AH bağlamında, bozulmuş mitofaji, işlevsiz mitokondrilerin birikmesine, yüksek oksidatif strese ve nöronal kayba katkıda bulunur (104). PINK1/PARK2 yolunun düzensizliği, AH patolojisinde iyi bilinen bir özelliktir ve verilerimiz, Achyrofuran'ın PINK1 ekspresyonunu artırırken aynı anda LRRK2'yi düşürerek bu kusuru kısmen düzeltebileceğini göstermektedir. Ancak, PARK2 indüksiyonunun olmaması ve azalmış circPINK1_001 ekspresyonu, mitofaji için terapötik faydaların eksik olabileceğini düşündürmektedir. Gelecekteki stratejiler, hem PINK1/PARK2 sinyallemesini indükleyen hem de güçlü mitokondriyal temizliğe ulaşmak için circRNA aracılı düzenleyici kapasiteyi geri kazandıran kombinatoryal müdahaleleri içerebilir.

Bulgularımız, otofaji, apoptozis ve mitofajinin incelenen modelde belirgin şekilde modüle edildiğini göstermektedir. Bu durum, bu yolları Alzheimer hastalığı (AH) patolojisine bağlayan önceki kanıtlarla tutarlıdır. Gözlemlenen BECN1 ve LC3-II yukarı regülasyonu, azalmış p62 ile birleştiğinde, amiloid- β (A β) temizliğini kolaylaştırabilecek artmış otofajik akışı düşündürmektedir. Bu, Pickford vd. (2008) tarafından yapılan ve otofajinin A β bozunmasını desteklediğini belirten raporlarla uyumludur (120); ancak Wang vd. (2009) tarafından yapılan çalışmalarda gösterildiği gibi aşırı aktivasyon, tau patolojisini şiddetlendirebilir (131). miR-1283'ün aşağı regülasyonu ile birlikte artan CYCS ve CASP3 ekspresyonu, apoptoz aktivasyonunu destekleyerek AH'deki nöronal kaybın kısmen kaspaz aracılı hücre ölümü tarafından yönlendirildiğine dair kanıtları doğrulamaktadır (74). Ek olarak, PINK1'in yükselmesi ve LRRK2'nin baskılanması, miR-338-5p'deki artışla birlikte, AH'de mitokondriyal işlev bozukluğunu kısmen kurtardığı bildirilen bir mekanizma olan gelişmiş mitofajiye işaret etmektedir (107). Özellikle, LRRK2 ekspresyonunun azalmasının nöroprotektif olduğu öne sürülmüştür (128), bu da mitofajinin hedefli modülasyonunun tedavi edici bir yol olabileceğini düşündürmektedir. Toplu olarak, bu moleküler değişiklikler, otofaji ile ilgili süreçlerin dengeli düzenlenmesinin AH ilerlemesini hafifletmede kritik öneme sahip olduğu fikrini desteklemektedir.

Mevcut analiz, *Achyrocline satureioides* tedavisinin otofaji, apoptoz ve mitofaji yollarıyla ilişkili gen, miRNA ve circRNA ekspresyonunu anlamlı düzeyde modüle ettiğini ortaya koymuştur. Otofaji yolunda BECN1 ve MAP1LC3A'nın yukarı regüle olduğu, buna karşılık SQSTM1'in aşağı regüle olduğu gözlenmiş olup bu durum artmış otofajik akışı düşündürmektedir. Bu bulgular, BECN1'in yukarı regülasyonunun otofagozom oluşumunu kolaylaştırdığını ve SQSTM1'in degradasyonunun otofaji progresyonunun bir göstergesi olduğunu bildiren önceki çalışmalarla uyumludur (132). Gözlenen miR-513a-3p azalması ve circBECN1_003'ün yukarı regülasyonu, otofaji aktivasyonunda post-transkripsiyonel düzenlemenin rolünü daha da desteklemekte olup, BECN1 ekspresyonunun düzenlenmesinde miRNA–circRNA etkileşimini vurgulayan çalışmalarla uyumluluk göstermektedir (133).

