

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YENİ KUMARİN TÜREVLERİNİN SH-SY5Y HÜCRE HATTI
ÜZERİNDE ANTI-ALZHEİMER ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞULE IRMAK

DENİZLİ, OCAK - 2021

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**YENİ KUMARİN TÜREVLERİNİN SH-SY5Y HÜCRE HATTI
ÜZERİNDE ANTI-ALZHEİMER ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞULE IRMAK

DENİZLİ, OCAK - 2021

Bu tez çalışması PAÜ-BAP tarafından 2019FBE021nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

ŞULE IRMAK

ÖZET

**YENİ KUMARİN TÜREVLERİNİN SH-SY5Y HÜCRE HATTI
ÜZERİNDE ANTI-ALZHEİMER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ŞULE IRMAK
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ALAATTİN ŞEN)

DENİZLİ, OCAK - 2021

Demansın en yaygın şekli olan Alzheimer hastalığı (AH) hafıza kaybına neden olan sinaps kaybı, nörodejenerasyon ile ilişkili β -amiloit (A β) plaklar, nörofibrillerde birikintiler (dügümler) ve diğer bilişsel problemler ile karakterize karmaşık karakterli bir hastalıktır. Günümüzde kullanılan ilaçlar bu hastalığın ilerlemesini durduracak veya semptomları tersine çevirerek hastalığın iyileşmesini sağlayacak etkinliğe sahip değildir. Kumarinlerin anti-enflamatuar, antikoagülan, anti-Alzheimer, antikolinesteraz aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir. Sentetik veya doğal orijinli olan kumarinler ve türevleri çeşitli biyolojik aktiviteleri ve birçok hastalığın tedavisinde etkili bir ajan olabilecek potansiyelleri sebebiyle günümüzde önem kazanmışlardır. Bu çalışmada yeni kumarin türevlerinin insan nöroblastom hücre dizisi (SH-SY5Y) üzerindeki anti-Alzheimer etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla kumarin türevi olan 4-propil-8-hidroksikoumarin (PHC), metil 2-(2-((2-okzo-4-propil-2H-kromen-7-il)oksi)asetil)hidrazin-1-karbohidrat (MCHC), 7-etoksi-4-propil-2H-kromen-2-on (ECHO) ve biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) ekstraktının (BE) SH-SY5Y hücreleri üzerinde EC₀₄ ve EC₀₈ dozları belirlendi. Belirlenen dozlarda PHC, MCHC, ECHO ve BE hücrelere uygulandı. Total RNA izole edildi, bileşikler ve ekstraktın APP, PSEN1, PSEN2, APOE, CLU, CR1, PICALM, BIN1, ABCA7, MS4A1, CD33, CD2AP, SORL1, MMP9 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi qRT-PCR yöntemi ile belirlendi. Analiz sonuçlarına göre, izole edilmiş bileşiklerin PHC ve ECHO anti-Alzheimer etkiler gösterdi. Ancak BE’de ve MCHC bileşiğinde böyle bir etki görülmedi. Alzheimer hastalığı ile ilişkili genlerin düzenlenmesine dayanarak, PHC ve ECHO'nun Alzheimer hastalığı için terapötik potansiyele sahip olduğunu söyleyebiliriz.

ANAHTAR KELİMELELER: Anti-Alzheimer, kumarin türevleri, *Rosmarinus officinalis*

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTI-ALZHEIMER'S EFFECTS OF NEW COUMARIN DERIVATIVES ON SH-SY5Y CELL LINE

MSC THESIS

ŞULE IRMAK

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. ALAATTİN ŞEN)

DENİZLİ, JANUARY 2021

Alzheimer's disease (AD), the most common form of dementia, is a complex disease characterized by loss of synapses that cause memory loss, β -amyloid ($A\beta$) plaques associated with neurodegeneration, deposits (nodes) in neurofibrillary and other cognitive problems. The drugs used today do not have the effectiveness to stop the progression of this disease or to reverse the symptoms and heal the disease. It has been reported that coumarins have anti-inflammatory, anticoagulant, anti-Alzheimer and anticholinesterase activities. Coumarins have many known activities such as anti-inflammatory, anti-coagulant, anti-AH and cholinesterase inhibitory effects. Coumarins of synthetic or natural origin and their derivatives have gained importance today due to their various biological activities and their potential to be an effective agent in the treatment of many diseases. The aim of this study was to investigate the anti-Alzheimer's effects of novel coumarin derivatives on the human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y). For this purpose, the doses of EC_{04} and EC_{08} were determined for coumarin derivatives; 4-propyl-8-hydroxy coumarin (PHC), methyl 2- [(2-oxo-4-propyl-2H-chromen-7-yl) oxy] acetyl hydrazine-1-carbodithioate (MCHC), 7-ethoxy-4-propyl-2H-chromen-2-one (ECHO) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract (BE) on SH-SY5Y cells. The specified doses of PHC, MCHC, ECHO and BE were applied to the cells. Total RNA was isolated and the effects of compounds and extracts on APP, PSEN1, PSEN2, APOE, CLU, CR1, PICALM, BIN1, ABCA7, MS4A1, CD33, CD2AP, SORL1, and MMP9 genes mRNA expression levels were determined by qRT-PCR method. Based on the analysis results, PHC and ECHO of the isolated compounds showed anti-Alzheimer's effects. However, similar effects were not found in the BE and MCHC. Based on the regulation of genes associated with AD, we can say that PHC and ECHO have therapeutic potential for AD.

KEYWORDS: Anti-Alzheimer's, coumarin derivatives, *Rosmarinus officinalis*

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|--|-------------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | ii |
| İÇİNDEKİLER | iii |
| ŞEKİL LİSTESİ | v |
| TABLO LİSTESİ | vii |
| SEMBOL LİSTESİ | viii |
| ÖNSÖZ | ix |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1 Alzheimer Hastalığı (AH) | 1 |
| 1.2 Alzheimer Hastalığı Patolojisi..... | 2 |
| 1.3 Kolinergik Hipotez | 3 |
| 1.4 Amiloid Hipotezi | 5 |
| 1.5 Tau Hipotezi | 6 |
| 1.6 Nöroinflamasyon | 7 |
| 1.7 Amiloid plaklar (Senil Plaklar) | 8 |
| 1.8 AH Risk Faktörleri | 10 |
| 1.9 Epidemiyoloji ve Etiyolojisi..... | 13 |
| 1.10 Alzheimer hastalığında kullanılan ilaçlar | 14 |
| 1.11 Kolinesteraz İnhibitörleri..... | 16 |
| 1.11.1 Takrin | 16 |
| 1.11.2 Donepezil..... | 16 |
| 1.11.3 Rivastigmin | 17 |
| 1.11.4 Galantamin | 17 |
| 1.11.5 Glutamat Antagonistleri | 18 |
| 1.11.6 Memantin..... | 18 |
| 1.12 Alzheimer Hastalığında Diğer Tedavi Yolları | 19 |
| 1.12.1 Bitkisel Tedavi | 19 |
| 1.12.1.1 Kumarinler | 20 |
| 2. MATERYAL ve METOT | 23 |
| 2.1 MATERYAL | 23 |
| 2.1.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar..... | 23 |
| 2.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar | 23 |
| 2.2 METOT | 23 |
| 2.2.1 Etken Madde Elde Edilmesi ve Tanımlanması | 23 |
| 2.2.2 Hücre Kültürü Çalışmaları | 24 |
| 2.2.1.1 SH-SY5Y Hücre Hattı..... | 24 |
| 2.2.1.2 Besiyeri Hazırlanışı ve Hücrelerin Büyütülmesi | 24 |
| 2.2.1.3 Hücrelerin Pasajı | 25 |
| 2.2.1.4 Sitotoksikite Çalışmaları | 25 |
| 2.2.1.5 Hücrelere Bileşiklerin Uygulanması | 26 |
| 2.2.1.6 RNA İzolasyonu..... | 26 |
| 2.2.1.7 cDNA Sentezi..... | 27 |
| 2.2.1.8 Gerçek Zamanlı PZR..... | 28 |
| 2.2.3 İstatistiksel Analiz | 29 |
| 3. SONUÇLAR | 30 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.1 | Sentezlenen Bileşikler ve Ekstraktın SH-SY5Y Hücre Hattında Hücre Canlılığına Etkisi | 30 |
| 3.1.1 | 4-Propyl-8-Hydroxy Coumarin (PHC) Bileşiğinin Hücre Canlılığına Etkisi | 30 |
| 3.1.2 | Methyl 2-(2-((2-oxo-4-propyl-2H-chromen-7-yl)oxy)acetyl) hydrazine-1-carbodithioate (MCHC) Bileşiğinin Hücre Canlılığına Etkisi | 31 |
| 3.1.3 | 7-Etoksi-4-propyl-2H-chromen-2-one (ECHO) Bileşiğinin Hücre Canlılığına Etkisi | 32 |
| 3.1.4 | Biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i>) Ekstraktının (BE) Hücre Canlılığına Etkisi | 32 |
| 3.2 | Sentezlenen Bileşikler ve Ekstraktın SH-SY5Y Hücre Hattında Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Olan Etkisi | 33 |
| 3.2.1 | 4-Propyl-8-Hydroxy Coumarin (PHC) Bileşiğinin SH-SY5Y Hücre Hattında Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Olan Etkisi. | 33 |
| 3.2.2 | Methyl 2-(2-((2-oxo-4-propyl-2H-chromen-7-yl)oxy)acetyl) hydrazine-1-carbodithioate (MCHC) Bileşiğinin SH-SY5Y Hücre Hattında Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Olan Etkisi | 37 |
| 3.2.3 | 7-Ethoxy-4-propyl-2H-chromen-2-one Bileşiğinin SH-SY5Y Hücre Hattında Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Olan Etkisi. | 40 |
| 3.1.4 | Biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i>) Ekstraktının (BE) SH-SY5Y Hücre Hattında Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Olan Etkisi. | 44 |
| 4. | TARTIŞMA | 52 |
| 5. | SONUÇ | 59 |
| 6. | KAYNAKLAR | 60 |
| 7. | EKLER | 73 |
| 8. | ÖZGEÇMİŞ | 81 |

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

| | |
|---|----|
| Şekil 1: Alzheimer hastalığının çok faktörlü patolojisi..... | 2 |
| Şekil 2: AsetilkolininAChE ile hidroliz mekanizması..... | 4 |
| Şekil 3: Alzheimer hastalığında Amiloid hipotezin temeli | 6 |
| Şekil 4: Kumarin'in kimyasal yapısı..... | 21 |
| Şekil 5: PHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi..... | 30 |
| Şekil 6: MCHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi..... | 31 |
| Şekil 7: ECHO bileşiğinin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi..... | 32 |
| Şekil 8: BE'ninSH-SY5Y hücre canlılığına etkisi..... | 33 |
| Şekil 9: Kumarin türevi PHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PSEN1, PSEN2 ve APP genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi..... | 34 |
| Şekil 10: Kumarin türevi PHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında ABCA7 ve APOE genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi..... | 35 |
| Şekil 11: Kumarin türevi PHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında MMP9, CLU ve SORL1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi..... | 35 |
| Şekil 12: Kumarin türevi PHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında BIN1, PICALM ve CD2AP geninin mRNA seviyesine olan etkisi..... | 36 |
| Şekil 13: Kumarin türevi PHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CR1, CD33 ve MS4A1 genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi..... | 37 |
| Şekil 14: Kumarin türevi MCHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PSEN1, PSEN2 ve APP genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi.. | 38 |
| Şekil 15: Kumarin türevi MCHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında ABCA7 ve APOE geninin mRNA seviyesine olan etkisi..... | 38 |
| Şekil 16: Kumarin türevi MCHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında MMP9, CLU ve SORL1 genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi..... | 39 |
| Şekil 17: Kumarin türevi MCHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında BIN1, PICALM ve CD2AP genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. | 39 |
| Şekil 18: Kumarin türevi MCHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CR1, CD33 ve MS4A1 genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi..... | 40 |
| Şekil 19: Kumarin türevi ECHO bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PSEN1, PSEN2 ve APP genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. | 41 |
| Şekil 20: Kumarin türevi ECHO bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında ABCA7 ve APOE genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi..... | 41 |
| Şekil 21: Kumarin türevi ECHO bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında ABCA7 v, CLU ve SORL1 genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi..... | 42 |
| Şekil 22: Kumarin türevi ECHO bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında ABCA7, CLU ve SORL1 genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. | 43 |
| Şekil 23: Kumarin türevi ECHO bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CR1 ve CD33 genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. | 44 |
| Şekil 24: BE'nin SH-SY5Y hücre hattında PSEN1, PSEN2 ve APP geninin mRNA seviyesine olan etkisi. | 45 |
| Şekil 25: BE'nin SH-SY5Y hücre hattında ABCA7 ve APOE geninin mRNA seviyesine olan etkisi..... | 46 |
| Şekil 26: BE'nin SH-SY5Y hücre hattında CLU geninin mRNA seviyesine olan etkisi. | 46 |

| | |
|--|----|
| Şekil 27: BE'nın SH-SY5Y hücre hattında BIN1, PICALM ve CD2AP geninin mRNA seviyesine olan etkisi..... | 47 |
| Şekil 28: BE'nın SH-SY5Y hücre hattında CR1 ve CD33 geninin mRNA seviyesine olan etkisi..... | 48 |

TABLO LİSTESİ

Sayfa

| | |
|--|----|
| Tablo 1: cDNA sentez karışımı ve prosedürü | 28 |
| Tablo 2: RT-PZR koşulları..... | 28 |
| Tablo 3: PZR sıcaklık, döngü ve zamanları | 29 |
| Tablo 4: Çalışmada kullanılan primer dizileri ve sıcaklıkları | 29 |
| Tablo 6: MCHC bileşiği uygulaması sonucunda belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler | 49 |
| Tablo 7: ECHO bileşiğinin uygulaması sonucunda belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler | 50 |
| Tablo 8: BE uygulaması sonucunda belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler | 51 |

SEMBOL LİSTESİ

| | | |
|----------------------------|---|---|
| Aβ | : | Amiloit β |
| AChE | : | Asetilkolinesteraz |
| ACh | : | Asetilkolin |
| AD | : | Alzheimer tipi demans |
| AP | : | Amiloit plak |
| AH | : | Alzheimer hastalığı |
| APP | : | Amiloit β prekürsör protein |
| BE | : | Biberiye ekstraktı |
| BuChE | : | Bütirilkolinesteraz |
| DK | : | Dakika |
| DMSO | : | Dimetil sülfoksit |
| EBAH | : | Erken başlangıçlı alzheimer hastalığı |
| ECHO | : | 7-Etoksi-4-propil-2H-kromen-2-on |
| FBS | : | Fetal dana serumu |
| GBAH | : | Geç başlangıçlı alzheimer hastalığı |
| KBB | : | Kan beyin bariyeri |
| LOEL | : | En düşük gözlenen yan etki düzeyi |
| MAO | : | Monoamin oksidaz |
| MCHC | : | Metil2-(2-[(2-okzo-4-propil-2H-kromen-7il)oksi]asetil) hidrazin-1-karbohidioat |
| NFY | : | Nörofibril yumaklar |
| PB | : | Fosfat tampon tuzu |
| PHC | : | 4-Propil-8-Hidroksi Kumarin |
| PZR | : | Polimeraz zincir reaksiyonu |
| SH-SY5Y | : | İnsan nöroblastoma hücre hattı |
| SN | : | Saniye |
| SP | : | Senil plaklar |
| μL | : | Mikrolitre |
| μG | : | Mikrogram |

ÖNSÖZ

Yeni Kumarin Türevlerinin SH-SY5Y Hücre Hattı Üzerinde Anti-Alzheimer Etkilerinin Araştırılması isimli çalışma Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D. Biyokimya ve Moleküler Toksikoloji Araştırma Laboratuvarında yapılarak yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Tez çalışmalarımın başından sonuna kadar benden yardımlarını ve desteğini esirgemeyen, laboratuvarımın tüm imkânlarını sonuna kadar açan, deneyim olarak yetişmemde çok büyük emeği olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Alaattin ŞEN'e şükranlarımı sunarım.

Proje kapsamında kullanılacak olan kumarin türevi bileşiklerin temini için Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İlkay ERDOĞAN ORHAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım ve tez yazım aşamasında desteklerini esirgemeyen, her zaman güler yüzü ile bana mutluluk veren ve her konuda yanımda olduğunu hissettiğim bilimsel deneyimlerini benimle paylaşan ve bana abla şefkatiyle yaklaşan Öğr. Gör. Dr. Özden ÖZGÜN ACAR'a ayrıca Arş. Gör. Elif KALE ve Dr. Öğr. Ü. Gurbet ÇELİK TURGUT'a teşekkür ederim. Ayrıca tez projemin başından itibaren destek olan hocam Doç. Dr. Aslı SEMİZ'e teşekkür ederim. Laboratuvarda birlikte çalıştığım bana destek olan arkadaşlarım, Melek Beste ÖZEN ve Hajarat Abilo ALFA'ya bu zorlu süreçte bana karşı olan yardımları ve destekleri için teşekkür ederim.

Maddi desteği sağladığı için Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (2019FBE021) teşekkür ederim. Ayrıca eğitimim süresince yardımlarını eksik etmeyen bölüm hocalarıma ve beni bugünlere getiren aileme ve benimle her zaman gurur duyduğuna inandığım babaanneme teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

1.1 Alzheimer Hastalığı (AH)

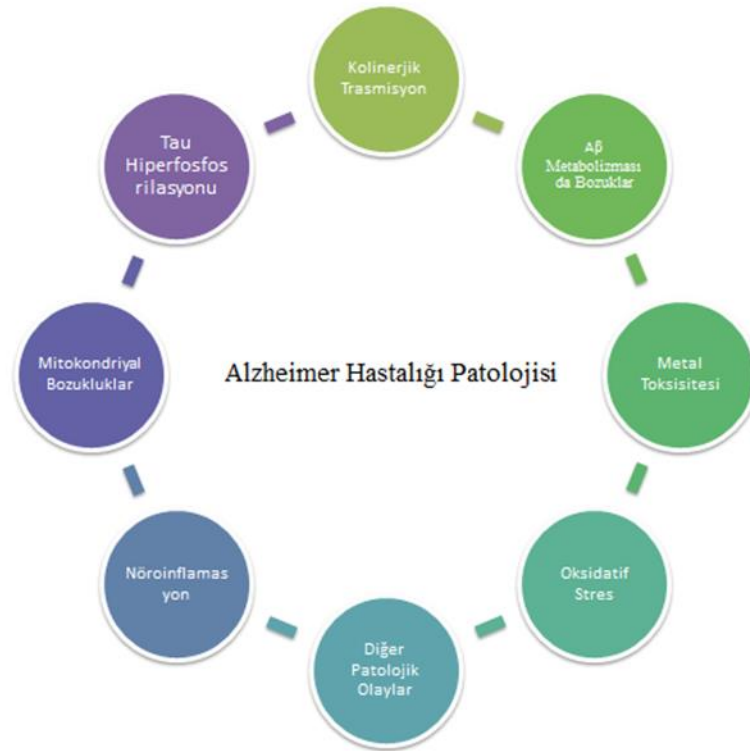
1907’de Alois Alzheimer tarafından karakterize edilen Alzheimer Hastalığı (AH), demansın ana şeklidir ve çoklu faktör etkisinde gelişerek ilerleme gösteren ölümcül olan bir nörodejeneratif hastalıktır (Bachurin 2003, Colombres ve diğ. 2004). Demans günümüzde ölümlerin en sık yedinci sebebi olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünya Alzheimer Raporu 2018 verilerine göre, günümüzde 50 milyon kişi demans hastasıdır ve demans tedavisi için dünyada 1 milyon Amerikan doları harcanmıştır. Bu rakamın artarak 2050 yılında 132 milyon demans hastası olacağı öngörülmekte ve demans tedavisi için yapılan harcamaların 2 katına çıkacağı hesaplanmaktadır (Alzheimer’s Association 2018; Patterson 2018). AH, dünya genelinde 20 milyondan fazla kişiyi etkilemektedir ve bu sayı toplam nüfus içinde yaşlı sayısının artmasıyla birlikte gelecekte önemli ölçüde artacaktır. Prevalansı 65 yaş civarında %10, 85 yaş civarında yaklaşık %50 oranlarında görülmektedir (Bachurin 2003, Colombres ve diğ. 2004). AH, serebral korteks ve hipokampusün geniş alanlarını etkiler. Anormallikler genellikle ilk önce frontal ve temporal lobları içeren beyin dokusunda tespit edilir ve ardından bireyler arasında oldukça değişken olan oranlarda ağır ağır neokorteksin diğer bölgelerine ilerler. AH, demans tablosunun en sık nedeni (%60-80) olan kronik nörodejeneratif bir hastalıktır. Altmış beş yaş üzeri hastalarda demansın en önemli nedenleri; Alzheimer hastalığı, vasküler demans ve vasküler-Alzheimer hastalığının bir arada bulunmasıdır.