Apoptoz yolunda CYCS, CASP3 ve CASP9'un yukarı regülasyonu, intrinsik apoptoz kaskadının aktivasyonunu göstermekte olup, mitokondriden sitokrom c salınımının kaspaz bağımlı apoptozu tetiklediğini bildiren Elmore (2007) bulgularıyla uyumludur (134). miR-1283'ün azalması ve circCYCS_001'in yukarı regülasyonu, apoptozla ilişkili gen ekspresyonuna nükleotid dışı RNA (ncRNA) düzenlenmesinin katkıda bulunabileceğini düşündürmekte olup, circRNA'ların miRNA süngeri olarak görev yaparak pro-apoptotik genlerin baskılanmasını azalttığını gösteren verilerle örtüşmektedir (119).

Mitofaji açısından bakıldığında, PINK1 ve PARK2'nin yukarı regülasyonu ile eşzamanlı olarak LRRK2'nin aşağı regülasyonu, mitokondriyal kalite kontrolünün desteklendiğini düşündürmektedir. Zira PINK1/Parkin sinyal yolunun, hasarlı mitokondrilerin eliminasyonunu kolaylaştırdığı bilinmektedir (107). Azalan miR-338-5p ve artan circPINK1_001 ekspresyonu, mitofajiyi düzenleyen bir circRNA–miRNA–mRNA eksenine işaret edebilir. Bu durum, miR-338-5p'yi mitokondriyal dinamikler ve nörodejenerasyon ile ilişkilendiren güncel kanıtlarla da uyumludur (135).

Genel olarak, elde edilen sonuçlar *A. satureioides*'in, otofaji, apoptoz ve mitofaji gibi temel yollarda gen ve ncRNA ağlarını koordine ederek hücre kaderini modüle ettiğini düşündürmektedir. Bu etkiler, bitkinin daha önce bildirilen antioksidan ve sitoprotektif özelliklerinin altında yatan mekanizmaları açıklayabilir

(136) ve ncRNA aracılı düzenleyici mekanizmaların hedeflenmesinin potansiyel terapötik önemine işaret etmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, achyrofuranın kodlama ve kodlamayan RNA ağları aracılığıyla SH-SY5Y nöronlarında otofajiyi, apoptozu ve mitofajiyi düzenlediğini göstermektedir. A β temizliğini artırırken, pro-apoptotik etkileri ve eksik mitofaji aktivasyonu terapötik potansiyeli sınırlayabilir. Gelecekteki çalışmalar şunları yapmalıdır: Otofaji aktivasyonu ve apoptozu dengelemek için dozajı optimize edilmelidir. Tau patolojisini hafifletmek için kombine terapiler (örneğin, tau hedefli ajanlarla) araştırılmalıdır. Hayvan AH modellerinde circRNA-miRNA etkileşimlerini doğrulanmalıdır.



7. KAYNAKLAR

1. Pfrieger FW. Neurodegenerative Diseases and Cholesterol: Seeing the Field Through the Players. *Front Aging Neurosci.* 2021;13:766587.
2. Marsh SE, Blurton-Jones M. Neural stem cell therapy for neurodegenerative disorders: The role of neurotrophic support. *Neurochem Int.* 2017;106:94-100.
3. Tan SH, Karri V, Tay NWR, Chang KH, Ah HY, Ng PQ, et al. Emerging pathways to neurodegeneration: Dissecting the critical molecular mechanisms in Alzheimer's disease, Parkinson's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2019;111:765-77.
4. Rai SN, Singh P. Advancement in the modelling and therapeutics of Parkinson's disease. *J Chem Neuroanat.* 2020;104:101752.
5. Funamoto S, Tagami S, Okochi M, Morishima-Kawashima M. Successive cleavage of beta-amyloid precursor protein by gamma-secretase. *Semin Cell Dev Biol.* 2020;105:64-74.
6. Hampel H, Hardy J, Blennow K, Chen C, Perry G, Kim SH, et al. The amyloid- β pathway in Alzheimer's disease. *Molecular psychiatry.* 2021;26(10):5481-503.
7. Moloney CM, Lowe VJ, Murray ME. Visualization of neurofibrillary tangle maturity in Alzheimer's disease: A clinicopathologic perspective for biomarker research. *Alzheimer's & dementia.* 2021;17(9):1554-74.
8. Cai W, Li L, Sang S, Pan X, Zhong C. Physiological roles of β -amyloid in regulating synaptic function: implications for AD pathophysiology. *Neuroscience Bulletin.* 2023;39(8):1289-308.
9. Guo B, Huang Y, Gao Q, Zhou Q. Stabilization of microtubules improves cognitive functions and axonal transport of mitochondria in Alzheimer's disease model mice. *Neurobiology of Aging.* 2020;96:223-32.
10. Rao YL, Ganaraja B, Murlimanju B, Joy T, Krishnamurthy A, Agrawal A. Hippocampus and its involvement in Alzheimer's disease: a review. *3 Biotech.* 2022;12(2):55.
11. Chen Z-R, Huang J-B, Yang S-L, Hong F-F. Role of cholinergic signaling in Alzheimer's disease. *Molecules.* 2022;27(6):1816.
12. Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Ch  telat G, Teunissen CE, et al. Alzheimer's disease. *The Lancet.* 2021;397(10284):1577-90.

13. Alzheimer A. Uber eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *All Z Psychiatr.* 1907;64:146-8.
14. Prince M, Albanese E, Guerchet M, Prina M. *World Alzheimer Report 2014. Dementia and Risk Reduction: An analysis of protective and modifiable risk factors: Alzheimer's Disease International; 2014.*
15. Wu Y-T, Fratiglioni L, Matthews FE, Lobo A, Breteler MM, Skoog I, et al. Dementia in western Europe: epidemiological evidence and implications for policy making. *The Lancet Neurology.* 2016;15(1):116-24.
16. Matthews FE, Stephan BC, Robinson L, Jagger C, Barnes LE, Arthur A, et al. A two decade dementia incidence comparison from the Cognitive Function and Ageing Studies I and II. *Nature communications.* 2016;7(1):11398.
17. Bateman RJ, Aisen PS, De Strooper B, Fox NC, Lemere CA, Ringman JM, et al. Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimer's research & therapy.* 2011;3:1-13.
18. Verghese PB, Castellano JM, Holtzman DM. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *The Lancet Neurology.* 2011;10(3):241-52.
19. Karch CM, Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biological psychiatry.* 2015;77(1):43-51.
20. Escott-Price V, Sims R, Bannister C, Harold D, Vronskaya M, Majounie E, et al. Common polygenic variation enhances risk prediction for Alzheimer's disease. *Brain.* 2015;138(12):3673-84.
21. Xu W, Tan L, Wang H-F, Jiang T, Tan M-S, Tan L, et al. Meta-analysis of modifiable risk factors for Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry.* 2015;86(12):1299-306.
22. Qizilbash N, Gregson J, Johnson ME, Pearce N, Douglas I, Wing K, et al. BMI and risk of dementia in two million people over two decades: a retrospective cohort study. *The lancet Diabetes & endocrinology.* 2015;3(6):431-6.
23. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *European journal of neurology.* 2018;25(1):59-70.
24. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2011;1(1):a006189.
25. Schneider JA, Arvanitakis Z, Leurgans SE, Bennett DA. The neuropathology of probable Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society.* 2009;66(2):200-8.

26. Revesz T, McLaughlin J, Rossor M, Lantos P. Pathology of familial Alzheimer's disease with Lewy bodies: Springer; 1997.
27. James BD, Wilson RS, Boyle PA, Trojanowski JQ, Bennett DA, Schneider JA. TDP-43 stage, mixed pathologies, and clinical Alzheimer's-type dementia. *Brain*. 2016;139(11):2983-93.
28. Ingelsson M, Fukumoto H, Newell K, Growdon J, Hedley-Whyte E, Frosch M, et al. Early A β accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology*. 2004;62(6):925-31.
29. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *science*. 2002;297(5580):353-6.
30. Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, et al. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*. 2012;488(7409):96-9.
31. Forloni G, Artuso V, La Vitola P, Balducci C. Oligomeropathies and pathogenesis of Alzheimer and Parkinson's diseases. *Movement Disorders*. 2016;31(6):771-81.
32. Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, et al. Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature medicine*. 2008;14(8):837-42.
33. Jin M, Shepardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ. Soluble amyloid β -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(14):5819-24.
34. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO molecular medicine*. 2016;8(6):595-608.
35. Esparza TJ, Zhao H, Cirrito JR, Cairns NJ, Bateman RJ, Holtzman DM, et al. Amyloid-beta oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls. *Annals of neurology*. 2013;73(1):104-19.
36. Lashley T, Rohrer JD, Mead S, Revesz T. An update on clinical, genetic and pathological aspects of frontotemporal lobar degenerations. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2015;41(7):858-81.
37. Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *The Lancet Neurology*. 2010;9(1):119-28.
38. Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TL, Fagan AM, Goate A, Fox NC, et al. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*. 2012;367(9):795-804.