Lewy cisimcikli demans, fronto-temporal demanslar, normal basınçlı hidrosefali, alkolik demans ve Parkinson hastalığına bağlı demans gibidir. Demans kliniği gözlenen hastaların yaklaşık %5’inde demans tablosu metabolik anomaliler (ör: hipotirodizm), beslenme bozuklukları (ör: vitamin B12 eksikliği, folat eksikliği) veya depresyon gibi geri dönebilen sebeplere bağlıdır. Her yıl tüm dünyada 4,6 milyon yeni AH olgusu geliştiği tahmin edilmektedir. Moleküler düzeyde incelendiğinde, protein dizilimindeki hatalar ve agregasyon, oksidatif stres,

mitokondriyal anormallikler ve nöroenflamatuvar yolak gibi çok çeşitli olaylar Alzheimer hastalığı ile karakterizedir (Singh 2013). Ekstrasellüler amiloit beta (A β) ve intersellüler (hücre içi) hiperfosforile tau proteini AH'nın temel patolojik bulguları olarak kabul edilmektedir (Landsdall 2014). AH'nın bir diğer nöropatolojik işareti olan fibril yumaklar, anormal olarak fosforillenmiş tau proteinlerinden oluşmaktadır (Minati 2009).

1.2 Alzheimer Hastalığı Patolojisi

Alzheimer hastalığı pek çok farklı patolojik yolağın bir arada görülmesiyle karakterize çok faktörlü bir hastalıktır. Hastalıkla ilk ilişkilendirilen süreç azalmış asetilkolin seviyeleri olmakla birlikte, AH'de amiloit plaklar, nörofibriler yumaklar, mitokondriyal bozukluklar, metal toksisitesi ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu gibi pek çok süreç bir arada yürümektedir (Şekil 1).



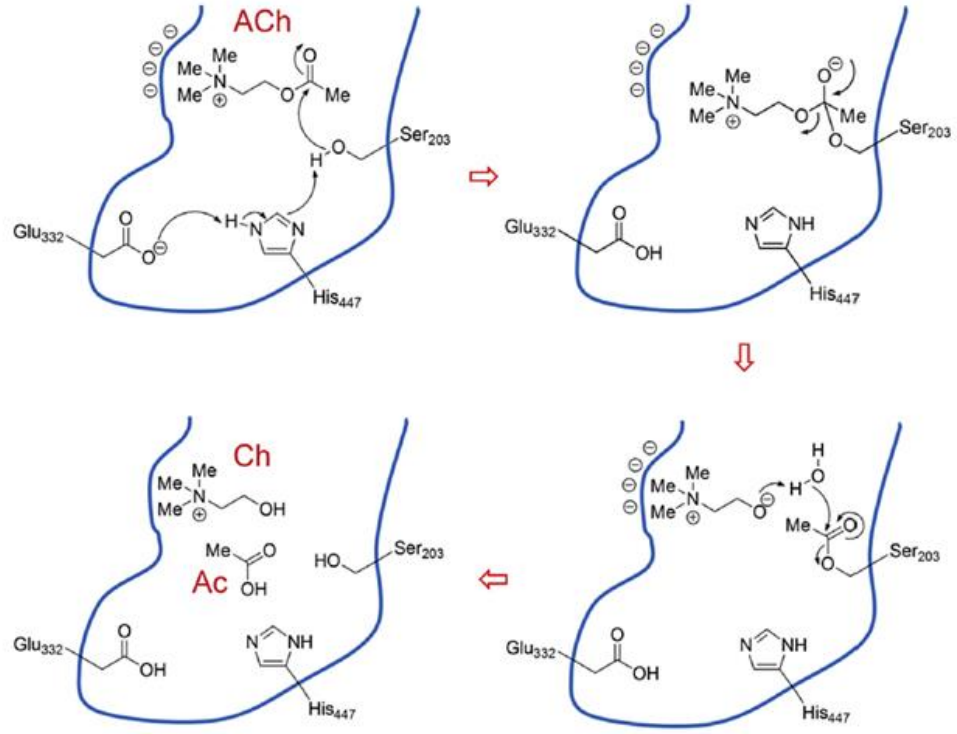
Şekil 1: Alzheimer hastalığının çok faktörlü patolojisi.

1.3 Kolinerjik Hipotez

Santral sinir sisteminde asetilkolin (ACh), presinaptik nöronlarda kolin ve asetil koA'dan kolin asetiltransferaz enzimi aracılığı ile üretilir. Nöronlardan salınan asetilkolin, muskarinik ve nikotinik kolinerjik reseptörlere bağlandıktan sonra postsinaptik nöronlarda ve sinaptik boşlukta asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE) enzimleri yardımıyla asetilkolin/bütirilkolin ve asetata hidroliz edilir (Scarpini ve diğ. 2003).

Alzheimer hastalarının beyinde rastlanan presinaptik kolinerjik bozukluklar; ACh sentezinden sorumlu asetil transferaz enzim defektleri, azalmış kolin geri alınımı, azalmış ACh salımı ve nükleus basalisteki kolinerjik perikaryal kayıplardır (Bowen 1976, Davies ve Maloney 1976, Drachman ve Leavitt, 1974, Rylett 1983). Bu bulguların ACh'in öğrenme ve hafıza üzerindeki işlevleri ile birleştirilmesiyle AH patolojisinde "kolinerjik hipotez" ortaya çıkmıştır. Bu teoriye göre, Alzheimer hastalarının bilişsel fonksiyonlarındaki bozulmanın sebebi serebral korteks, hipokampus, amigdala ve diğer alanlardaki kolinerjik nörotransmisyonun kaybı ve bazal ön beyindeki kolinerjik nöronların dejenerasyonudur (Bartus 1982; Francis 1999).

Butirilkolinesteraz (BChE), AChE ile yakından ilişkili bir enzimdir ve ACh'i hidrolize ederek kolinerjik nörotransmisyonun ortak düzenleyicisi olarak görev yapar (Mesulam ve diğ. 2002) (Şekil 2).



Şekil 2: Asetilkolinin AChE ile hidroliz mekanizması (Luana ve diğ. 2016'dan alınmıştır).

Yapılan çalışmalar, AH'nın gelişimi sırasında beynin en çok etkilenen bölgelerinde (temporal korteks ve hipokampus gibi) bu kolinesteraz (ChE) aktivitesinin, %40-90 oranında arttığını göstermiştir. BChE aktivitesindeki artış, plak oluşumunun erken evrelerinde A β toplanmasında da önemli bir rol oynar (Geula ve diğ.2004). BChE temel olarak plazma dahil periferik dokularda lokalizedir ve beyin bölgesinde çok az miktarda bulunur (Anand ve Singh 2012). A β plakları, AH semptomlarının ortaya çıkmasından 15 yıl önce kabaca ortaya çıkar (Selkoe ve diğ. 2012). AH'nda bir kez nöronal hasarın neden olduğu bilişsel gerileme gelişirse, beyindeki A β seviyeleri immünoterapi ile düşürüldükten sonra bile geri alınamaz (Gandy ve diğ. 2011).

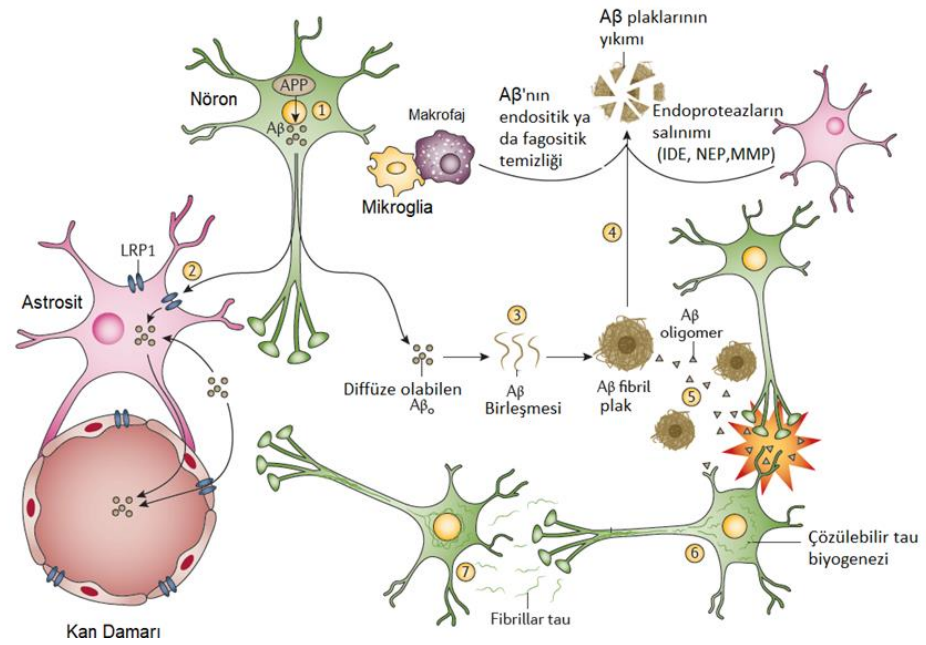
Alzheimer hastalığının kompleks patolojisi göz önüne alındığında, birden çok patolojik süreci tek bir molekül ile hedefleyen “çoklu-hedefe yönlendirilmiş ligantlar” (Multi-Target Directed Ligands-MTDL) son yıllarda anti-Alzheimer ilaç keşfinde sıklıkla karşımıza çıkmaktadır (Cavalli ve diğ. 2008; Zhou ve diğ. 2019).

AChE enziminin başlıca A β plak birikimine aracılık eden klasik olmayan fonksiyonlarının da anlaşılmasıyla ilk olarak “ikili yöre etkileşimli inhibitörler” geliştirilmiştir (Castro ve diğ. 2001; Musialdiğ. 2007). Günümüzde AChE enziminin katalitik aktif yöresini (CAS) ve periferel anyonik yöresini (PAS) hedefleyen ikili yöre etkileşimli inhibitörlerin yanısıra BChE enzimini, A β plaklara aracılık eden yolakları ve diğ.er patolojilerden en az ikisini tek bir molekül ile hedefleyen MTDL yaklaşımıyla hibrit moleküller üzerinde çalışmalar devam etmektedir. İlerleyici bir hastalık olan Alzheimer’da semptomatik tedavi ile birlikte hastalığı durdumayı/geriletmeyi hedefleyen ligantlara odaklanılmaktadır.

1.4 Amiloit Hipotezi

1984 yılında nörotik (senil) plaklardaki amiloit fibrilleri oluşturan yapının, A β protein yapısı olduğu tespit edilmiştir (Singh ve diğ. 2013). Alzheimer hastalarının beyinlerinden yapılan histolojik çalışmaların doğrultusunda, Alzheimer hastalarının beyinlerinde biriken plakların yapı taşı olarak A β proteininin yapısı 1991 yılında aydınlatılarak hastalığın temel nedeninin beyinde biriken A β proteini olduğu öne sürülmüştür. Bu sonuçlara dayanılarak amiloit hipotezi ortaya konulmuştur (Minati ve diğ. 2009; Singh ve diğ. 2013). Amiloit hipotezine göre A β proteininin birikimi plakların ana yapısını oluşturmaktadır ve bu ise Alzheimer patolojisinin etken maddesidir. Nörofibriller yumaklara, hücre kaybına, vasküler hasara ve bunların sürecinde demansa neden olmaktadır. APP (amiloit β prekürsör protein) daha büyük olan amiloit öncül proteininin bir peptit ürünüdür. Amiloit hipotezinde, beyindeki yıldız şekilli veya toroidal yapıdaki yanlış katlanmış A β proteini oligomerik yapılarının, hücre duvarı yapısını etkileyerek apoptozu artırabileceği öne sürülmüştür (Singh ve diğ. 2013). APP, beyindeki senil plakların ve β amiloit depozitlerinin ana yapısıdır (Tanzi 2008). APP, karakteristik bir hücre duvarı reseptörüne sahiptir ve özellikle sinapslar gibi birçok dokuda ekprese edilir ve normal metabolizmanın bir parçasıdır. APP’nin esas görevi hala belirsiz olmakla birlikte, sinaptik oluşum ve tamir, sinyal iletimi ve hücre adhezyonunda görev aldığı düşünülmektedir (Minati ve diğ. 2009). APP, α -sekretaz ve β -sekretaz isimli iki farklı enzim tarafından parçalanmaktadır (Minati ve diğ. 2009; Singh ve diğ. 2013). Alfa-sekretaz ve β -sekretaz aktivitesi neticesinde, çözülebilir ekstraselüler

fragmanlar olan çözünebilir α -APP (α -sAPP) ve çözünebilir β -APP (β -sAPP) oluşmaktadır. β -sekretaz enzimi ile kesilme sonucu A β bölgesinin bağlı olduğu C-terminal fragmanı (β -CTF) ortaya çıkarken, α -sekretaz ile kesilme A β bölgesinin içinden gerçekleştiği için A β polipeptidin serbest kalması engellenmektedir ve α -C-terminal fragmanı oluşmaktadır (α -CTF). α -CTF, γ -sekretaz ile parçalanarak zararsız p3 fragmanını oluştururken, β -CTF γ -sekretaz ile parçalanarak A β polipeptidini oluşturmaktadır. Her iki yolak da normal metabolizmada aktif olarak görev yapmaktadır (Minati ve diğ. 2009). A β birikiminin AH başlangıcında ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Rees ve diğ. 2003). AH'da amiloit hipotezin temeli Şekil 3'de gösterilmiştir (Colin ve diğ. 2015).



Şekil 3: Alzheimer hastalığında amiloit hipotezin temeli (Colin ve diğ. 2015'ten değiştirilerek alınmıştır).

1.5 Tau Hipotezi

Alzheimer hastalarının beyinde gözlenen patolojik lezyonlardan biri olan nörofibriler yumaklar, mikrotübül ilişkili tau proteinin anormal hiperfosforilasyonu sonucu oluşan eşleşmiş helikal filamentlerden meydana gelir (Bennett 2004, Lewis ve diğ. 2001). Nörofibriler yumaklar sadece AH'ların beyinde spesifik olarak

görülmeyp, başka nörodejeneratif hastalıklarda da gözlenir ve tauopati olarak adlandırılır (Cruz ve diğ. 2005; Hardy 2003; Mazanetz ve Fischer 2007).

Weingarten ve arkadaşları tarafından 1975 yılında tanımlanan tau proteinleri mikrotübüllerinin stabilizasyonunda görev alıp, aksonal transporta yardımcı olurlar (Weingarten 1975).

Anormal fosforilasyon, fizyolojik koşullarda fosforile olmayan bölgelerin fosforilasyonu olarak tanımlanır. Kinaz ve fosfataz enzimlerinin arasındaki dengeye bağlı olarak hiperfosforile tau proteinleri meydana gelir (Drechsel 1992). Hiperfosforile olmuş tau proteinleri mikrotübüllerden ayrılarak proteinlerin mikrotübül stabilize edici işlevlerini yerine getirememesine yol açar, aksonal iletimi bozular ve sonuçta nörodejenerasyon gelişir. Serbest kalan hiperfosforile tau proteinleri oksidasyon ve konformasyonel değişimden sonra hücre içerisinde birikerek eşleşmiş helikal filamentleri oluşturur. Nörofibriler yumaklar ise bu filamentlerin bir araya gelmesi ile oluşup nöronlarda birikir ve nöronal ölüme yol açar (Lalut ve diğ. 2017; Mazanetz ve Fischer 2007).

1.6 Nöroinflamasyon

Oksidatif stresin her geçen gün hastalıkların patojenitesini anlamadaki önemi artmaktadır ve bu önemi artan hastalıkların içinde AH da yer almaktadır. Günümüze kadar AH'nın patojenezinin temelinde A β plakları ve NFY (nörofibriler düğümler) olmak üzere iki ana patojenik etmenin olduğu bilinmekteydi. Son yıllarda yapılan çalışmalar ise AH açısından üçüncü bir patojenik etmenin olduğunu ve nöroinflamasyon olarak belirlenen bu etmenin A β ve NFY konusunda eksik kalan noktaları tamamladığını (Kinney ve diğ. 2018).

AH'da nöroinflamasyon, ortaya çıkan senil plaklar (SP) ve nörofibriler düğümler tarafından aktive edilen basit bir sistem değildir. Araştırmacılar nöroinflamasyon sürecinin en az A β ve NFY kadar patojenezin oluşumuna katkı sağladığını belirtmişlerdir (Heneka ve diğ. 2015). Nöroinflamasyon süreci ilk zamanlarda kan beyin bariyeri (KBB) varlığı nedeniyle her ne kadar tartışmalı olsa da günümüzde yapılan çalışmalarda nörodejeneratif hastalıklarda KBB'nin

bozulduğu ve nöroinflamasyon sürecinin hastalarda görüldüğü ortaya çıkartılmıştır. Oksidatif stres bu sürecin başlamasında ve devam etmesinde etkin rol oynamaktadır. Kısaca oksidatif stres özellikle hidrojen peroksit (H₂O₂) ve nitrik oksit (NO) gibi bileşenlerin hücre ortamına reaktif oksijen ve nitrojen salmasıyla başlayan bir süreçtir (Hensley 2010).

AH'nın ilerleme sürecinde mikroglia, mikroglialenflamasyon ve astrositler aktif bir rol oynamaktadır. Sinapslar, mikroglial hücreler ve astrositik hücrelerle iletişime geçmektedirler. Astrositler ve mikroglia hücrelerinin en dikkate değer özelliklerinden biri nöronal gelişimde rol oynamalarıdır. Ayrıca astrositler, dendritik ağı destekleme, sinapsları sağlamlaştırma ve sinaptik iletimde görev almaktadırlar. Mikroglial hücreler ise immünolojik görevlerinin yanı sıra proteolitik ve fagositik işlemleri yapabilme kabiliyetleri sayesinde aksonal ve dendritik uçlarda kesme işlemleri yaparak nöronal yeniden düzenleme süreçlerinde rol oynamaktadırlar (Hampel ve diğ. 2020).

Nörodejeneratif hastalıklarda ve merkezi sinir sistemi bozukluklarında nöroinflamasyonun hedeflenmesinin terapötik potansiyele sahip olma derecesini ve mikroglial metabolizmayı değiştirmenin nöropatofizyolojinin olumsuz etkisini azaltması ihtimalini belirlemek için daha fazla *in vivo* çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Devanney ve diğ. 2020).

1.7 Amiloit plaklar (Senil Plaklar)

AH, senil plaklar olarak adlandırılan amiloit beta (A β) plaklarının birikimi ve hiperfosforile tau protein içeren nörofibriller ile karakterize bir hastalıktır. Senil amiloit plaklar (nöritik plaklar) hücre dışında bulunup, 21. kromozomda kodlanan APP'den kaynaklanan 40–42 aminoasitlik santral yerleşimli A β peptit çekirdeği içerir. APP metabolizması genetik kontrol altındadır. 1, 14 ve 21 kromozomlardaki presenilin genleri amiloit depolanmasını artırmaktadır. İlk birikim neokortekste ve gevşek (diffüz) plaklar şeklindedir. Diffüz plaklar yuvarlak veya amorf şekildedir. Sınırları bariz belli değildir. Bu plaklarda aktif mikroglia ve astrositler yoktur, akson ve dendritlerde ise çok az bir değişiklik vardır. Diffüz plaklarda amiloit birikimi bir yandan oksidatif gerilim ile serbest radikallerin oluşumu ve bunların etkisiyle, diğer

yandan glioz ve mikroglial aktivasyonu ile oluşacak olan inflamatuvar değişikliklerin neticesinde amiloit birikimi çözünmez fibriler forma (β -kırımlı) dönüşür. Daha sonra glial aktive olur ve amiloidin şişmiş dejenere nöritlerle çevrelendiği “nöritik plak” oluşur. Nöritik plaklar sınırları belirgin ve yuvarlaklardır. Alışılmış bir plakta ortada amiloit çekirdek, etrafında mikroglial hücresi, düzinelerce dejenere nörit, sinaps ve astrosit uzantıları vardır. Bu plaklarda dejenere akson ve dendritler de bulunur. Alzheimer hastalığında hastalığın bütün evrelerinde erken, matüre ve eski plakların birlikte görülmesi senil plaklarda bir turn-over olduğunu göstermektedir. Bu nedenle birim alana düşen plak dansitesi aynı olabilir. SP’lar en fazla korteksin ikinci ve üçüncü tabakasında, en az birinci tabakasında görülür (Mesulam 2004).