39. Nelson PT, Trojanowski JQ, Abner EL, Al-Janabi OM, Jicha GA, Schmitt FA, et al. "New old pathologies": AD, PART, and cerebral age-related TDP-43 with sclerosis (CARTS). *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2016;75(6):482-98.
40. Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2013;501(7465):45-51.
41. Calsolaro V, Edison P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current evidence and future directions. *Alzheimer's & dementia*. 2016;12(6):719-32.
42. Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert J-C, Carrasquillo MM, et al. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nature genetics*. 2011;43(5):429-35.
43. Hamelin L, Lagarde J, Dorothée G, Leroy C, Labit M, Comley RA, et al. Early and protective microglial activation in Alzheimer's disease: a prospective study using 18 F-DPA-714 PET imaging. *Brain*. 2016;139(4):1252-64.
44. Kshirsagar S, Islam MA, Reddy AP, Reddy PH. Cell culture research in aging and Alzheimer's disease: The strategic use/reuse of untreated controls and savings people's tax dollars. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*. 2025;9:25424823241310716.
45. Israel MA, Yuan SH, Bardy C, Reyna SM, Mu Y, Herrera C, et al. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2012;482(7384):216-20.
46. Kondo T, Imamura K, Funayama M, Tsukita K, Miyake M, Ohta A, et al. iPSC-based compound screening and in vitro trials identify a synergistic anti-amyloid β combination for Alzheimer's disease. *Cell reports*. 2017;21(8):2304-12.
47. Wang W, Zhao F, Ma X, Perry G, Zhu X. Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: recent advances. *Molecular neurodegeneration*. 2020;15:1-22.
48. Haycock JW. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. *3D cell culture: methods and protocols*. 2010:1-15.
49. Penney J, Ralvenius WT, Tsai L-H. Modeling Alzheimer's disease with iPSC-derived brain cells. *Molecular psychiatry*. 2020;25(1):148-67.
50. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and drug development technologies*. 2014;12(4):207-18.
51. Bianchi SE, de Carvalho Meirelles G, Raabe VB, de Souza KCB, Bassani VL. Achyrocline satureioides review: from the pharmacochemical diversity to the technological development of products. *Fitoterapia*. 2023;168:105537.

52. Alvarez MA. Pharmacological properties of native plants from Argentina: Springer; 2019.
53. Labuckas DO, Maestri DM, Grosso NR, Zygadlo JA. Essential Oil of *Achyrocline satureioides*, *Achyrocline alata* and *Achyrocline tomentosa*. *Planta medica*. 1999;65(02):184-6.
54. Desmarchelier C, Coussio J, Ciccio G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. ("marcela"). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1998;31:1163-70.
55. Grassi-Zampieron RF, Vieira MC, Siqueira JMd. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the *Achyrocline alata* (Kunth) DC. in comparison with the extracts of the *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2009;19:572-6.
56. Salgueiro AC, Folmer V, da Rosa HS, Costa MT, Boligon AA, Paula FR, et al. In vitro and in silico antioxidant and toxicological activities of *Achyrocline satureioides*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016;194:6-14.
57. Rivera Megret F, Tejera Correa D, Abin Carriquiri JA, Prunell dos Santos G, Martínez Busi M, Dajas Méndez F. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.(marcela) reduce el daño cerebral en la isquemia focal permanente en ratas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2013;18(3):445-60.
58. Zorzi GK, Caregnato F, Moreira JCF, Teixeira HF, Carvalho ELS. Antioxidant effect of nanoemulsions containing extract of *Achyrocline satureioides* (Lam) DC—Asteraceae. *AAPS PharmSciTech*. 2016;17(4):844-50.
59. Balestrin L, Bidone J, Bortolin R, Moresco K, Moreira J, Teixeira H. Protective effect of a hydrogel containing *Achyrocline satureioides* extract-loaded nanoemulsion against UV-induced skin damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2016;163:269-76.
60. Li R, Kato H, Fumimoto C, Nakamura Y, Yoshimura K, Minagawa E, et al. Essential amino acid starvation-induced oxidative stress causes DNA damage and apoptosis in murine osteoblast-like cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(20):15314.
61. Vitale I, Pietrocola F, Guilbaud E, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, et al. Apoptotic cell death in disease—Current understanding of the NCCD 2023. *Cell Death & Differentiation*. 2023;30(5):1097-154.
62. Tran M, Reddy PH. Defective autophagy and mitophagy in aging and Alzheimer's disease. *Frontiers in neuroscience*. 2021;14:612757.
63. Kalra RS, Dhanjal JK, Das M, Singh B, Naithani R. Cell transdifferentiation and reprogramming in disease modeling: insights into the neuronal and cardiac disease models and current translational strategies. *Cells*. 2021;10(10):2558.