AH’daki ikinci temel nöropatolojik değişiklik olan amiloit plaklar farklı morfolojik yapılarda olabilir, ancak temel bileşeni $A\beta$ proteindir. Beta amiloit aminoasitten oluşan bir protein olup daha büyük bir transmembran protein olan, 19. kromozomda kodlanan ve işlevi tam olarak anlaşılamamış transmembran protein olan amiloit prekürsör proteinden (APP) proteoliz yoluyla oluşur (Masters 1985). Sonuçta $A\beta$, APP’nin metabolizma ürünlerindedir. APP geninin yok edildiği transjenik farelerde (APP knock-out mice) anlamlı bir mortalite ya da morbidite gözlenmemiştir (Bird 2005).

$A\beta$ amiloitin normal fonksiyonu ise tam olarak bilinmemektedir. Çözünebilir amiloit fibrillerin oluşması, AH’daki ilk patolojik olay olabilir ve nöritik plak oluşumuyla sonuçlanabilir. AH’li olguların beyinlerinde de meningeal kan damarlarında amiloit β tespit edilmiştir. Erken demansı olan olguların beyin dokuları ve BOS’unda artmış $A\beta$ 42 ve $A\beta$ oligomerleri bulunur ve bu düzeyler kognitif azalma ile koreledir (Georganopoulou ve diğ. 2005). Bu bulgular, AH’daki nörotoksisitenin mediyatörlerinin amiloit plakların değil, küçük $A\beta$ oligomerlerinin olduğu hipotezini desteklemektedir (Gandy ve diğ. 2005). Diğer taraftan $A\beta$ normalde de oluşan bir üründür (Haass 1992). Bu da henüz anlaşılmamış olsa da fizyolojik bir fonksiyonu olduğunu düşündürmektedir. APP mutasyonları ya toplam amiloit β üretimini ya da daha amiloidojenik form olan $A\beta$ 42 üretimini artırır (Suzuki ve diğ. 1994).

Bireylerde APP işlenmesinde bu 3 yol da kullanılırken, büyük ölçüde 60 yaşından itibaren, ileride demans geliştirecek olsun ya da olmasın, herkeste β ve γ -

sekretaz ürünü A β temizlenemeyip plaklarda birikmeye başlar. Plaklarda A β birikimi oksidatif gerilim ve serbest radikallerin oluşumuna, bu faktörler de plakların fiziksel değişime neden olabilir. Diğer yandan, gliosis ve mikroglial aktivasyonu ile oluşan inflamatuvar değişiklikler de plakların yoğunlaşmasına sebep olabilir.

Sonuç olarak AH'nin bilinen bütün genetik mekanizmaları A β oluşumunu artırmaktadır. Genetik mekanizmalar neticesinde substrat olan APP miktarında artış olması veya APP'den A β üreten β -sekretaz veya γ -sekretaz aktivasyonuna bağlı aşırı üretim olması sebebiyle A β miktarı artar. Tau proteini genindeki mutasyonlar ise AH dışı dejenerasyonlara da neden olmaktadır.

1.8 AH Risk Faktörleri

Yaş, ailede demans öyküsünün varlığı, cinsiyet, Down sendromu, 1, 14 ve 21. kromozomlarda spesifik mutasyonların varlığı, apolipoprotein E4 genotipi ve kafa travması AH için bilinen risk faktörleridir (Arıoğul 2003;Cankurtaran 2004;Mocerri 2000). Vasküler demans için ise varolan risk faktörleri; hipertansiyon, hiperlipidemi, diabetes mellitus, sigara, yaş, cinsiyet gibi faktörlerdir.

APP veya PSEN (presenilin 1) genlerindeki mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkan AH olguları ile sporadik AH olguları arasında hastalık başlangıç yaşı ile seyri dışında patolojik bir fark görülmemesi, bu mutasyonların hastalığı oluşturmaktan ziyade, ileri yaşların en büyük risk faktörü olduğu AH oluşumunu hızlandırdığı düşünülmektedir. AH'nin etiyolojisinde genetik faktörlerin rol oynadığına dair bir diğer kanıtta apolipoprotein E genidir (APOE). Popülasyonda en sık görülen 3 alelden (ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4) biri olan ϵ 4 alelinin sporadik ve ailesel AH için risk faktörü olduğu incelenen birçok toplumda gösterilmiştir. Lakin ϵ 4 alelinin varlığı kendi başına AH oluşturmak için yeterli değildir. ϵ 4 alelini taşıyan bireylerin hepsinin hasta olmadığı gibi, bu aleli taşımadığı halde hastalığa yakalananlar da vardır. Ancak bu alelin AH'da görülme sıklığı sağlıklı topluma göre yaklaşık 2-3 kat daha fazladır. APO- ϵ 4 aleli AH olgularının tümünü açıklamaz. Eldeki bulgular ışığında ileri yaşta ya da sporadik olarak ortaya çıkan AH olgularında da başka genetik etkilerin rol oynayabileceği kabul edilmektedir. AH için risk faktörü oluşturduğu tahmin edilen birçok gen üzerinde tartışmalar halen sürmektedir. AH'de

genetik faktörler büyük oranda hastalığın gelişimi için çevresel faktörlere yatkınlık zemini oluşturan risk faktörü niteliğindedir. Yani genetik ve çevresel faktörlerin karmaşık bir etkileşimi ile AH oluşur. AH'li olguların çoğu sporadiktir. Bununla birlikte, tüm Alzheimer olgularının %1'inden azı kalıtsal olma (mendeliyotomozal dominant geçiş) özelliği taşır (Goedert ve diğ. 2006).

Otozomal dominant geçişten sorumlu şimdiye kadar üç ayrı gen bulunmuştur: APP geni (21. kromozom), PSEN1 geni (14. kromozom) ve PSEN2 geni (1. kromozom) (Citron ve diğ. 1997). Bu genlerin kodladığı üç protein de normal işlevleri çok iyi bilinmeyen, nöronalplastisitede görev aldıkları öne sürülen transmembran proteinlerdir. Sözü edilen genlerdeki mutasyonların hepsi APP'den metabolize edilen A β proteininin atılmayarak amiloit plaklar içinde biriken daha uzun şeklinin (A β -42) üretiminin artışına yol açar. APP geni mutasyonu taşıyan aileler çok az sayıda olsa da, amiloit metabolizması üzerinden hastalığın patogenezi aydınlatmaktadır.

PSEN1'deki mutasyonlar ailesel AH'nin en sık sebebidir (Goedert 2006). PSEN1 ve PSEN2 genlerinde 160'dan fazla mutasyon tanımlanmıştır. Presenilinler APP'nin γ -sekretaz ile bölünmesinden sorumlu atipik aspartilproteaz komplekslerinin merkezi bileşenleridir. Presenilin mutasyonları amiloit A β -42/A β -40 oranını artırırlar. Bu değişim muhtemel fonksiyondaki değişim sonucunda oluşmaktadır (Citron 1997).

PSEN1 mutasyonlarının preklirik evresinde A β -42 depozisyonu erken olan bir bulgudur (Smith 2001). Transjenik hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, γ -sekretaz aktivitesinde azalmanın, A β depozitleri olmaksızın tau hiperfosforilasyonuna yol açıyor olabileceğini düşündürmüştür (Doglio ve diğ. 2006). Presenilinlerin aksine β -sekretaz ile aynı olan aspartilproteaz BACE1'de AH'a sebep olan bir mutasyon tanımlanmamıştır (Vassar ve diğ. 1999). Buna göre, ailesel AH olgularında yapılan araştırmalar, amiloit kaskadı hipotezinin temelini oluşturmakta, A β -42'deki artışın tüm AH olgularından mesul olduğunu, NFY oluşumu, nöron dejenerasyonunu ve demansın A β -42 oluşumuna bağlı ve onu takip ederek olduğunu düşündürmektedir (Hardy 2002). Şimdiye kadar tanımlanan mutasyonlar, ailesel AH'nin %50'si kadarını oluştururlar. Geri kalan %50 için henüz bulunmayan genler ve otozomal dominant olmayan geçiş biçimleri ileri

sürülmektedir. Apolipoprotein $\epsilon 2$ 'nin $\epsilon 4$ alleli sporadik AH'lerde ortaya konmuş olan tek genetik risk faktörüdür. APOE (19. kromozom) ve $\alpha 2$ -makroglobulin (12. kromozom) genleri doğrudan belirleyiciler olarak değil fakat sporadik AH'de risk faktörleri olarak ortaya konulmuştur. Öte yandan $\epsilon 4$ homozigotlarında ise, hastalık $\epsilon 4$ heterozigotlara göre daha erken yaşlarda başlar. Ayrıca, APP mutasyonlu ailesel AH olgularında E4 varlığı hastalık başlangıç yaşını erkene alır. $\epsilon 4$ 'ün AH patogenezindeki rolü tam anlamıyla ortaya konamamıştır. Fakat hem A β 'nin patolojik şaperonu olarak "nöritik plak oluşumunda" hem de tau proteininin patolojik hiperfosforilasyonuna katkıda bulunarak "nörofibriler yumak oluşumunda" rol oynadığına ilişkin ipuçları vardır. APOE geni olmayan (knock-out) farelerde sinaptik yoğunlukta yaşa bağlı bir azalma görülmüştür (Mahley 2006).

Pek çok diğer polimorfizm de AH oluşum riskini etkileyebilir. Yeni bir gen olan sortilin-ilişkili reseptör 1 (SORL1) genindeki farklılıklar AH ile ilişkili bulunmuştur (Rogaeva ve diğ. 2007). SORL1 proteini APP metabolizmasında rol oynadığı düşünülmektedir. SORL1'in ekspresyonunda azalmanın APP'yi β -sekretaz kompleksine kaydıracağı ve böylelikle A β üretimini arttırdığı öne sürülmektedir (Dreses ve diğ. 2008).

Literatürde daha önce yayınlanmış değişik araştırmalarda, intrasellüler kalsiyum seviyelerinin APP metabolizmasını etkilediği gösterilmiştir. Örneğin, SERCA (endoplazmik retikulummembranında yer alan bir kalsiyum kanalı)'nın inhibisyonunun sitoplazmik kalsiyum seviyesini attırdığı ve A β düzeyini azalttığı gösterilmiştir. Benzer bir şekilde PSEN genlerinin fonksiyon kaybı sonucunda sitoplazmik kalsiyum düzeylerinin etkilendiği de gösterilmiştir. PSEN1 ve PSEN2 genlerin A β -40 yerine daha çok plak oluşumuyla ilişkilendirilen amiloit β -42'nin düzeylerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir. Literatürde özellikle son otuz yılda, AH gelişim riskini etkileyebildiği öne sürülen çok sayıda "yeni AH genleri" öne sürülmüştür. Ancak benzeri çalışmaların büyük çoğunluğunun bulguları zaman içinde benzer araştırmalarla doğrulanamamıştır (Bertram ve diğ. 2007).

1.9 Epidemiyoloji ve Etiyolojisi

AH'nin her yıl insidans ve prevalansında hızlı bir artış gözlenmektedir. Hastalığın insidansı 65-69 yaş aralığında %0,4 olarak gözlenirken bu oran 90 yaşında %10'lara kadar çıkmaktadır. Hastalığın prevalansı ise 65-69 yaş grubundaki hastalarda %2 olarak gözlenirken, 90 ve üzerindeki yaşlarda %25 civarında seyretmektedir. Hastalığın prevalansının 65 yaş üzerinde her 5 yılda iki katına çıktığı gözlenmiştir. Gelişmiş ülkelerde yapılan araştırmalarda 65 yaş ve üzerindeki her 10 bireyden birinde, 85 yaş ve üzerindeki olguların ise 1/3'ü demansla ilgili olguların oluşmaya başladığı gözlenmiştir (Selekler 2010, Corada ve diğ. 2010).

Uluslararası Alzheimer Derneği tarafından 2010 yılında yapılan çalışma demansı bulunan hasta sayısının 2010'da 35 milyona yaklaştığını, demansı olan bu hastaların yaklaşık olarak 2/3'ünün Alzheimer hastası olduğunu belirtilmiştir. Bu prevalansın 4 kat artarak, 2050 yılında 106,8 milyon civarında olması beklenmektedir (Brookmeyer ve diğ. 2007).

Yaş, AH oluşmasında en önemli risk faktörüdür. Fakat buna rağmen yaş faktörünün tek başına AH oluşumuna neden olduğunu düşünmek de doğru olmaz. Yaş dışındaki büyük risk faktörleri ise; eğitim seviyesinin düşük olması, apolipoprotein gen E4 alelleri varlığı, aile öyküsü, kardiyovasküler risk faktörleri ve hastanın maruz kaldığı orta veya şiddetli kafa travmalarıdır (Apostolova 2016).

AH erkeklere oranla kadınlarda daha sık karşımıza çıkmaktadır. Tanımlanan vakaların yaklaşık olarak 2/3'ü kadındır. 'The Aging, Demographics and Memory Study (ADAMS)' olarak adlandırılan çalışma grubunun elde ettiği verilere dayanarak demans prevalansının 71 yaş üstündeki erkeklerde %11, kadınlarda ise %16 olduğunu söylemiştir. Bu farkın olmasında kadınlarda yaşam süresinin erkeklere göre bakıldığında daha uzun ömürlü olmasını söylenebilir. Ayrıca eğitim düzeyinin düşüklüğü, genetik faktörler, hormonal sebepler ve sosyal etkenler de rol almaktadır. (Plassman ve diğ. 2007).

Demans hastalığı Latin ırkları ve Afrika'ya kıyasla beyaz ırkta daha az gözlenmiştir. Bununla birlikte bu ırklarda görülen düşük seviyedeki eğitim, genetik

faktörler ve kardiyovasküler hastalıklarla ilgili risk faktörleride etiyolojide önemlidir. (Gurland ve diğ. 1999, Manly ve Mayeux 2004).

Batı Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yapılan çalışmalarda demanslıların %50-70'inin Alzheimer hastalığı olmasına karşılık, Japonya ve Rusya'da vasküler demansın daha fazla olduğu bildirilmiştir. Afrika'da yapılan çalışmalarda zencilerde Alzheimer hastalığının nispeten az olduğu bildirilirken, ABD' de yapılan çalışmalar siyah ırkdaki oranın beyaz ırktan daha fazla olduğunu göstermiştir. Genel olarak demanslar içinde en sık görüleni AH'dır (<http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/noroloji/demans.htm>).

AH'nda yaşın önemli bir etiyolojik faktör olduğu ve hastalığın prevalansının 65 yaş sonrasında her beş yılda bir iki katına yükseldiği bildirilmiştir (Gao ve diğ. 1998;Hattori 2009;Wang ve Ding 2008). Genetik yatkınlık da AH'nın gelişiminde diğer bir önemli etkidir ki birinci derece akrabalarında AH görülen kişilerde hastalık riskinin artış gösterdiğide gözlenmiştir (Wang ve Ding 2008;Williamson ve diğ. 2009).

1.10 Alzheimer hastalığında kullanılan ilaçlar

Hastalığın keşfinden günümüze kadar geçen süreçte AH olan bireylerdeki ana patolojileri hedef alan umut verici çalışmalar yapılmıştır, ancak maalesef faz deneylerinde birçoğu olumsuz olarak sonuçlanmıştır. Günümüzde tedavi için hastalığın seyrini yavaşlatan (semptomatik) ilaçlar kullanılmaktadır (Hane ve diğ. 2017). Araştırmacılar tarafından güvenilirliği kesin olarak doğrulanmış bu ilaçların bir kısmı klinikte etkin olarak kullanılmakta, bir diğer kısmı ise bitkisel kaynaklı olup piyasada serbest olarak satılabilmektedir.

AH tedavisinde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nin (FDA) onayladığı ilaçlar kolinesteraz inhibitörleri ve glutamat antagonistleri olan memantin, karışımı olarak iki gruba ayrılmaktadır. Bu ilaçlar farklı yollar ile hastalığın seyrinin hafifletilmesine yardımcı olmaktadır. Asetiltransferaz adlı enzimin AH'na sahip bireylerin beyinde eksik olduğu ve asetilkolinin ise hafızada etkili bir molekül olduğunu bilinmektedir (Briggs ve diğ. 2016). Bu nedenle nörodejeneratif hastalıklarda

kolinesteraz enziminin inhibe edilmesine dayanan kolinesteraz inhibitörleri altında takrin, donepezil, galantamin ve rivastigmin adlı ilaçlar kullanılmaya başlanmıştır.

NMDA (N-metil-D-aspartat reseptörü) sinyal yolağı Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının işlevine bağılı olarak çalışmaktadır. AH olan bireyler NMDA sinyal yolağı bozukluğuna sahiptirler. Memantin adlı bileşik araştırmacılar tarafından voltaja bağımlı bir NMDA reseptör antagonisti olarak tanımlanmış ve AH'nın tedavisinde etkin olarak kullanılan bir ilaç haline gelmiştir (Parsons ve diğ. 2013).

AH'nda araştırılan terapötikler, katlanan proteinlerin üretimini, agregasyonunu ve anormal proteinlerin neden olduğı toksisiteyi sınırlamak ve yayılmasını inhibe etmek amacıyla faz deneylerine tabii tutulmaktadır. Günümüzde klinikte kullanılan ilaçlar kesin bir tedavi yöntemi sunmayıp sadece süreci yavaşlatma eğilimindedirler (Tiwari ve diğ. 2019) Bu durum araştırmacıları yeni ilaç denemelerine ve geleneksel tedavide kullanılan fitoterapötiklerin etkinliklerini araştırmaya itmektedir. Oksidatif stres süreci ROS üretimindeki fazlalık ve bu radikallerin ortadan kaldırılmasına yardım eden antioksidatif savunma sistemi ile karakterize edilmektedir. Her iki sistemin de yaşa bağılı nörodejenerasyon ve demans süreçlerinde önemli rolleri olduğı düşünölmektedir.

AH tedavisi için kullanılan ilaçların birçoğı, kolinesterazların inhibisyonu ile sinaptik aralıktaki ACh konsantrasyonunu arttırmayı amaçlayan "kolinerjik hipotez" teorisini temel almaktadır (Martocchia ve diğ. 2008). Bu etki mekanizmasıyla tedavi için kullanılmış olan bilinen dört ilaç mevcuttur. Bu ilaçlar takrin, donepezil, rivastigmin ve galantamindir (Shah ve diğ. 2008). Tüm bu ilaçlar, kolinerjik açığı iyileştirerek, bilişsel, fonksiyonel ve AH'nin davranışsal belirtileri üzerinde faydalı etkiler göstermektedir. Bununla birlikte, bu ilaçlar son derece sınırlıdır, çünkü hastalığın ilerlemesini durduracak veya semptomları tersini gösterecek ve hastalığın iyileşmesini sağlayacak etkinliğe sahip değildirler (Fang ve diğ. 2008).

1.11 Kolinesteraz İnhibitörleri

1.11.1 Takrin

Takrin ilk olarak 2. Dünya savaşı sırasında antibakteriyel etkili bileşikler bulmak amacıyla Albert ve Gledhill adlı iki araştırmacı tarafından 1945 yılında sentezlenmiştir (Albert 1946). 1961 yılında ise Heilborn ve arkadaşları tarafından AChE ve BChE enzimlerinin reversibl inhibitörü olduğu ve yüksek substrat konsantrasyonlarında kompetitif, düşük substrat konsantrasyonlarında ise non-kompetitif mekanizmalarla inhibisyon gösterdiği rapor edilmiştir (Heilbronn 1961).

Takrin orta ve ileri seviye Alzheimer tedavisinde kullanılmak üzere 1993 yılında FDA tarafından onaylanmıştır. Bu amaçla kullanımı onaylanan ilk AChE inhibitörüdür (Davis ve Powchick 1995). Takrin kan beyin bariyerini rahatlıkla geçebilmesine, AChE ve BChE enzimlerine karşı nanomolar düzeyde inhibisyon göstermesine rağmen, başlıca hepatotoksisite olmak üzere yan etkileri ve kötü farmakokinetik özellikleri (günde 4 kez kullanım) nedeniyle artık klinikte kullanılmamaktadır.

1.11.2 Donepezil

Donepezil non-kovalent tipte bir kolinesteraz inhibitörüdür. Güçlü, non-kompetitif, seçici ve hızlı geri dönüşümlü inhibitör etki gösterir. Bu ilaç nöronal AChE'a selektiftir. AH'da bozulmuş konuşma algısının iyileşmesinde etkilidir (Darreh-Shori ve Soinenen 2010). Konuşma algısına yakından bağlı olan nörobilişsel mekanizmaları etkiler ve donepezilin en önemli özelliklerinden biri de biyoyararlanım oranıdır. Ağız yoluyla kullanıldığında %100 e yakın biyoyararlanımı vardır.

Donepezil beyinde predominant kolinesteraz olan asetilkolinesterazın spesifik ve geri dönüşümsüz bir inhibitörüdür. Donepezil, temel olarak santral sinir sisteminin dışında bulunan bir enzim olan BChE'a oranla AChE'ın bin kat daha etkili bir inhibitörüdür. Donepezil bu etkisiyle AH'nda kolinerjik transmisyon yetmezliğinin neden olduğu semptomlarda etki edebilmektedir (Dozly Prospektüs 2006).

Beyaz kristal toz formunda olan donepezil HCl kloroform, su ve glasiyel asetik asitle çözünebilir. Yarılanma ömrü yaklaşık olarak 70 saattir. Cinsiyet, ırk ve sigara alışkanlığının donepezil HCl'nin plazma konsantrasyonları üzerinde önemli sayılabilecek bir etkisi yoktur.

Donepezil, takrinle karşılaştırıldığında merkezi sinir sistemine seçicidir. İlacın boşaltımı hem renal hem de sitokrom P450 sistemi yoluyla gerçekleşir. Yapılan bir çalışmada donepezil ve rivastigminle yapılan bilişsel ve fonksiyonel kaybı yavaşlatmaya yönelik yapılan çalışmada rivastigminin günlük yaşam aktivitelerinde donepezile, donepezilin ise daha az yan etki oluşturma konusunda rivastigmine daha üstün olduğu sonucu elde edilmiştir (İşeri ve Efendi 2003). Yapılan başka bir diğer çalışmada donepezilin beyinde siyah madde (*substantia nigra*) adı verilen ve dopamin üretiminden sorumlu olduğu bilinen bölgenin çalışmasını düzenlediği belirlenmiştir (Angelantongo 2004).

1.11.3 Rivastigmin

Rivastigmin, AChE enzimini yalancı (pseudo) geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. Rivastigmin tartarat, periferik dokulardakine kıyasla beyin için hem AChE hem de BChE selektifini inhibe eden sahte ve geri dönüşümsüz bir karbamat inhibitörüdür. Rivastigminin kortikal ve hipokampal bölgede daha etkin olduğu da ileri sürülmüştür. Bir karbamat olarak rivastigmin, neredeyse farmakolojik olarak hızla böbrekler yolu ile atılan bir fenolik bölünme ürününü açığa çıkaran rivastigmin molekülünü parçalayan AChE'a bağlanır (Polinsky ve diğ. 1998). Karbamat kısmı, ACh'nin hidrolizi sırasında asetat parçası için, olduğundan daha uzun süre enzimin estetik bölgesine bağlı kalır, böylece enzim, ana molekül dolaşımından kaybolduktan bir zaman sonra inaktif olur. Bu etki mekanizmasının bir başka neticesi de rivastigmininin aktivasyon veya eliminasyon için hepatik sitokrom P450 sistemine dayanmamasıdır. Rivastigmin günde 2 defa kullanılmaktadır. Etkisi yaklaşık 10 saattir (Jann ve diğ. 2000).

1.11.4 Galantamin

Galantamin (4'a,5,9,10,1,12-hekzahidro-3-metoksi-11-metil 6H-benzofurool (3'a, 3,2-ef)(2)-benzazepin-6-ol hidrobromür) başlangıçta bir tersiyer alkaloittir. Günümüzde sentetik olarak elde edilmekle birlikte, Amaryllidaceae familyasına ait

bitkilerinden ve çeşitli nergis türlerinden izole edilmiştir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar, galantaminin oral olarak aktif, geri dönüşümlü, kompetitif (yarışmalı) bir beyin AChE inhibitörü olduğunu onaylamıştır. Yüksek bir oral biyoyararlanımı ve lineer plazma kinetiği gösterir, tutarlı bir yarı ömre sahiptir. Beyin omurilik sıvısına iyi penetrasyon gösterir. Günde iki doz olarak kullanılır (Bickel ve diğ. 1991). BChE yerine AChE için seçicidir (Fulton ve Benfield 1996).

1.11.5 Glutamat Antagonistleri

Alzheimer hastalığında kullanılan ikinci grup olan ilaçlar glutamat antagonistleridir. AH'da görülen nöronal eksitotoksosite, nöron kaybı ve bunun neticesinde gelişen nöronlardaki fonksiyon bozukluğunda glutaminerjik sistem önemlidir. Eğer glutaminerjik sistem kronik olarak uyarılırsa buna bağlı olarak hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu artarsa bu sonuçlar görülebilir (Lleó ve diğ. 2006). Memantin ise AH'nda görülen artmış glutamenerjik aktivitenin azaltılması için geliştirilmiş non-kompetitif reseptör antagonisttir ve FDA onaylıdır (Lleó ve diğ. 2006, Kelley ve Petersen 2007).

1.11.6 Memantin

AH'nda memantinin terapötik aktivitesinin nörobiyolojik temeli tam olarak anlaşılmamıştır. Bununla birlikte, bir kolinesteraz inhibitörü değildir ve bu nedenle şuan AH için kullanılan ilaçlardan farklıdır. Memantinin etki mekanizması, hızlı bloke edici/blokaj açma kinetiği ile gerilime bağlı, düşük orta düzeyde afinite, rekabetçi olmayan bir NMDA reseptörü antagonizmasıdır (Danysz ve diğ. 2000). Hızlı açma/kapama kinetiği de önemlidir. Çünkü bu memantinin reseptör üzerinde glutamat reseptörlerinin patolojik olarak aktive edilmesini engelleyecek kadar uzun süre oturduğu ve daha sonra glutamat reseptörlerinin fizyolojik aktivasyonu gerektiğinde ise hızlıca ortadan kalktığı anlamına gelmektedir.

Memantin, nöronlarda görülen hücre ölümüne sebep olabilecek ve kognitif fonksiyonlarda bozukluk yaratabilecek anormal glutamat aktivitesinin etkilerini engeller. Hızlı açma/kapama kinetiği ile birlikte düşük-orta afinite memantin hareketinin anahtarıdır. Çünkü öğrenme ve bellek için gereken NMDA reseptörlerinin fizyolojik aktivasyonunu korurken aşırı glutamatın etkilerini engeller (Danysz ve diğ. 2000). Diğer NMDA reseptör antagonistleri gibi yüksek

konsantrasyonlarda memantin de öğrenme ve hafızanın altında olduğuna inanılan sinaptik plastisite mekanizmalarını inhibe eder. Memantin, kolinerjik nöronların eksitotoksik yıkımına karşı koruma sağlayabilir. Son zamanlarda yapılanda *in vitro* çalışmalar memantin beta-amiloit toksisitesini ortadan kaldırdığını ve muhtemelen üretimini inhibe ettiğini göstermektedir. Ancak, AH'na hem kolinerjik hem de glutamaterjik yaklaşımların hipotezine dayandığı ve kanıtlanmadığı bilinmelidir.

1.12 Alzheimer Hastalığında Diğer Tedavi Yolları

1.12.1 Bitkisel Tedavi

Tıbbi bitkiler AH'nin tedavisinde mevcut ilaçlar hastalığın tedavisinde ve semptomların giderilmesinde yetersiz kalmaktadır. Bununla birlikte bu ilaçların yan etkileri de mevcuttur. Tıbbi bitkiler kullanılarak, yan etkilerin minimuma indirilmesi, tedavi edici mekanizmaların güçlendirilmesi ve semptomların giderilerek hastanın rahatlatılması hedeflenmektedir.

Biberiyenin gıda muhafazası için ve doğal antioksidan katkı maddeleri olarak endüstriyel ölçekte kullanılması, fenolik bileşenlerine atfedilir. Bu tür etkilerinin yanı sıra bitkinin çeşitli *in vitro* ve *in vivo* farmakolojik özelliklerinden sorumlu olan baskın fenolik bileşikler, abietan tipi diterpenlerdir. Farmakolojik önemi olan biberiye çoğunlukla diterpenoitleri ile temsil edilmektedir. Yapısal özellikleri sayesinde, bu bileşikler, antioksidan, metal şelasyon ve anti-enflamatuar özellikler arasında değişen çok çeşitli farmakolojik etkiler sergilemektedir. Bu mekanizmalar aynı zamanda bileşiklerin AH'na yönelik potansiyel terapötik etkisinde de rol oynadığı düşünülmektedir (Chen ve diğ. 2012).

AH'nın birçok patolojik süreci içeren karmaşık bir hastalık olduğu düşünüldüğünde, biberiye diterpenleriyle gösterilenler gibi çok işlevli ilaçlarla tedavi uygulanabilir bir terapötik yaklaşım oluşturur. AH'daki nörodejenerasyon süreci, Parkinson hastalığı gibi diğer hastalıklarla pek çok benzerliğe sahiptir. İlginç bir şekilde, karnozik asit gibi bazı biberiye diterpenlerinin Parkinson hastalığı modelinde yararlı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Cuajungco ve diğ. 2000; Tougu ve diğ. 2011).

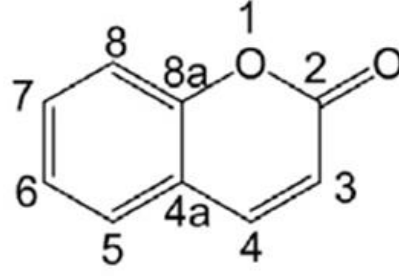
Ayrıca, AH ile ilişkili olası terapötik etkileri açısından kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Glikozidik formlar dahil diğer ilginç diterpenler, farklı biyoyararlanıma ve terapötik etkiye sahip olabilir. Bu alandaki daha fazla araştırma bu nedenle biberiye diterpenlerinin terapötik potansiyeli hakkında daha fazla kanıt sağlayacaktır. Bununla birlikte, bugüne kadarki tüm mevcut tarihler, AH üzerindeki etkilerinin çok ümit verici olduğunu ve klinik araştırmalar da dahil olmak üzere daha fazla araştırmanın iyi olabileceğini göstermektedir (Solomon 2016).

1.12.1.1 Kumarinler

Önemli bir doğal bileşik sınıfı olan kumarinler, gıda ve kozmetik sektörü gibi alanlarda katkı maddesi ve ilaç hammaddesi kaynağı olarak kullanılmaktadır (O’Kennedy ve diğ. 1997). Kumarin izolasyonu ile ilgili literatürdeki ilk rapor, kumarinin Vogel tarafından 1820’de yaygın olarak “cumaru” olarak bilinen “*Diptery xodorata*” adı verilen ağacın tohumlarından izole edildiği hakkındadır (Vogel ve diğ. 1820). Yapılan çalışmalar neticesinde kumarinlerler, anti-inflamatuar, anti-tümör, karaciğer koruyucu, anti-alerjik, anti-HIV, antiviral, antifungal, antimikrobiyal, antiastım, anti-oksidan, analjezik, anti-diyabetik, antihipertensif, antidepresan, antikanser, lipit düşürücü ve antikoagülan etki gibi çok geniş bir biyolojik aktivite alanına sahiptirler (Anand ve diğ. 2012; Venugopala ve diğ. 2013 Yüce 2006).

Kumarin bir benzen halkası ve yapısal çekirdek olarak görev yapan bir piron halkası ile karakterizedir. Kumarinin sahip olduğu alfa-benzopiron yapısal çekirdeği, AChE ve AChE’in indüklediği A β birikimini eş zamanlı olarak önleyebilen hibrit moleküllerin sahip olduğu temel özelliktir (Piazzini ve diğ. 2008).

Kumarinler (2H-kromen-2-on), birçok bitkide doğal olarak bulunan, benzopironlar grubundan renksiz, kristal yapıda bir kimyasal bileşiklerdir. Serbest halde ya da glukoz ile birleşmiş halde bulunabilirler (Venugopala ve diğ. 2013). Kumarinlerin genel yapısı Şekil 4’de gösterilmiştir.



Şekil 4: Kumarinin kimyasal yapısı.

Kumarinlerin aromatik merkezinin işlevselliği, A β birikimini inhibe edecek kapasitede yeni kumarin analoglarının geliştirilmesine öncülük etmektedir (Anand ve diğ. 2012). Kumarinler çeşitli sebeplerden dolayı inhibitör tasarımı ana bileşik olarak seçilmişlerdir. İlk olarak kumarinler, benzopironlar olarak adlandırılan farklı farmakolojik özellikler gösteren bileşikler sınıfının üyeleridirler ve işlevselleştirilmiş bazı kumarinler güçlü AChE inhibitörleri olarak gösterilmektedirler. İkinci sebep, belirli fonksiyonel gruplarla modifiye edilmiş kumarin türevleri monoaminoksidaz B inhibitörüdürler ve ayrıca AH'nin tedavisi için tasarlanmaktadır. Üçüncü sebep ise kumarin bileşiklerinin yüksek anti-AChE etkisi göstermeleridir (Shen ve diğ. 2005).

Önemli bir dizi çalışma kumarinin AChE'ı inhibe etme kabiliyetini göstermiştir (Bruhlmann ve diğ. 2001; Kang ve diğ. 2001; Shen ve diğ. 2005). AChE inhibitörü kumarin türevlerinin enzimle etkileşimi esnasında, kumarin halkasının öncelikle AChE'nin periferik anyonik bölgesi (PAS) ile; benzilamino, fenilpiperazin ya da anilino gibi kumarin halkasına bağlı amin fonksiyonel gruplarının da AChE'nin katalitik bölgesi ile etkileşime girdiklerinin göstermiştir. Kumarinin yapısal özelliklerinin anlaşılması, AChE inhibitör aktivitesini ve buna ek olarak beta-sekretazın BACE inhibisyonuyla A β birikimini azaltma ve mono aminoksidaz (MAO) inhibisyonu gibi farmakolojik aktiviteleri artıran etkiye sahip yeni analogların tasarımına ve sentezine yardımcı olmaktadır. Kumarin türevleri hatta nöronların, A β kaynaklı oksidatif strese ve serbest radikallere karşı korunmasını da sağlamaktadır (Anand ve diğ. 2012). Kumarinin sayısız biyolojik-farmakolojik aktivitesi, birçok protein hedefine kolay bağlanmayı sağlayan, oksijenli heterosiklik halkanın kendine has kimyasal yapısına ve fiziko-kimyasal özelliklerine bağlıdır. Bu

özellikler sentetik veya doğal orijinli olan kumarin ve türevlerini ilaç keşfi için benzersiz moleküller durumuna getirmektedir.

2. MATERYAL ve METOT

2.1 MATERYAL

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Proje çalışmamız süresinde Santrifüj (Soğutmalı & Soğutmasız) (Sigma 1-14), Otoklav (Nuve OT 4060), (Hiclave HVE-50), PZR Cihazı (Bioneer), Agaroz Jel Elektroforez Aparatı (Thermo EC320), UV Jel Görüntüleme Kabini (DNR LB 0605), Vorteks (DragonLab MX-F), Isı Bloğu (BiosanDryBlockHeatingThermostat TDB-100), BioneerExi Spin PZR tüp karıştırıcısı, Human PowerScholar-UV saf su sistemi, HVE-50, Terazi (Precisa XB 220A), (MettlerToledo AB 265S), (MettlerToledo PB 602-L), Nuaire -85°C Ultralow Freezer, Mikrodalga Fırın (SHOV M7017-P), Güç Kaynağı (Thermo, EC-250-90), CO2 İnkübatörü (Nuaire), Olympus Ters Mikroskop (Olympus CX31) ve Mikroplaka Okuyucu Spektrometre (Thermo Scientific Multiskan GO) kullanılmıştır.

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmamızda kullandığımız bazı kimyasallar; Dimetil sülfoksit (DMSO), Fetal Sığır Serum, DMEM/F12 (Dulbecco's Modified EagleMedium/Nutrient Mixture F12), Phosphate Buffered Saline (PBS), Penisilin-Streptomisin karışımı ve Tripsin-EDTA çözeltisi, GM SYBR qPCR Kit, EasyScript Plus cDNA sentez kiti ve QiagenRNAesy Plus mini kittir.

2.2 METOT

2.2.1 Etken Madde Elde Edilmesi ve Tanımlanması

Tez kapsamında kullanılacak olan *Rosmarinus officinalis* ekstraktı Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Prof. Dr. İlkay ERDOĞAN ORHAN'ın laboratuvarında elde edilmiştir. Yeni kumarin türevi bileşikler 4-propil-8-hidroksi kumarin, methyl2-(2-((2-oxo-4-propyl-2H-chromen-7-yl)oxy)acetyl) hydrazine-1-

carbodithioate), 7-ethoxy-4-propyl-2H-chromen-2-one ise yurtdışında sentezlenmiştir.

2.2.2 Hücre Kültürü Çalışmaları

2.2.1.1 SH-SY5Y Hücre Hattı

Bu tezde yapılan çalışmalarda PAÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyokimya ve Moleküler Toksikoloji Araştırma Laboratuvarının bulunan bir nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y hücreleri kullanılmıştır. SH-SY5Y hücreleri, bir başka insan nöroblastoma hücre hattı olan SK-N-SH hücrelerinin bir alt klonudur (Biedler 1973). Bir insan nöronal sistem modellemesi meydana getiren bu hücre hattı beyin fonksiyonunu ve gelişimini anlamada çeşitli nörolojik hastalıklar bilim insanlarına fayda sağlamaktadır. AH çalışmalarında en çok kullanılan hücre hattıdır. Hem farklılaşmış hem de farklılaşmamış SH-SY5Y hücreleri, dopaminerjik nöronal markörleri, muskarinik, nikotinik ve adrenerjik reseptörleri eksprese edebilmektedir (Kovalevich ve Langford, 2013).

2.2.1.2 Besiyeri Hazırlanışı ve Hücrelerin Büyütülmesi

Çalışma sırasında kullanılan SH-SY5Y hücreleri için %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin içeren DMEM/F-12 kullanıldı. -80°C'de %10 DMSO içerisinde saklanan hücreler 37°C'de eriyene kadar bekletildi. Hücreler eridikten sonra petrilere ekildi ve üzerine 5 ml DMEM/F12 besi ortamı eklenerek 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda bir gün bekletilip yüzeye tutunması sağlandı.

CO₂ inkübatöründe hücreler deney için yeterli stok sayısına ulaşıncaya kadar yukarıda belirtilen şartlarda inkübe edildi. Hücrelerin besiyeri iki günde bir değiştirilerek canlılıkları ve çoğalma hızları takip edildi.

2.2.1.3 Hücrelerin Pasajı

Hücrelerin çoğaltıldığı kültür kaplarında, hücreler tek tabaka olduklarında pasajları yapıldı. Pasaj işlemi için öncelikle kültür besiyeri uzaklaştırıldı. Daha sonra hücreler %0,25'lik tripsin ile yaklaşık 5 dk muamele edildi ve hücrelerin yüzeyden ayrılmaları sağlandı. Süspansiyon haline getirilen hücreler steril santrifüj tüpüne alındı ve tripsinininaktif hale gelmesi için üzerine 1 ml DMEM/F12 besi ortamı eklendi. 2500 xg hızda 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 1 ml besi ortamı eklenerek, Eppendorft tüpünde hazırlanan trapan mavisi (1:1000 sulandırılmış) ve hücre karışımı (1:1) thoma lamında sayıldı ve hücreler deney planına göre ekim için hazır hale getirildi.