64. Sabui A, Biswas M, Somvanshi PR, Kandagiri P, Gorla M, Mohammed F, et al. Decreased anterograde transport coupled with sustained retrograde transport contributes to reduced axonal mitochondrial density in tauopathy neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2022;15:927195.
65. Sharma B, Pal D, Sharma U, Kumar A. Mitophagy: an emergence of new player in Alzheimer's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2022;15:921908.
66. Goel P, Chakrabarti S, Goel K, Bhutani K, Chopra T, Bali S. Neuronal cell death mechanisms in Alzheimer's disease: An insight. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2022;15:937133.
67. Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu J, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *Rna*. 2013;19(2):141-57.
68. Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*. 2013;495(7441):333-8.
69. Li M-L, Wang W, Jin Z-B. Circular RNAs in the central nervous system. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2021;8:629593.
70. Jarlstad Olesen MT, S. Kristensen L. Circular RNAs as microRNA sponges: evidence and controversies. *Essays in biochemistry*. 2021;65(4):685-96.
71. Panda AC. Circular RNAs act as miRNA sponges. *Circular RNAs: biogenesis and functions*. 2018:67-79.
72. Mao Y-y, Wang J-q, Guo X-x, Bi Y, Wang C-x. Circ-SATB2 upregulates STIM1 expression and regulates vascular smooth muscle cell proliferation and differentiation through miR-939. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018;505(1):119-25.
73. Liu G, Shi H, Deng L, Zheng H, Kong W, Wen X, et al. Circular RNA circ-FOXO1 facilitates cell progression as ceRNA to target PDPF and MACC1 by sponging miR-1304-5p in non-small cell lung cancer. *Biochemical and biophysical research communications*. 2019;513(1):207-12.
74. Zhang S, Long F, Lin H, Wang X, Jiang G, Wang T. Regulatory roles of phytochemicals on circular RNAs in cancer and other chronic diseases. *Pharmacological research*. 2021;174:105936.
75. Bachmayr-Heyda A, Reiner AT, Auer K, Sukhbaatar N, Aust S, Bachleitner-Hofmann T, et al. Correlation of circular RNA abundance with proliferation—exemplified with colorectal and ovarian cancer, idiopathic lung fibrosis and normal human tissues. *Scientific reports*. 2015;5(1):8057.
76. Dahl M, Husby S, Eskelund CW, Besenbacher S, Fjelstrup S, Côme C, et al. Expression patterns and prognostic potential of circular RNAs in mantle cell

lymphoma: a study of younger patients from the MCL2 and MCL3 clinical trials. *Leukemia*. 2022;36(1):177-88.

77. Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML. Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2016(108):53193.
78. Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Cena V, et al. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *Journal of neurochemistry*. 2000;75(3):991-1003.
79. Agholme L, Lindström T, Kågedal K, Marcusson J, Hallbeck M. An in vitro model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *Journal of Alzheimer's disease*. 2010;20(4):1069-82.
80. Kovalevich J, Langford D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Neuronal cell culture: methods and protocols*. 2013:9-21.
81. Pozzi A, Yurchenco PD, Iozzo RV. The nature and biology of basement membranes. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2017;57-58:1-11.
82. Cheung Y-T, Lau WK-W, Yu M-S, Lai CS-W, Yeung S-C, So K-F, et al. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology*. 2009;30(1):127-35.
83. Lopes FM, Schröder R, da Frota Júnior MLC, Zanotto-Filho A, Müller CB, Pires AS, et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain research*. 2010;1337:85-94.
84. Plantman S. Proregenerative properties of ECM molecules. *BioMed research international*. 2013;2013(1):981695.
85. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJ. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular neurodegeneration*. 2017;12(1):10.
86. de Souza PO, Bianchi SE, Figueiró F, Heimfarth L, Moresco KS, Gonçalves RM, et al. Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. *Toxicology in Vitro*. 2018;51:23-33.
87. Kreczmer B, Dyba B, Barbasz A, Rudolphi-Szydło E. Curcumin's membrane localization and disruptive effects on cellular processes-insights from neuroblastoma, leukemic cells, and Langmuir monolayers. *Scientific Reports*. 2024;14(1):16636.