2.2.1.4 Sitotoksisite Çalışmaları

4-Propyl-8-Hydroxy Coumarin (PHC) ve methyl 2-(2-((2-oxo-4-propyl-2H-chromen-7-yl)oxy)acetyl)hydrazine-1-carbodithioate (MCHC) bileşiği %10 DMSO'de, 7-ethoxy-4-propyl-2H-chromen-2-one %10 aseton ve *Rosmarinus officinalis* etanol (EtOH) ekstraktı %100 DMSO'da sitotoksisite deneyleri için çözüldü ve steril etmek için 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi. Sitotoksisite testi için farklı 96 kuyulu plakaya ekilecek olan hücrelerin sayısı hesaplandı. Bunun için büyütülen hücreler 96 kuyulu plakalara ekmek için tripsin ile kaldırıldı. 15 ml'lik steril falcon tüplere besiyeri içinde olan hücreler alınıp, 2500 xg'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılıp, dibe çöken hücreler 1 ml besiyeri içinde çözüldü. Eppendorfta hazırlanan trapan mavisi ve hücre karışımı (1:1) thoma lamında sayıldı. Hücre sayısı hesaplandıktan sonra her kuyucukta 1 x 10³ hücre olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekildi ve her kuyuya son hacim 200 µl olacak şekilde besiyeri eklendi ve 24 saat hücrelerin plakaya yapışması için %5 lik CO₂ inkübatöründe, %95 nem ortamında bekletildi. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda 4-Propyl-8-Hydroxycoumarin, methyl 2-(2-((2-oxo-4-propyl-2H-chromen-7-yl)oxy)acetyl)hydrazine-1-carbodithioate 7-ethoxy-4-propyl-2H-chromen-2-one bileşikleri ve *Rosmarinus officinalis* ekstraktı hücrelere uygulandı. Yeni bir 24 saatin sonunda 96 kuyulu plakadaki besiyeri uzaklaştırıldı, sonrasında her kuyucuya 100 µl kristal viyole boyası (%0,5) eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra

plaka su ile yıkandı ve boya uzaklaştırıldı. Her kuyucuya 100 µl 0,1 M %50 etanol içindeki Na-Sitrat (pH 4,2) eklendi ve 15 dk 100 rpm'de çalkalandı. Oluşan renk 630 nm'de plaka okuyucuda ölçüldü. Değişik konsantrasyonlardaki 4-propil-8-hidroksikoumarin (PHC), Methyl 2-(2-((2-oxo-4-propyl-2H-chromen-7-yl)oxy)acetyl)hydrazine-1-carbodithioate (MCHC), 7-ethoxy-4-propyl-2H-chromen-2-one ve *Rosmarinus officinalis* ekstraktı ile muamele ettiğimiz gruplar kontrol grubu ile karşılaştırarak, EC₀₄ ve EC₀₈ dozları bileşiğin hücre canlılığına olan etkisi saptandı. Dozlar literatürde benzer çalışmalar için uygulanan doz ve süreler göz önüne alınarak saptanmıştır.

2.2.1.5 Hücrelere Bileşiklerin Uygulanması

SH-SY5Y hücrelerinde 4-Propil-8-hidroksikoumarin (PHC), Methyl 2-(2-((2-oxo-4-propyl-2H-chromen-7-yl)oxy)acetyl)hydrazine-1-carbodithioate (MCHC), 7-ethoxy-4-propyl-2H-chromen-2-one ve *Rosmarinus officinalis* ekstraktı için EC₀₄ ve EC₀₈ değerleri sitotoksikite deneyi ile belirlendikten sonra, bu dozların hücrelerde belirlenen genlerin ekspresyon düzeylerindeki etkisini test etmek için hücre kültürü ortamında steril şartlarda hücrelere uygulandı. Bunun için 10 mm petrilere 106 hücre ekildi ve 24 saat inkübasyonun ardından belirlenen dozlar bu hücrelere uygulandı. Bileşik uygulaması yapılan hücreler, uygulama yapıldıktan 24 saat sonra RNA izolasyonu için toplandı.

2.2.1.6 RNA İzolasyonu

Qiazol Lysis Reagent ile toplanan hücrelerden ayrı ayrı total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Total RNA izolasyonu 'QIAGEN RNeasy Plus Universal' kit kullanılarak üretici firmanın talimatları baz alınarak ve hücreden RNA izole etmek için kendi optimize ettiğimiz prosedür ile yapıldı. Qiazol Lysis Reagent ile toplanan hücreler 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra üzerine 100 µl kit içinde bulunan gDNA eliminasyon solüsyonundan eklendi ve 15 sn karıştırıldı. Daha sonra 180 µl kloroform eklendi ve tekrar karıştırıldıktan sonra 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda 12.000 xg'de ve +4°C'de 30 dk santrifüj edildi. Üst faz alınıp 2

ml'lik steril Eppendorf tüpe toplandı ve alınan üst faza eşit miktarda %70 EtOH eklenip iyice karıştırıldı. Karışım 'RNeasy mini spin' kolona eklendi ve 30 sn 9.000 xg'de santrifüj edildi ve alta geçen kısım döküldü. Kolonun üzerine 700 µl kit içinde bulunan yıkama tamponu 'RWT' eklendi ve 30 sn 9.000 xg'de santrifüj edildi. Alta geçen kısım dökülüp kolonun üzerine 500 µl kit içinde bulunan yıkama tamponu 'RPE' eklendi ve 30 sn 9.000 xg'de santrifüj edildi, alta geçen kısım döküldü. Kolon üzerine tekrar RPE tamponu eklendi ve 2 dk 30 sn 9.000 xg' resantrifüj edildi ve alta geçen kısım döküldü. Son olarak kolan yeni tüpe alındı ve üzerine 50 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 1 dk 15 sn 9.000 xg'de santrifüj edildi. Elde edilen RNA kalitesi agaroz jel elektroforezinde görüntülendi ve konsantrasyonları NanoDrop cihazında ölçüldü.

2.2.1.7 cDNA Sentezi

Nanodrop cihazında konsantrasyonları belirlenen total RNA'lar kullanılarak ABM marka cDNA sentez kiti ile cDNA sentezi yapıldı. PZR tüpü içerisinde 2,5 µg total RNA kit içerisindeki oligo d(T) primerleri (1µl), dNTP çözeltisi (1µl) ve RNaz içermeyen su ile karıştırılarak 65°C'de 5 dk işleme tabi tutuldu. Ardından bu karışım yine kit içeriğinde yer alan reaksiyon tamponu (4 µl), RNaz inhibitörü (0,5 µl) ve 'EasyScriptRTase' enzimi (1 µl) ile birleştirildi. Böylece bir tüpteki son hacim 20 µl oldu ve 50°C'de 50 dk inkübe edilerek cDNA sentezlendi. Süre sonunda, enzim inhibe edilmek üzere 85°C'de 5 dk bekletildi. Sentezlenen cDNA'lar RT-PZR yapılmak üzere -20°C'de saklandı. cDNA sentez karışımı ve prosedürü Tablo 1'de verilmektedir.

Tablo 1:cDNA sentez karışımı ve prosedürü

| | Hacim | Son Hacim |
|--|--------------|------------------|
| Total RNA | 1 µl | 2 µg/ml |
| Oligo(dT) primer | 1 µl | 0,5 µM |
| dNTP karışımı (10nM) | 1 µl | 500 µM |
| RNAaz içermeyen su | Değişken | 14,5 µl |
| Karışım hazırlandıktan sonra 5 dakika 65°C ısıtıcıda beklenir. | | |
| 5X RT tamponu | 4µl | 1X |
| Ribonükleaz inhibitörü (40U/µl) | 0,5 µl | 20 U/rxn |
| ReverseTranskriptazenzimi(200U/µl) | 1 µl | 200 U/rxn |
| Toplam Hacim | 20 µl | |

2.2.1.8 Gerçek Zamanlı PZR

Gerçek zamanlı PZR reaksiyonları GM SYBR qPZRKit'i kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı. Primer ve cDNA miktarları laboratuvarımızda uygun olarak optimize edildi. Sonuçlar ise 'Exicycler3' programıkullanılarak "housekeeping" geni olan β-aktin'e göre normalize edildi. Deneylerde kullanılan primer listesi Tablo 4'de, PZR uygulama koşulları Tablo 2'de, sıcaklık, döngü ve zamanları ise Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 2:RT-PZR koşulları

| Bileşenler | Reaksiyon Karışımı |
|-------------------------|--------------------|
| GM SYBRqPZRMix | 12,5 µl |
| İleri Primer (10 pm) | 0,6 µl |
| Geri Primer (10 pm) | 0,6 µl |
| cDNA (1:5 seyreltilmiş) | 5 µl |
| dH ₂ O | 6,3 µl |

Tablo 3:PZR sıcaklık, döngü ve zamanları

| Döngü | Sıcaklık | Süre |
|-----------------|-------------------|-------|
| Ön Denatürasyon | 95 ⁰ C | 5 dk |
| Denatürasyon | 95 ⁰ C | 20 sn |
| Yapışma | X ⁰ C | 20 sn |
| Uzama | 72 ⁰ C | 25 sn |
| Döngü Sayısı | 40 Döngü | |

Tablo 4:Çalışmada kullanılan primer dizileri ve sıcaklıkları

| Primer | İleri Primer (5'->3') | Geri Primer (5'->3') | Sıcaklık |
|--------|-------------------------|------------------------|----------|
| APP | GCCCTGCGGAATTGACAAG | CCATCTGCATAGTCTGTGTCTG | 62 |
| PSEN1 | GCAGTATCCTCGCTGGTGAAGA | CAGGCTATGGTTGTGTCCAGTC | 54.5 |
| PSEN2 | GCTGTTTGTGCCTGTCACTCTG | TGTGTCCTCAGTGAATGGCGTG | 54.5 |
| APOE | GGGTCGCTTTTGGGATTACCTG | CAACTCCTTCATGGTCTCGTCC | 54.5 |
| CLU | TGCGGATGAAGGACCAGTGTGA | TTTCCTGGTCAACCTCTCAGCG | 54.5 |
| CR1 | TAGGTGTCAGCCTGGCTTTGTC | GACATCTGGAGGTGGCTGACAT | 54.5 |
| PICALM | GGCAGCATTAGAGGAAGAACAGG | CTGCTGAGGTGGATACAGGAGA | 54.5 |
| BIN1 | CGTCAACACGTTCCAGAGCATC | CTTGACCGTGAAGGTGTTGCTC | 54.5 |
| ABCA7 | CACTCTCCGAGAGCTAGACAC | CTCCATATCTGTGTCCGCAGCA | 54.5 |
| MS4A1 | CTGGTCCAAAACCACTTTCAGG | GGCAATGTGGAAGAGCCCATTC | 54.5 |
| CD33 | GTGACTACGGAGAGAACCATCC | GCTGTAACACCAGCTCCTCAA | 54.5 |
| CD2AP | CCAAAGCCTGAACTGATAGCTGC | GGACTTGTGGAGCTGCTGGTTT | 54.5 |
| SORL1 | GAACACCTGTCTTCGCAACCAG | TGTCCAGGTCACAGATGGTGGT | 54.5 |
| MMP9 | GGGACGCAGACATCGTCATC | TCGTCATCGTCGAAATGGGC | 62 |

2.2.3 İstatistiksel Analiz

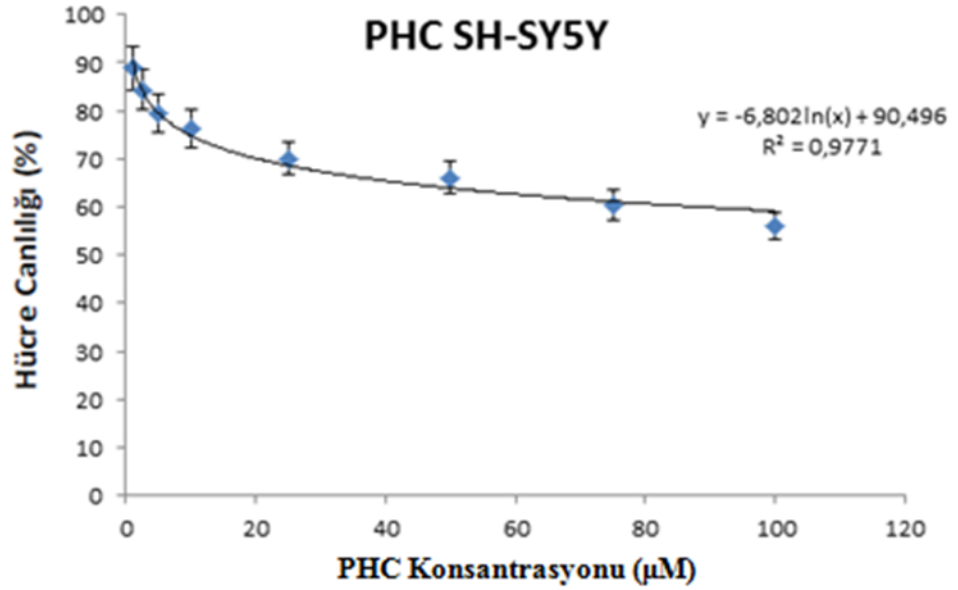
Elde edilen sonuçlar her biri veri için Ortalama \pm Standart Sapma olarak ifade edildi. qRT-PCR veri analizleri Qiagen firmasının ücretsiz olarak sağladığı RT2 Profiller PCR Array Data Analysis v3.5 ile web üzerinden çevrim içi gerçekleştirildi. (*) ile işaretlenen genler +2 üzerinde ve -2 altındaki verileri anlamlı olarak kabul gösteren genlerdir.

3. SONUÇLAR

3.1 Sentezlenen Bileşikler ve Ekstraktın SH-SY5Y Hücre Hattında Hücre Canlılığına Etkisi

3.1.1 4-Propyl-8-Hydroxy Coumarin (PHC) Bileşiğinin Hücre Canlılığına Etkisi

Sitotoksisite testi için farklı konsantrasyonlarda PHC bileşiği %10 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya (1 x 10³/kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi 24 saat süresince bu bileşiğin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakıldı. Yukarıda anlatıldığı gibi kristal viyole canlılık testi yöntemi kullanılarak ileriki deneylerde kullanacağımız PHC dozları belirlendi (Şekil 5).

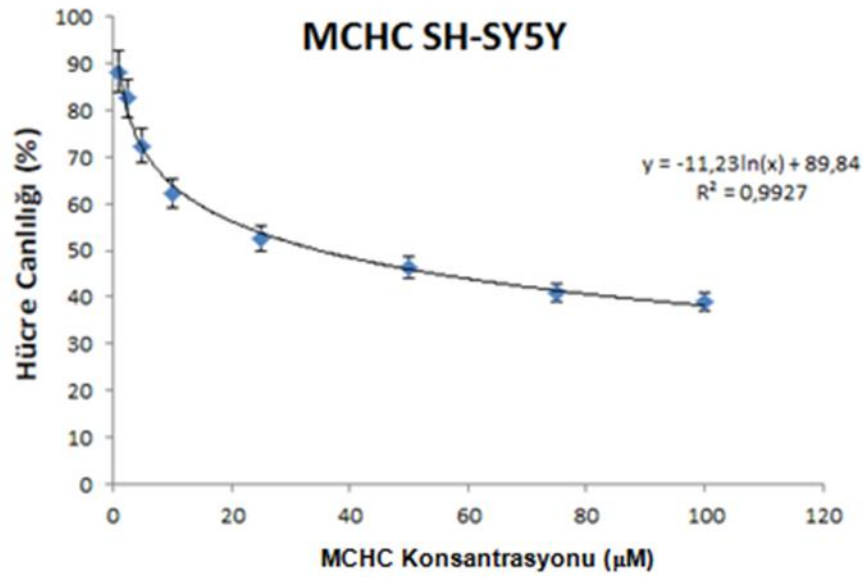


Şekil 5: PHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.

Yapılan sitotoksosite deneyi sonucunda ileriki çalışmalar için EC₀₄ ve EC₀₈ dozları bu bileşik için sırayla 0.8 µM ve 1.05 µM olarak belirlendi ve ileri ki çalışmalar için bu iki doz kullanıldı.

3.1.2. Methyl-2-(2-oxo-4-propyl-2H-chromen-7yl)oxy)acetyl)hydrazine-1-carbodithioate (MCHC) Bileşiğinin Hücre Canlılığına Etkisi

Sitotoksosite testi için farklı konsantrasyonlarda MCHC bileşiği %10 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya (1x10³/kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. Yukarıda anlatıldığı gibi kristal viyole canlılık testi yöntemi kullanılarak ileriki deneylerde kullanacağımız MCHC dozları belirlendi (Şekil 6).

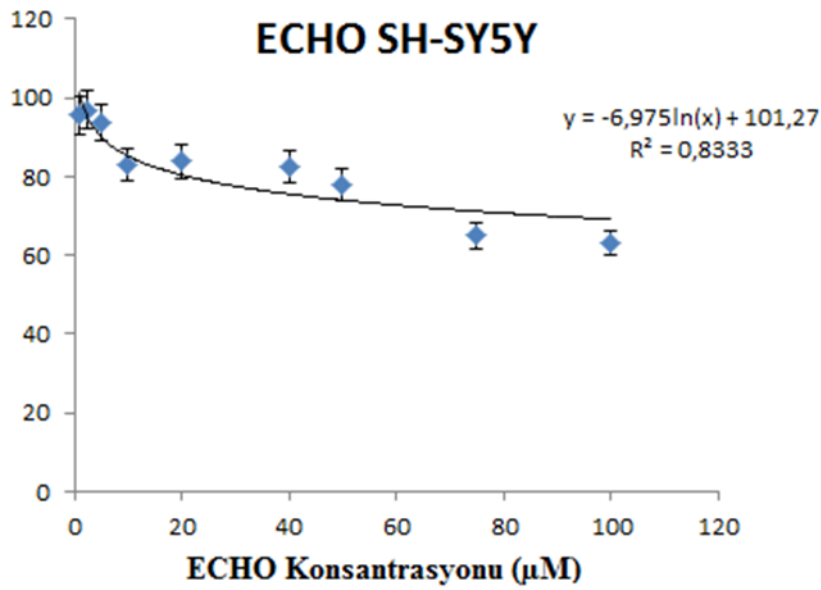


Şekil 6: MCHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.

Yapılan sitotoksosite deneyi sonucunda ileriki çalışmalar için EC₀₄ ve EC₀₈ dozları bu bileşik için sırayla 0.45 µM ve 0.75 µM olarak belirlendi ve sonraki çalışmalarda bu iki doz kullanıldı.

3.1.3 7-Etoksi-4-propyl-2H-chromen-2-one (ECHO) Bileşiğinin Hücre Canlılığına Etkisi

Sitotoksisite testi için farklı konsantrasyonlarda 7-ethoxy-4-propyl-2H-chromen-2-one bileşiği %10 aseton'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya (1×10^3 /kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. Yukarıda anlatıldığı gibi kristal viyole canlılık testi yöntemi kullanılarak ileriki deneylerde kullanacağımız ECHO bileşiğinin dozları belirlendi (Şekil 7).



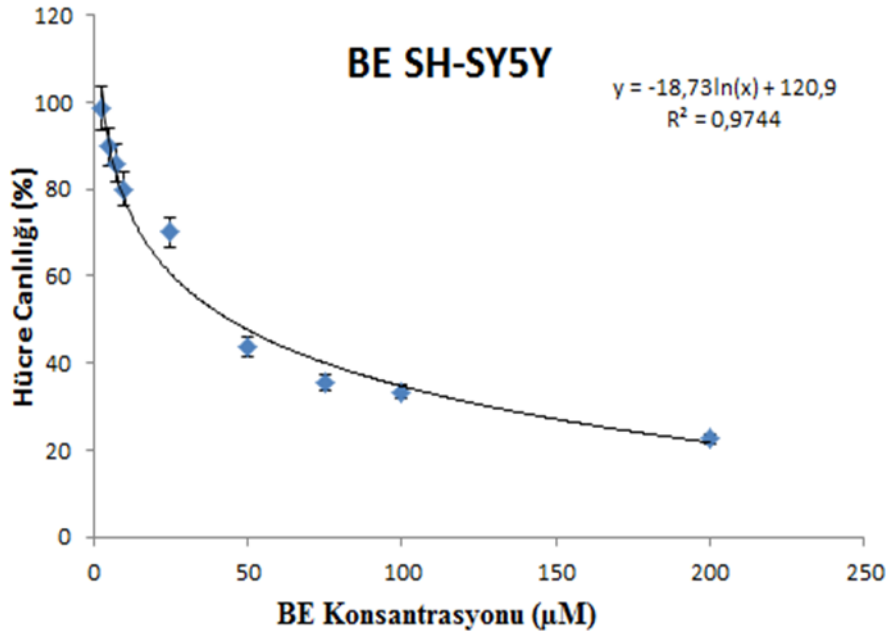
Şekil 7: ECHO bileşiğinin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi

Yapılan sitotoksisite deneyi sonucunda ileriki çalışmalar için EC04 ve EC08 dozları bu bileşik için sırayla 3.28 µM ve 4.75 µM olarak belirlendi ve sonraki çalışmalar için bu iki doz kullanıldı.