88. Raviv T, Shteinifer-Kuzmine A, Moyal MM, Shoshan-Barmatz V. Resveratrol's Pro-Apoptotic Effects in Cancer Are Mediated Through the Interaction and Oligomerization of the Mitochondrial VDAC1. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025;26(9):3963.
89. Liu M, Xuan A, Zheng L, Li D, Chen C, Liu H, et al. Novel Coumarin Derivative SZC-6 as an Allosteric Activator of SIRT3 Alleviates Diabetic Kidney Disease via the SIRT3-Foxo3a Signaling Axis. *Free Radical Biology and Medicine*. 2025.
90. Chuang J-Y, Huang Y-F, Lu H-F, Ho H-C, Yang J-S, Li T-M, et al. Coumarin induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through a mitochondria-and caspase-3 dependent mechanism and NF- κ B down-regulation. *In vivo*. 2007;21(6):1003-9.
91. Zhang L, Wu L, Si Y, Shu K. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles to *Azotobacter vinelandii*: Growth inhibition, cell injury, oxidative stress and internalization. *PloS one*. 2018;13(12):e0209020.
92. Wani AK, Akhtar N, Mir TuG, Singh R, Jha PK, Mallik SK, et al. Targeting apoptotic pathway of cancer cells with phytochemicals and plant-based nanomaterials. *Biomolecules*. 2023;13(2):194.
93. Eckert A, Nisbet R, Grimm A, Götz J. March separate, strike together—Role of phosphorylated TAU in mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2014;1842(8):1258-66.
94. Lukiw WJ. Antagonism of NF- κ B-up-regulated micro RNAs (miRNAs) in sporadic Alzheimer's disease (AD)—anti-NF- κ B vs. anti-miRNA strategies. *Frontiers Media SA*; 2013. p. 77.
95. Benvenuto M, Albonici L, Focaccetti C, Ciuffa S, Fazi S, Cifaldi L, et al. Polyphenol-mediated autophagy in cancer: evidence of in vitro and in vivo studies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(18):6635.
96. Levine B, Kroemer G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective. *Cell*. 2019;176(1):11-42.
97. Shakeri F, Bianconi V, Pirro M, Sahebkar A. Effects of plant and animal natural products on mitophagy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020;2020(1):6969402.
98. Nilsson P, Saido TC. Dual roles for autophagy: degradation and secretion of Alzheimer's disease A β peptide. *Bioessays*. 2014;36(6):570-8.
99. Menzies FM, Fleming A, Rubinsztein DC. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*. 2015;16(6):345-57.

100. Akkoc Y, Gozuacik D. MicroRNAs as major regulators of the autophagy pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2020;1867(5):118662.
101. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *Journal of biological chemistry*. 2007;282(33):24131-45.
102. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2000;1(2):120-30.
103. d'Amelio M, Cavallucci V, Middei S, Marchetti C, Pacioni S, Ferri A, et al. Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature neuroscience*. 2011;14(1):69-76.
104. Fang EF, Hou Y, Palikaras K, Adriaanse BA, Kerr JS, Yang B, et al. Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. *Nature neuroscience*. 2019;22(3):401-12.
105. Maekawa T, Sasaoka T, Azuma S, Ichikawa T, Melrose HL, Farrer MJ, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) regulates α -synuclein clearance in microglia. *BMC neuroscience*. 2016;17:1-12.
106. Swerdlow RH. Mitochondria and mitochondrial cascades in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2018;62(3):1403-16.
107. Pickrell AM, Youle RJ. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron*. 2015;85(2):257-73.
108. Sheng Z-H, Cai Q. Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*. 2012;13(2):77-93.
109. Henderson MX, Sengupta M, Trojanowski JQ, Lee VM. Alzheimer's disease tau is a prominent pathology in LRRK2 Parkinson's disease. *Acta neuropathologica communications*. 2019;7(1):183.
110. Caccamo A, Magrì A, Oddo S. Age-dependent changes in TDP-43 levels in a mouse model of Alzheimer disease are linked to A β oligomers accumulation. *Molecular neurodegeneration*. 2010;5:1-11.
111. Rissman RA, Poon WW, Blurton-Jones M, Oddo S, Torp R, Vitek MP, et al. Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(1):121-30.
112. Dube U, Del-Aguila JL, Li Z, Budde JP, Jiang S, Hsu S, et al. An atlas of cortical circular RNA expression in Alzheimer disease brains demonstrates clinical and pathological associations. *Nature neuroscience*. 2019;22(11):1903-12.

113. Beylerli O, Beilerli A, Ilyasova T, Shumadalova A, Shi H, Sufianov A. CircRNAs in Alzheimer's disease: what are the prospects? *Non-coding RNA Research*. 2024;9(1):203-10.
114. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*. 2010;90(4):1383-435.
115. Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell research*. 2014;24(1):24-41.
116. Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Molecular cancer*. 2020;19(1):12.
117. Rubinsztein DC, Mariño G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell*. 2011;146(5):682-95.
118. Jung CH, Ro S-H, Cao J, Otto NM, Kim D-H. mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters*. 2010;584(7):1287-95.
119. Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*. 2013;495(7441):384-8.
120. Pickford F, Masliah E, Britschgi M, Lucin K, Narasimhan R, Jaeger PA, et al. The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid β accumulation in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(6):2190-9.
121. Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature*. 2000;407(6805):802-9.
122. Patel KR, Scott E, Brown VA, Gescher AJ, Steward WP, Brown K. Clinical trials of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1215(1):161-9.
123. Shinojima N, Yokoyama T, Kondo Y, Kondo S. Roles of the Akt/mTOR/p70S6K and ERK1/2 signaling pathways in curcumin-induced autophagy. *Autophagy*. 2007;3(6):635-7.
124. Li MM, Liu XH, Zhao YC, Ma XY, Zhou YC, Zhao YX, et al. Long noncoding RNA KCNQ1OT1 promotes apoptosis in neuroblastoma cells by regulating miR-296-5p/Bax axis. *The FEBS Journal*. 2020;287(3):561-77.
125. Mehta SL, Dempsey RJ, Vemuganti R. Role of circular RNAs in brain development and CNS diseases. *Progress in neurobiology*. 2020;186:101746.
126. Wójcik P, Jastrzębski MK, Zięba A, Matosiuk D, Kaczor AA. Caspases in Alzheimer's disease: mechanism of activation, role, and potential treatment. *Molecular neurobiology*. 2024;61(7):4834-53.

- 127.Sahebnaasagh A, Eghbali S, Saghafi F, Sureda A, Avan R. Neurohormetic phytochemicals in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Immunity & ageing*. 2022;19(1):36.
- 128.Rocha EM, De Miranda BR, Castro S, Drolet R, Hatcher NG, Yao L, et al. LRRK2 inhibition prevents endolysosomal deficits seen in human Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*. 2020;134:104626.
- 129.Oliveira SR, Dionísio PA, Gaspar MM, Correia Guedes L, Coelho M, Rosa MM, et al. miR-335 targets LRRK2 and mitigates inflammation in Parkinson's disease. *Frontiers in cell and Developmental Biology*. 2021;9:661461.
- 130.Zhou Y, Liu Y, Kang Z, Yao H, Song N, Wang M, et al. CircEPS15, as a sponge of MIR24-3p ameliorates neuronal damage in Parkinson disease through boosting PINK1-PRKN-mediated mitophagy. *Autophagy*. 2023;19(9):2520-37.
131. Wang Y, Martinez-Vicente M, Krüger U, Kaushik S, Wong E, Mandelkow E-M, et al. Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing. *Human molecular genetics*. 2009;18(21):4153-70.
132. Kang R, Zeh H, Lotze M, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death & Differentiation*. 2011;18(4):571-80.
- 133.Zhou W-Y, Cai Z-R, Liu J, Wang D-S, Ju H-Q, Xu R-H. Circular RNA: metabolism, functions and interactions with proteins. *Molecular cancer*. 2020;19(1):172.
- 134.Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.
- 135.Aschrafi A, Schwechter AD, Mameza MG, Natera-Naranjo O, Gioio AE, Kaplan BB. MicroRNA-338 regulates local cytochrome c oxidase IV mRNA levels and oxidative phosphorylation in the axons of sympathetic neurons. *Journal of Neuroscience*. 2008;28(47):12581-90.
- 136.Arredondo M, Blasina F, Echeverry C, Morquio A, Ferreira M, Abin-Carriquiry J, et al. Cytoprotection by Achyrocline satureioides (Lam) DC and some of its main flavonoids against oxidative stress. *Journal of ethnopharmacology*. 2004;91(1):13-20.