3.1.4. Biberiye (*Rosmarinus officinalis*) Ekstraktının (BE) Hücre Canlılığına Etkisi

Sitotoksisite testi için farklı konsantrasyonlarda biberiye ekstaktı (BE) %40 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya (1×10^3 /kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz

bırakıldı. Yukarıda anlatıldığı gibi kristal viyole canlılık testi yöntemi kullanılarak sonraki deneylerde kullanacağımız BE dozu dozlar belirlendi (Şekil 8).



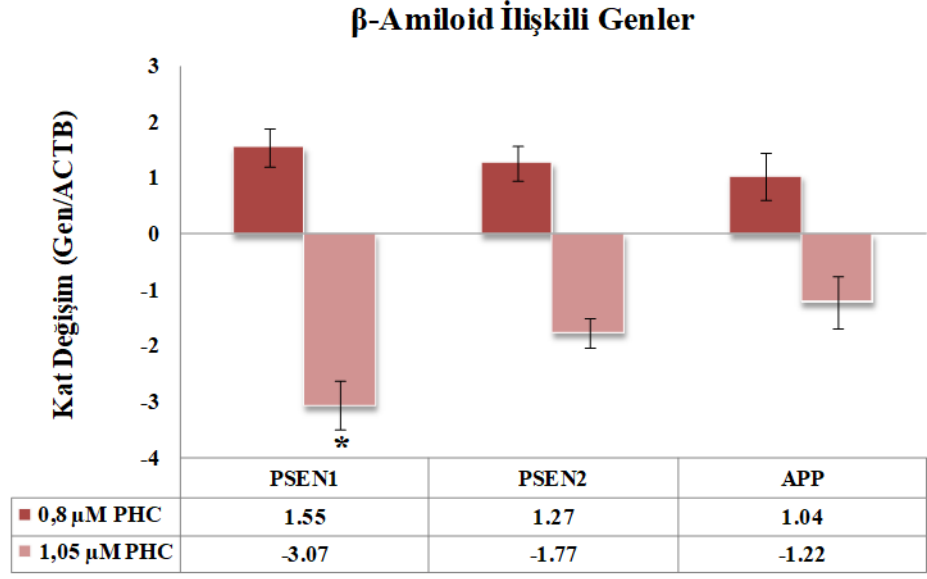
Şekil 8: BE'nin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi

Yapılan sitotoksosite deneyi sonucunda ileriki çalışmalar için EC04 ve EC08 dozları bu ekstrakt için sırayla 3.75 µM ve 4.70 µM olarak belirlendi ve ileriki çalışmalar için bu iki doz kullanıldı.

3.2 Sentezlenen Bileşikler ve Ekstraktın SH-SY5Y Hücre Hattında Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Olan Etkisi

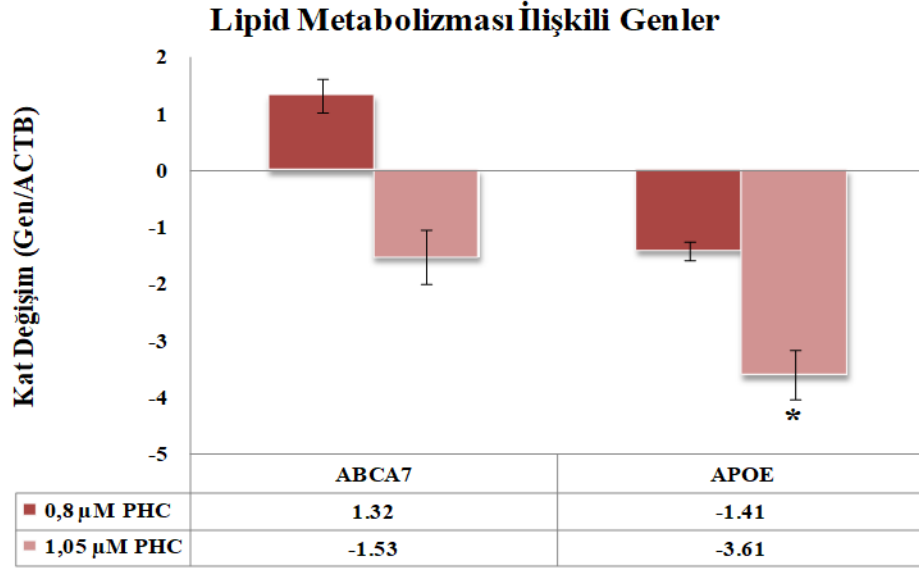
3.2.1 4-Propyl-8-Hydroxy Coumarin (PHC) Bileşiğinin SH-SY5Y Hücre Hattında Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Olan Etkisi

Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendi ve hücrelere belirlenen dozda kumarin türevi PHC bileşiği uygulandı. 24 saat inkübasyonun sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar ile belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı. Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar β-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı (Şekil 9-13).



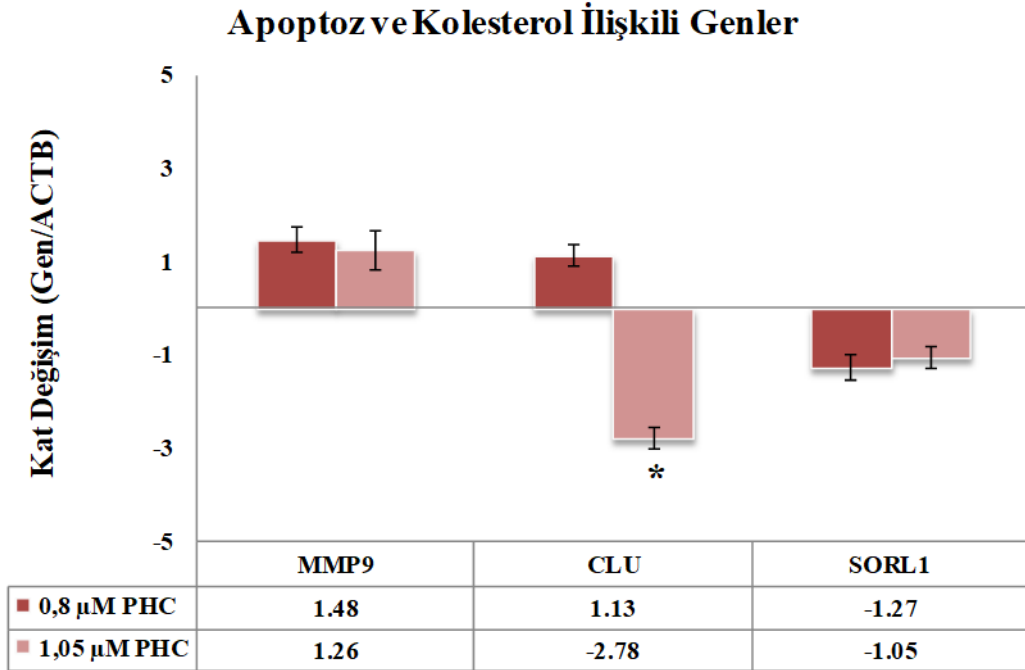
Şekil 9: Kumarin türevi PHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PSEN1, PSEN2 ve APP genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı

SH-SY5Y hücre hattında PHC bileşiğinin PSEN1 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 1,05 μ M doz uygulanmasında 3,07 kat azalma görüldü.



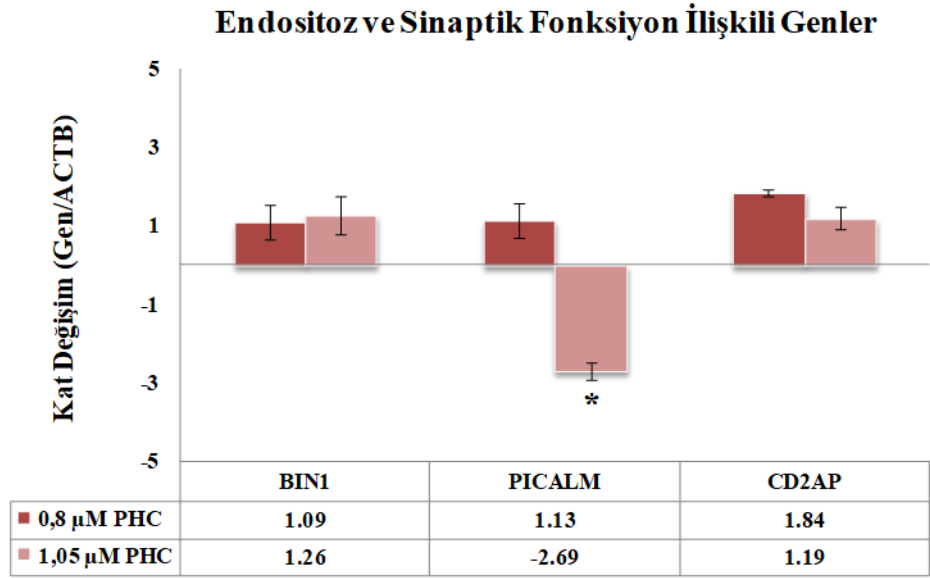
Şekil 10: Kumarin türevi PHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında ABCA7 ve APOE genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı.

SH-SY5Y hücre hattında PHC bileşiğinin 1,5 μ M doz uygulanmasında APOE geninin mRNA ekspresyon düzeyinde 3,61-kat azalma gözlemlendi.



Şekil 11: Kumarin türevi PHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında MMP9, CLU ve SORL1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı.

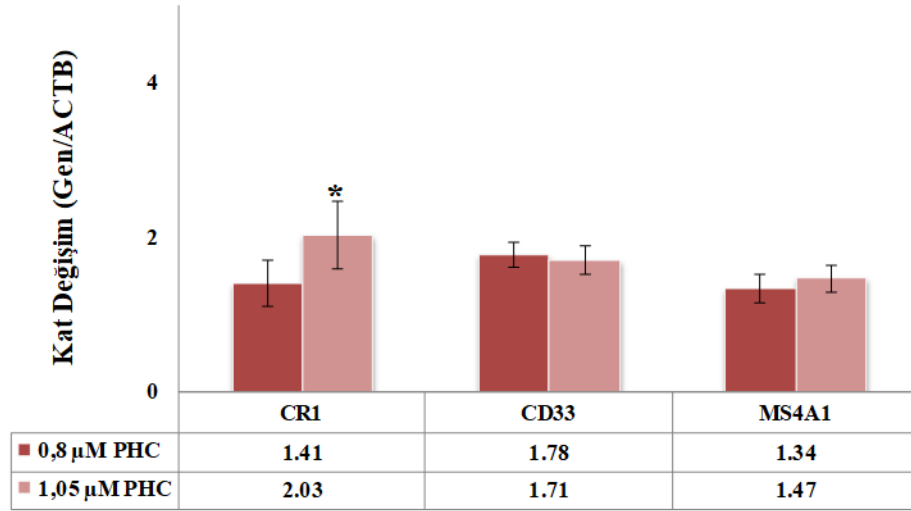
SH-SY5Y hücre hattında PHC bileşiminin CLU geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 0,8 μ M dozunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmazken, 1,05 μ M dozunun uygulanması ile 2,78-kat anlamlı artış sağladığı gözlemlendi. Bu grupta çalışılan diğer iki gende anlamlı herhangi bir değişim gözlenmedi.



Şekil 12: Kumarin türevi PHC bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında BIN1, PICALM ve CD2AP geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı

SH-SY5Y hücre hattında PHC bileşiminin BIN1 ve CD2AP genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde 0,8 μ M ve 1,05 μ M dozlarının uygulanmasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı farka rastlanmazken; PICALM geninin mRNA ekspresyon düzeyinde 1,05 μ M PHC uygulanması ile 2,29-kat anlamlı azalış görüldü.

Nöroinflamasyon ve İmmun Yanıt İlişkili Genler

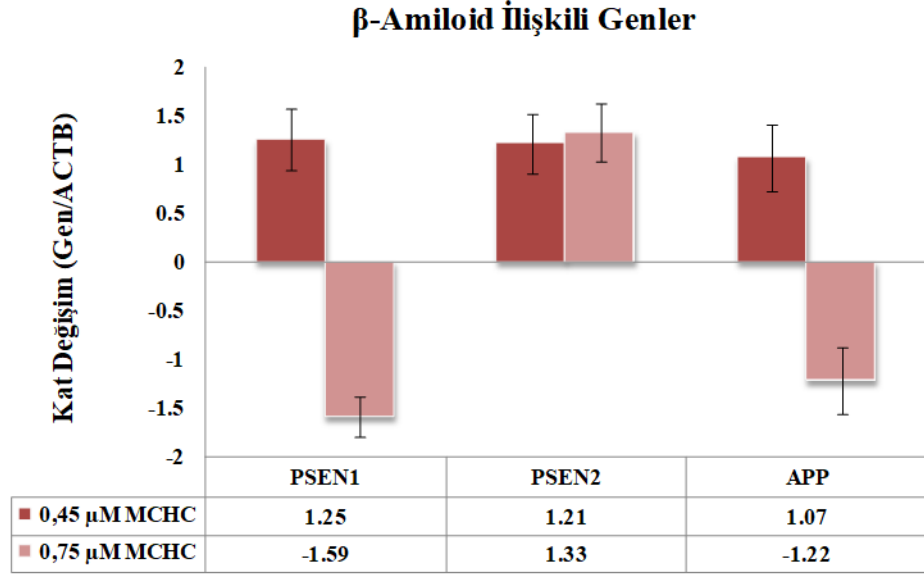


Şekil 13: Kumarin türevi PHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CR1, CD33 ve MS4A1 genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı.

Bu grup genlerden sadece CR1 geni mRNA ekspresyon düzeyinde yüksek doz PHC uygulaması sonucunda 2,35 kat artış gözlemlendi.

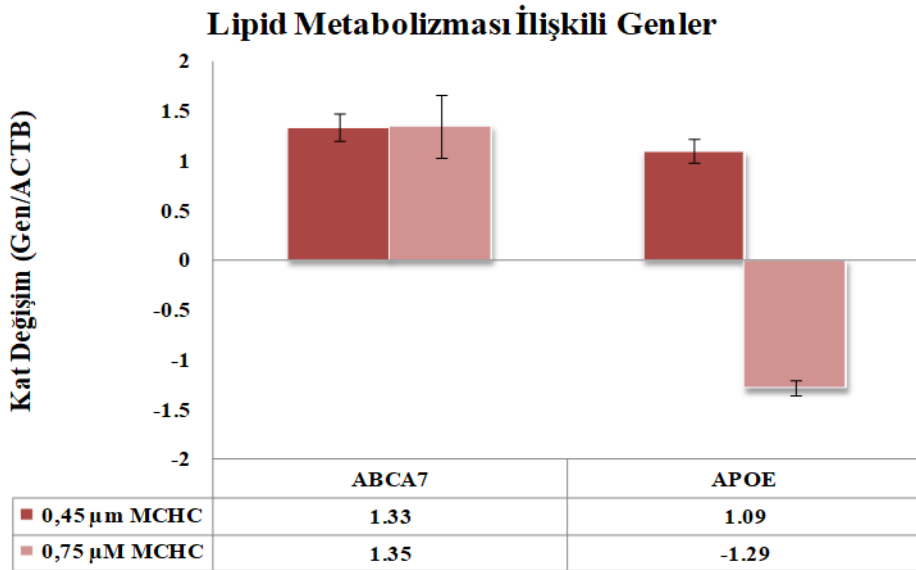
3.2.2 Methyl 2-(2-((2-oxo-4-propyl-2H-chromen-7-yl)oxy)acetyl)hydrazine-1-carbodithioate (MCHC) Bileşiğinin SH-SY5Y Hücre Hattında Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Olan Etkisi

Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendi ve hücrelere belirlenen dozda MCHC bileşiği uygulandı. 24 saat inkübasyonun sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar ile belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı. Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı (Şekil 14-18).



Şekil 14: Kumarin türevi MCHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PSEN1, PSEN2 ve APP genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı.

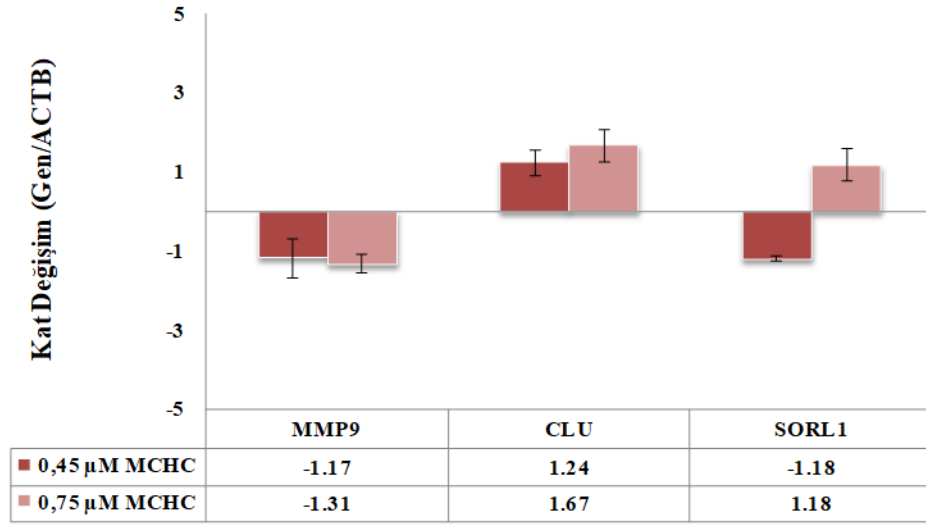
Çalışılan genlerde MCHC bileşiği uygulanması ile istatistiksel olarak anlamlı bir artış ya da azalış görülmedi.



Şekil 15: Kumarin türevi MCHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında ABCA7 ve APOE geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı.

SH-SY5Y hücre hattında MCHC bileşiğinin ABCA7 ve APOE genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde gözlenen değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir.

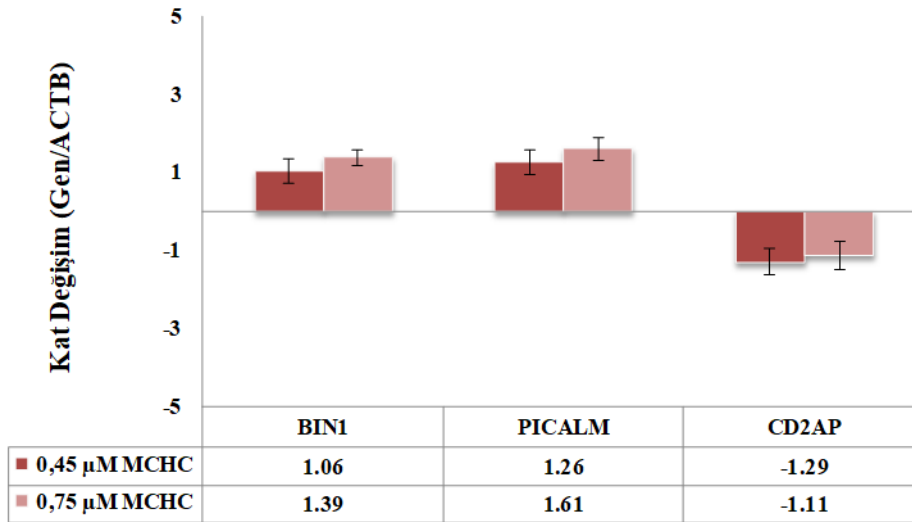
Apoptoz ve Kolesterol İlişkili Genler



Şekil 16: Kumarin türevi MCHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında MMP9, CLU ve SORL1 genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı.

SH-SY5Y hücre hattında MCHC bileşiği bu grup çalışılan genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmadı.

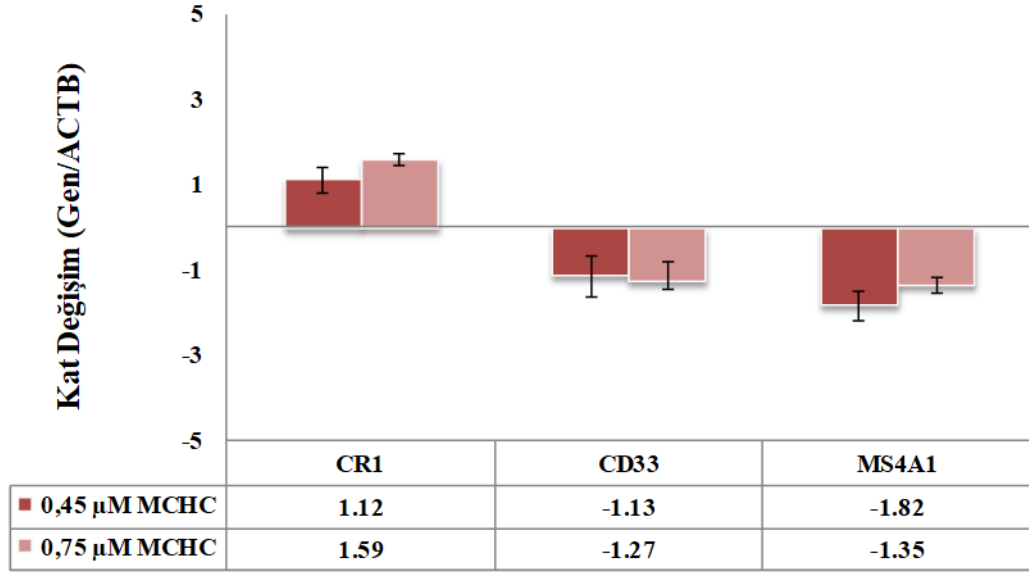
Endositoz ve Sinaptik Fonksiyon İlişkili Genler



Şekil 17: Kumarin türevi MCHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında BIN1, PICALM ve CD2AP genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı.

SH-SY5Y hücre hattında MCHC bileşiğinin BIN1, PICALM ve CD2AP genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana getirdiği değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Nöroinflamasyon ve İmmun Yanıt İlişkili Genler

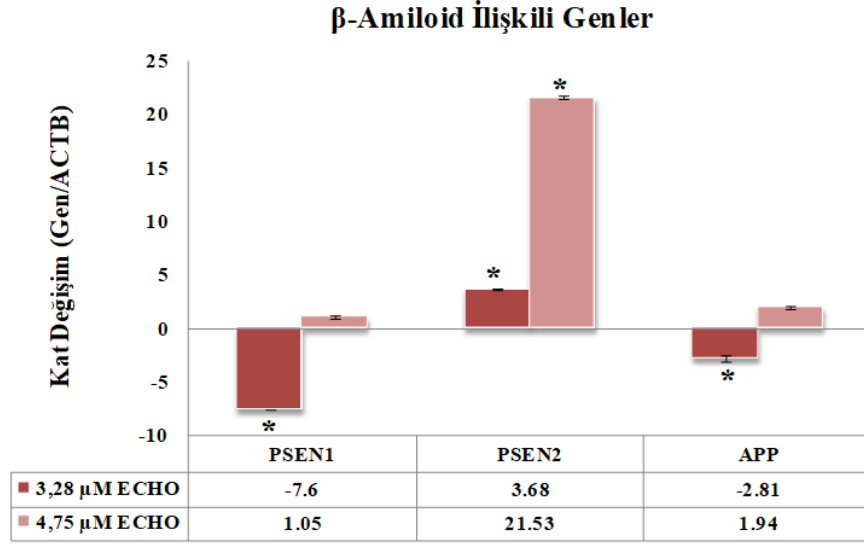


Şekil 18: Kumarin türevi MCHC bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CR1, CD33 ve MS4A1 genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı.

SH-SY5Y hücre hattında MCHC bileşiğinin CR1, CD33 ve MS4A1 genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmedi.

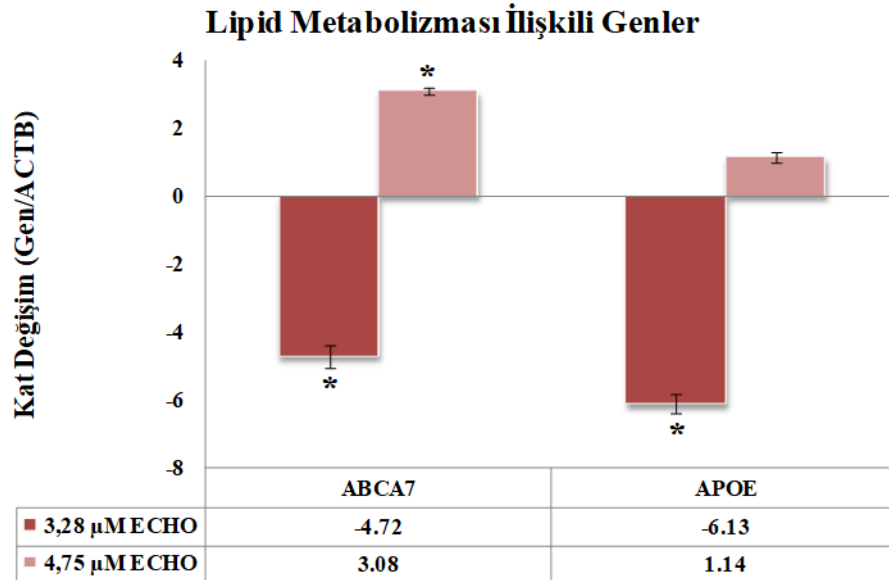
3.2.3 7-Ethoxy-4-propyl-2H-chromen-2-one Bileşiğinin SH-SY5Y Hücre Hattında Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Olan Etkisi

Sitotoksisite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendi ve hücrelere belirlenen dozda 7-ethoxy-4-propyl-2H-chromen-2-one bileşiği uygulandı. 24 saat inkübasyonun sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar ile belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı. Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (Şekil 19-23).



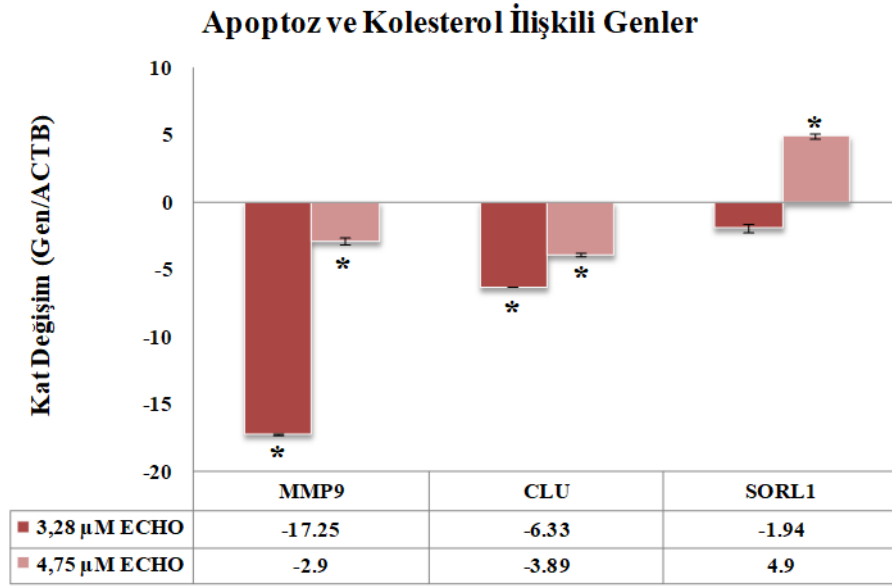
Şekil 19: Kumarin türevi ECHO bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PSEN1, PSEN2 ve APP genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı.

SH-SY5Y hücre hattında ECHO bileşiğinin 3,28 μ M dozunda geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak PSEN1 geninde 7,6 kat anlamlı azalışa neden olurken, APP geninde 2,81 -kat anlamlı azalış sağladığı gözlemlendi. PSEN2 geninde ise 3,28 μ M dozunda 3,68 kat artış ve 4,75 μ M dozunda 21,53 kat anlamlı artış görüldü.



Şekil 20: Kumarin türevi ECHO bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında ABCA7 ve APOE genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı.

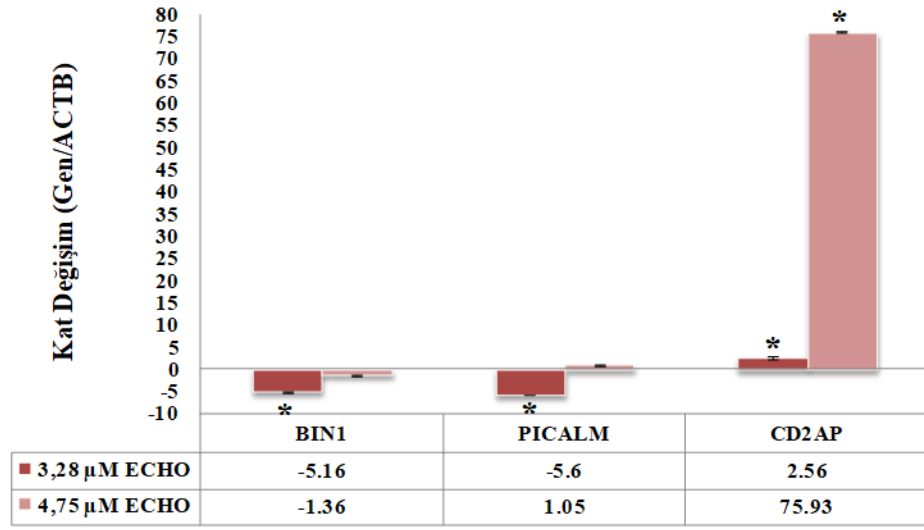
SH-SY5Y hücre hattında ECHO bileşiğinin 3,28 μM dozunda geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak ABCA7 geninde 4,72 kat anlamlı azalışa neden olurken, APOE geninde 6,13 -kat anlamlı azalış gözlemlendi. Yüksek doz ise sadece ABCA7 geninde 3,08 kat azalış saptandı.



Şekil 21: Kumarin türevi ECHO bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında ABCA7 v, CLU ve SORL1 genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı

SH-SY5Y hücre hattında ECHO bileşiğinin 3,28 μM dozlarının uygulanmasında mRNA ekspresyon düzeylerinde MMP9 geninde 17,25 kat ve CLU geninde 6,33 kat anlamlı azalışa rastlandı. 4,75 μM dozlarının uygulanmasında ise MMP9 geninde 2,9 kat anlamlı, CLU geninde 3,89 kat anlamlı azalış görülürken SORL1 geninde 4,9 kat anlamlı artış gözlemlendi.

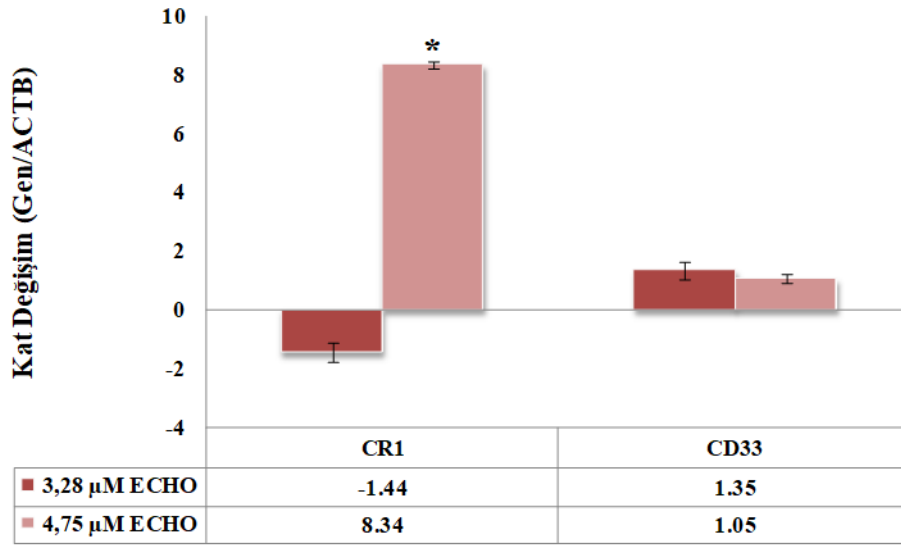
Endositoz ve Sinaptik Fonksiyon İlişkili Genler



Şekil 22: Kumarin türevi ECHO bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında ABCA7, CLU ve SORL1 genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı.

SH-SY5Y hücre hattında ECHO bileşiğinin 3,28 μ M dozlarının uygulanmasında BIN1 geninde 5,16 kat ile PICALM geninde 5,6 kat olarak anlamlı azalışa ve CD2AP geninde 2,56 kat mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak artışa saptandı. 4,75 μ M dozlarının uygulanmasında ise CD2AP geninde mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak 75,93 kat anlamlı artış gözlemlendi.

Nöroinflamasyon ve İmmun Yanıt İlişkili Genler

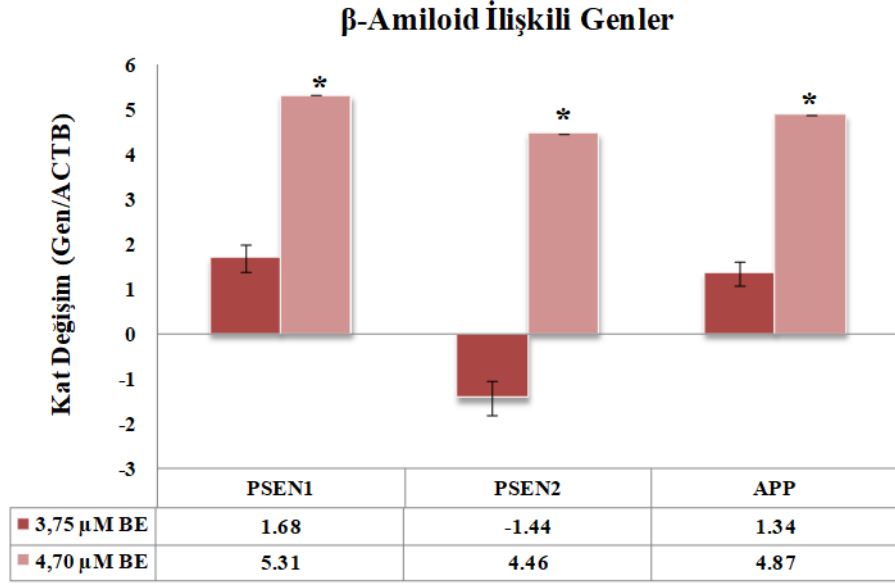


Şekil 23: Kumarin türevi ECHO bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CR1 ve CD33 genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı.

SH-SY5Y hücre hattında ECHO bileşiğinin CD33 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 3,75 μ M ve 4,70 μ M dozlarının uygulanmasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı farka rastlanmazken; CR1 geninin mRNA ekspresyon düzeyinde 4,75 μ M dozunda ECHO uygulanması ile 8,34 kat anlamlı artış görüldü.

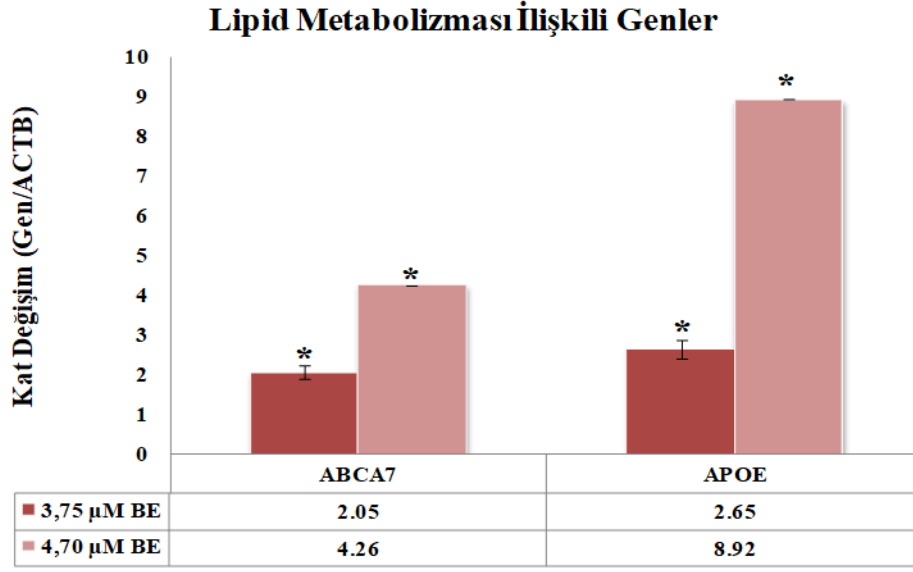
3.1.4 Biberiye (*Rosmarinus officinalis*) Ekstraktının (BE) SH-SY5Y Hücre Hattında Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Olan Etkisi

Sitotoksite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendi ve hücrelere belirlenen dozda *Rosmarinus officinalis* ekstraktı uygulandı. 24 saat inkübasyonun sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar ile belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı. Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı (Şekil 24-28).



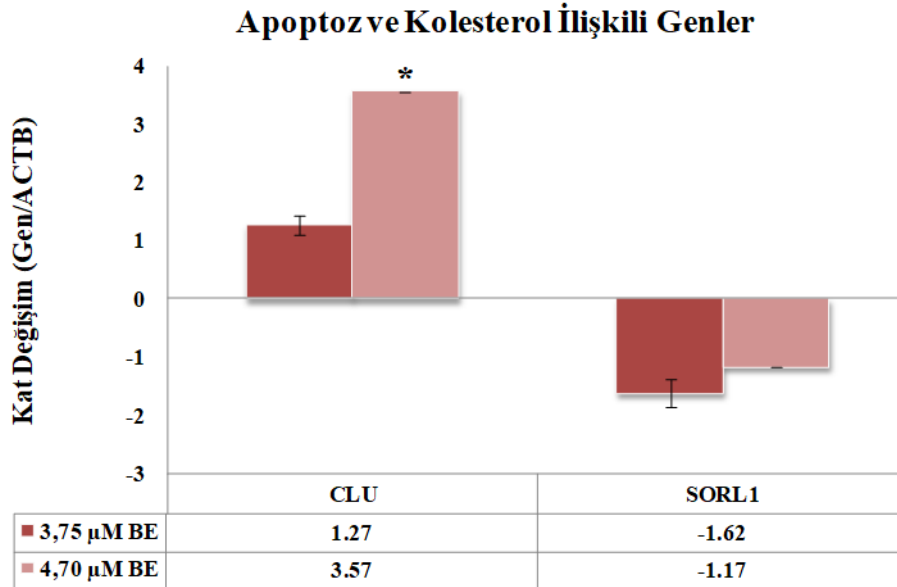
Şekil 24: BE'nin SH-SY5Y hücre hattında PSEN1, PSEN2 ve APP geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı. .

SH-SY5Y hücre hattında BE'nin 3,75 μ M dozlarının uygulanmasında PSEN1, PSEN2 ve APP genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı farka rastlanmazken; 4,70 μ M BE uygulanmasında PSEN1 geninde 5,31-kat anlamlı PSEN2 geninde 4,46 kat anlamlı ve APP geninde 4,87 kat mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı artış saptandı.



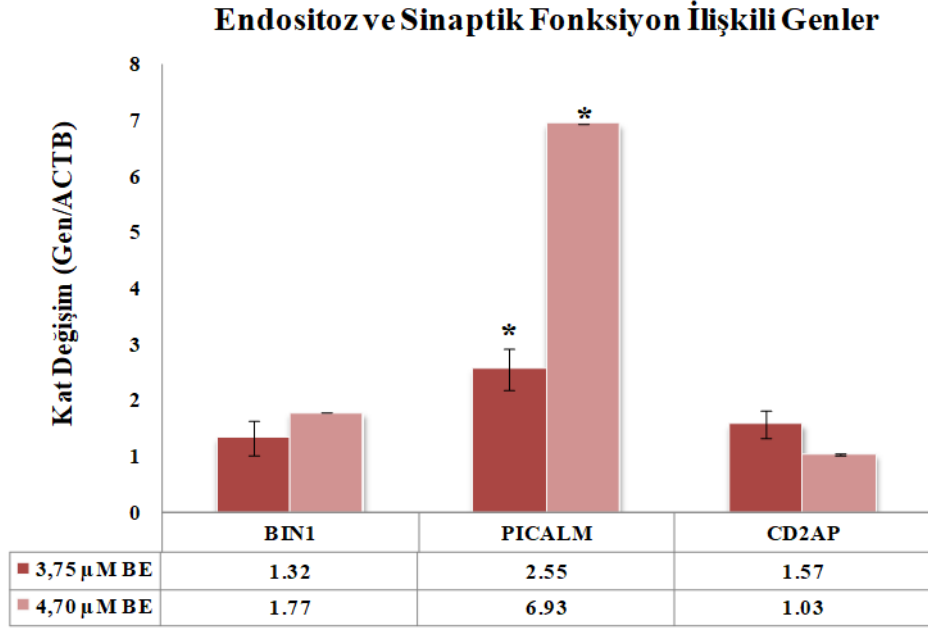
Şekil 25: BE'nin SH-SY5Y hücre hattında ABCA7 ve APOE geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı. .

SH-SY5Y hücre hattında BE'nin 3,75 μ M dozlarının uygulanmasında ABCA7 geninde 2,05 kat ile APOE geninde 2,65 kat olarak anlamlı mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak artışa saptandı. Ayrıca 4,70 μ M dozlarının uygulanmasında ise ABCA7 geninde 4,26 kat ve APOE geninde 8,92 kat mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi.



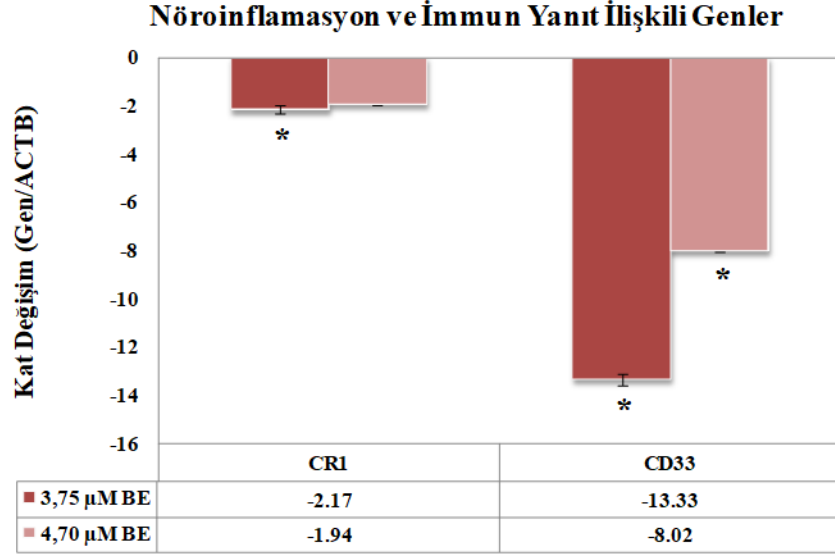
Şekil 26: BE'nin SH-SY5Y hücre hattında CLU geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı.

SH-SY5Y hücre hattında BE uygulamasında 3,75 μ M dozunda mRNA ekspresyonu seviyeleri anlamlı farklılığa rastlanmazken; 4,70 μ M dozunda CLU geninde 3,57 kat mRNA ekspresyonu seviyeleri anlamlı artış bulundu.



Şekil 27: BE'nın SH-SY5Y hücre hattında BIN1, PICALM ve CD2AP geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı.

SH-SY5Y hücre hattında BE uygulamasında BIN1 ve CD2AP genlerinde mRNA ekspresyon düzeylerinde 3,75 μ M ve 4,70 μ M dozlarının uygulanmasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı fark saptanmazken; PICALM geninin mRNA ekspresyon düzeyinde 3,75 μ M dozunda 2,5 kat ile 4,70 μ M dozunda 6,93 kat anlamlı artış görüldü.



Şekil 28: BE'nin SH-SY5Y hücre hattında CR1 ve CD33 geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı.

SH-SY5Y hücre hattında BE uygulaması CD33 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 3,75 μ M dozunda 13,33 kat ve 4,70 μ M dozlarının uygulanmasında 8,02 kat anlamlı azalış saptanırken, CR1 geninin sadece 3,75 μ M dozunda mRNA ekspresyon düzeylerinde 2,17 kat azalış gözlemlendi.

Elde edilen sonuçlar PHC bileşiği için Tablo 5'de, MCHC bileşiği için Tablo 6'da, ECHO bileşiği için Tablo 7'de ve biberiye ekstraktı için Tablo 8 'de verilmiştir.

Tablo 5: PHC bileşiğinin uygulaması sonucunda belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler. ■; mRNA seviyesinde meydana gelen artma, ■ mRNA seviyesinde meydana gelen azalma

| Genler | SH-SY5Y | |
|--------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| | EC ₀₄ (0,8 μ M) | EC ₀₈ (1,05 μ M) |
| PSEN1 | 1,5502 | -3,0791 |
| PSEN2 | 1,3996 | -1,9185 |
| APOE | -0,40005 | -3,6177 |
| CLU | 1,2037 | -2,8979 |

| | | |
|---------------|----------------|-----------------|
| PICALM | 1,1364 | -2,6991 |
| ABCA7 | 1,3264 | -1,53075 |
| MS4A1 | 1,3449 | 2,35 |
| CR1 | 1,40705 | 2,03 |
| BIN1 | 1,09125 | 1,06 |
| MMP9 | 1,482 | 1,268 |
| APP | 1,3684 | -1,2226 |
| CD33 | 1,7839 | 1,7112 |
| CD2AP | 1,8404 | 1,1975 |
| SORL1 | -1,2746 | -1,0515 |

Tablo 5: MCHC bileşigi uygulaması sonucunda belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler

| Genler | SH-SY5Y | |
|---------------|--|--|
| | EC₀₄ (0,45 µM) | EC₀₈ (0,75 µM) |
| PSEN1 | 1,25 | -1,59 |
| PSEN2 | 1,21 | 1,33 |
| APOE | 1,12 | -1,29 |
| CLU | -1,7 | 1,35 |
| PICALM | -1,4 | 1,24 |
| ABCA7 | 1,13 | 1,30 |
| MS4A1 | -1,42 | 1,56 |
| CR1 | 1,3 | 1,33 |

| | | |
|--------------|--------------|--------------|
| BIN1 | -1,04 | 1,3 |
| MMP9 | -1,27 | -1,34 |
| APP | 1,07 | -1,22 |
| CD33 | 1,02 | 1,09 |
| CD2AP | 1,79 | 1,21 |
| SORL1 | -1,18 | 1,36 |

Tablo 6: ECHO bileşiminin uygulaması sonucunda belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler. ■; mRNA seviyesinde meydana gelen artma, ■; mRNA seviyesinde meydana gelen azalma

| Genler | SH-SY5Y | |
|---------------|---------------------------|-----------------------------|
| | EC04 (3,28 µM) | EC08 (4,75 µM) |
| PSEN1 | -7,6 | 1,05 |
| PSEN2 | 3,68 | 21,53 |
| APOE | -6,13 | 1,14 |
| CLU | -6,33 | -3,89 |
| PICALM | -5,6 | 1,05 |
| ABCA7 | -4,72 | 3,08 |
| CR1 | -1,44 | 8,34 |
| BIN1 | -5,16 | -1,36 |
| MMP9 | -17,25 | -2,9 |
| APP | -2,81 | 1,94 |
| CD2AP | 1,79 | 1,21 |
| CD33 | 1,35 | 1,05 |
| SORL1 | 1,22 | 1,36 |

Tablo 7: BE uygulaması sonucunda belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler. ■; mRNA seviyesinde meydana gelen artma, ■; mRNA seviyesinde meydana gelen azalma

| Genler | SH-SY5Y | |
|--------|-------------------|-------------------|
| | EC04 (3,75 µM) | EC08 (4,70 µM) |
| PSEN1 | 1,68 | 5,31 |
| PSEN2 | -1,44 | 4,46 |
| APOE | 2,65 | 8,92 |
| CLU | 1,27 | 3,57 |
| PICALM | 2,55 | 6,93 |
| ABCA7 | 2,05 | 4,26 |
| CR1 | -2,17 | -1,94 |
| BIN1 | 1,32 | 1,77 |
| APP | 1,34 | 4,87 |
| CD33 | -13,33 | -8,02 |
| CD2AP | 1,57 | 1,03 |
| SORL1 | -1,62 | -1,17 |

4. TARTIŞMA

Demansın en yaygın şekli olan AH, hafıza kaybına neden olan sinaps kaybı, nörodejenerasyon ile ilişkili A β plaklar, nörofibrilerde birikintiler (düğümler) ve diğer bilişsel problemler ile karakterize karmaşık karakterli bir hastalıktır. Hastalığın patolojisini tanımlamak için çeşitli hipotezler ortaya atılmıştır. AH patogenezinin yaygın teorisi olan amiloit hipotezine göre, APP'nin proteolitik kesimi sonucunda oluşan A β peptit agregatlarıyla oluşan amiloit plaklarının AH patolojisinin merkezinde olduğunu savunulmaktadır (Mohandas ve diğ. 2017). Amiloit, β -tabaka yapısı bakımında zengin, çözünmez, yanlış katlanmış protein agregatlarından oluşur. Amiloit yolak hipotezi, A β agregasyonunun artmasını ve A β klerensinin azalmasını hastalığın temel nedeni olarak kabul ederken; tau hipotezi, çözünmeyen plak ve patojenik A β birikiminin taunun hiperfosforile olmasına yol açarak nöron ölümüne sebep olduğunu esas alan tau patolojisini hastalığın temel nedeni olarak kabul etmektedir (Hardy ve Higgins 1992). Kolinerjik hipotez ise hastalığın AChE ile hidroliz olan asetilkolinin ACh eksikliğinden kaynaklandığını ileri sürer (Dong ve diğ. 2009). AH tedavisi için kullanılan farmakolojik ajanların birçoğu kolinerjik hipotez teorisini temel alarak geliştirilmiştir. Bu hipoteze göre geliştirilip kullanılan takrin, rivastigmin, donepezil ve galantamin bileşikleri kolinesterazları inhibe etmek suretiyle ACh konsantrasyonunu arttırarak etki göstermektedirler (Briggs ve diğ. 2016). Kolinesteraz inhibitörlerinden farklı olan Memantin ise NMDA reseptörlerine etki ederek glutamat aracılı eksitotoksisiteyi inhibe eder (Danysz ve diğ. 2000). Tüm bu ilaçlar fonksiyonel, bilişsel ve AH'ın davranışsal belirtileri üzerinde semptomatik etkiler göstermektedir. Ancak bu ilaçlar son derece sınırlıdır, hastalığın ilerlemesini durduracak veya hastalığın iyileşmesini sağlayacak etkinliğe sahip değildirler. Bu nedenle AH tedavisinde kullanılabilecek yeni ilaçların keşfedilmesi ve etkilerinin incelenmesi oldukça önemlidir.

Son zamanlarda, çeşitli hastalıkların tedavisinde bitkisel kaynaklı ilaçlara olan ilgi yaygın olarak artmaktadır. Bu tez çalışmasında Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dekanı ve Farmakognozi Anabilim Dalı. Öğretim Üyesi Prof. Dr. İlky ERDOĞAN ORHAN'ın laboratuvarı ile olan ortak çalışmamız sonucunda yurtdışından temin edilen yeni kumarin türevi bileşiklerin anti-Alzheimer etkinlikleri insan nöroblastom hücre hattı (SH-SY5Y) kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. AH'ın araştırılmasında yaygın olarak kullanılan SH-SY5Y hücreleri kendiliğinden amiloit prekürsör protein üretebilen, yaşlanmış bireylerin beyninde bulunan ve AH gibi nörodejeneratif hastalıktan etkilenmiş, tamamen farklılaşmış hücreleri bazı yönlerden taklit ettiği bildirilmiştir (Stockburger ve diğ. 2014). Bu bilgiler doğrultusunda SH-SY5Y hücre hattını kullanmayı tercih ettik.

Tez kapsamında yeni ve doğal bir bileşik olan 14-Propyl-8-Hydroxy Coumarin (PHC), Methyl 2-(2-((2-oxo-4-propyl-2H-chromen-7-yl)oxy)acetyl)hydrazine-1-carbodithioate (MCHC), 7-ethoxy-4-propyl-2H-chromen-2-one (ECHO) bileşikleri ve *Rosmarinus officinalis* ekstraktının toksik olmayan en güvenilir dozlarının (~EC05-09), SH-SY5Y hücreleri üzerindeki etkisi belirlendi ve Alzheimer ile ilişkili olduğu bilinen PSEN1, PSEN2, APOE, CLU, PICALM, ABCA7, MS4A1, CR1, BIN1, MMP9, APP, CD33, CD2AP ve SORL1 genlerin mRNA ekspresyon düzeyindeki değişimler incelendi. PHC, MCHC, ECHO bileşikleri ve BE'nin sitotoksik etkilerini incelendiğinde en fazla sitotoksik etkiyi MHCH bileşiği göstermişken, en düşük sitotoksik etkiyi ECHO bileşiği göstermiştir.

Alzheimer hastalığı ile bağlantısı kesin ve dolaylı olmak üzere birçok gen ilişkilendirilmiştir. Hastalıkla ilişkisi kesin olan genlerden APP ve PSEN1'in hastalık için otozomal dominant bir etki gösterdiği ve A β -42 proteinin artışına doğrudan etkileri olduğu bilinmektedir (Cai ve diğ. 2015). APP geç başlangıçlı AH için (Rocchi ve diğ. 2003), PSEN1 ise erken başlangıçlı AH için kesin nedenlerden biri olarak kabul edilmektedir (Rocchi ve diğ. 2003). Elde ettiğimiz sonuçlara göre APP genini sadece ECHO bileşiği anlamlı olarak azaltırken, PSEN1 genini ECHO ve PHC bileşikleri anlamlı olarak azaltmıştır. Yukarıda da belirttiğimiz gibi SH-SY5Y hücreleri nöral kökenli nöroblastoma hücreleri olmaları sebebiyle belli bir miktar amiloit üretebilmektedirler (Zhang ve diğ., 2015; Rajadas ve diğ., 2013). SH-SY5Y hücrelerin bir miktar A β oluşturduğunu bildiğimiz bu bilgiler ışığında A β üretimi ile

ilişkili olan PSEN1, PSEN2 ve APP genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki azalış Alzheimer hastalığında seviyesi artan A β oluşumunu baskılayabileceğini düşündürmüştür.

Epidemiyolojik çalışmalarda APOE ϵ 4 taşıyıcılarının AH için daha yüksek riske sahip olduğunu ve Apo- ϵ 4 'ün hastalığın oluşumundan ve gelişiminden sorumlu olduğunu tayin eder. Ayrıca Apo- ϵ 4, hastalığa sebebi olan tüm biyokimyasal bozukluklar (A β depozisyonu, nörofibriler yumakların oluşumu, oksidatif stres, lipid dengesinin bozulması ve kolinerjik fonksiyon kaybı) ile ilişkili tek moleküldür (Cedazo 2007). Bu sonuçlar Apo- ϵ 4'ün toksik fonksiyonların kazanımı ve nörokoruyucu işlevlerinin azalması ya da her iki mekanizmayı beraber tetikleyerek AH patogenezinde rol aldığına dikkat çekmektedir. APOE'nin A β yığılma ve birikimini düzenlediği alenen görülmektedir (Bales 1997). APOE AH'a sahip bireylerde nörotik plaklarda bulunmaktadır ve APOE ϵ 4 aleline sahip Alzheimer hastalarında A β seviyeleri yükselmektedir. PHC ve ECHO bileşikleri hücrelere uygulanması sonucunda APOE geninde görülen anlamlı azalışlar nöroblastoma hücresi olan SH-SY5Y hücre hattının oluşturduğu A β seviyesini azalttığını düşündürdü.

ABCA7 geni proteini beyinde ve hipokampusta yoğun bir şekilde eksprese edilir. APOE'ye benzer şekilde ABCA7 geni A β üretimi ve plak oluşumunda kritik bir rol oynar (Sakae ve diğ. 2016). Yukarıda da bahsedildiği gibi APOE geni AH patogenezinde rol alır ve A β birikimine neden olduğunu söyleyebiliriz. APOE ile ilişkisi bilinen ABCA7 geniyle ilgili olarak ECHO bileşiğinin düşük dozdaki azalışın nedeni olduğunu düşünebiliriz.

Clusterinin (CLU) Alzheimer'daki işlevi kesin olarak bilinmemesine rağmen, AH ile ilişkisine dair kanıtlar vardır. Clusterin mRNA ve protein miktarını AH'da arttığı gösterilmiştir (Kyriazis ve diğ. 2008). Clusterin amiloit plakların bir komponenti olduğu bilinmektedir (Calero ve diğ. 2000). PHC ve ECHO bileşikleri uygulaması sonucunda CLU geninde görülen anlamlı azalışlar AH'dan sorumlu amiloid artışının azaldığını gösterdiğini düşündürmüştür.

AH'da frontal kortekste yükselmiş PICALM ekspresyonu için açıklama kesin değildir. Bir ihtimal, bunun yüksek A β seviyelerine bir cevap oluşturmasıdır. Durum böyleyse, temporal kortekste ekspresyonun artması da beklenir. Tau'nun hiperfosforilasyonu ile ilgili diğer bölgeye özgü veya biyokimyasal değişikliklerin amiloid proteinin PICALM ekspresyonu üzerindeki etkisini modüle edebileceğini düşünülmektedir. Başka bir seçenek olarak, PICALM ekspresyonundaki herhangi bir değişikliğin zamanlaması ve dağılımı, hastalığın yayılma evreleriyle alakalı olabilir (Tebar ve diğ. 1999). SH-SY5Y hücrelerine PHC ve ECHO bileşiği uygulandıktan sonra PICALM geninin ifadesinde anlamlı bir azalış görüldü. Bu durumda A β üzerinde belli bir etkisi olduğu görüldü bununla birlikte ifade seviyeleri incelendiğinde PHC bileşiğinde yüksek dozda ECHO bileşiğinin ise düşük dozda etkili olduğu görüldü.

İnsanlarda MS4A1 ile ilişkili diğer bazı genler immün sistem ve iltihap ile ilişkilidir ancak bu genlerin Alzheimer hastalığının patogenezindeki fonksiyonel etkisi kesin olarak bilinmemektedir. MS4A ailesinin kalsiyum homeostazını düzenlemek için işlevi gördüğü ve hücre içi kalsiyumun, A β birikimi, tau hiperfosforilasyonu ve nöronal ölüm ile ilişkili olabileceği bilinmektedir. MS4A ailesi ayrıca nöroinflamasyonu modüle ederek AH'ın ilerlemesini etkiler. MS4A1 (CD20) esas olarak B lenfositleri tarafından eksprese edilir. B lenfosit antijen reseptörünü aktive eder ve sonra kalsiyum akışını düzenler ve immünolojik hastalıklarla ilişkilidir (Cruse ve diğ.). MS4A1 geninde PHC bileşiğindeki anlamlı artışın hücrelerde immün cevap oluşturarak amiloid birikimi ve kalsiyum homeostazını düzenlendiğini düşünebiliriz.

CR1 varlığı fagositik hücreler üzerinde, kompleman yanıtını aktive eden partiküllerin yutulmasını sağlar. Bazı çalışmalarda CR1'deki genetik varyansın bağışıklık tepkisiyle A β temizleme oranını değiştirebildiği görülmüştür (Lue ve diğ. 1996). A β 'nin yetersiz temizlenmesi ve CR1 genetik varyasyonu ile artan kronik inflamasyon, Alzheimer hastalığının patogenezinin etkiler gibi görünmektedir, son zamanlarda yapılan bir çalışma, bozulmuş fonksiyona sahip CR1 formlarının, A β oluşumunun azalmasıyla AH riskinin artması ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir (Mahmoudi ve diğ. 2015). CR1 genindeki PHC ve ECHO bileşiğindeki anlamlı artış nöroblastma hücrelerinde amiloid proteini temizlemedeki rolünün etkili olabilir.

İmmün cevapta rol alan AH ilişkili olan CR1 ve MS4A1 genlerinin artış göstermesi bileşiklerin etkisiyle immün yanıt oluşturduğunu düşünüldü.

Matriks metalloproteinaz (MMP) hücreleri inflamatuvar fagositler tarafından salınmaktadır. MMP'lar doku yeniden yapılanması, yara iyileşmesi, morfogenezi ve normal gelişimsel süreç gibi fizyolojik durumlarda önemli rol oynadıkları gibi tümör hücresi invazyonu, metastaz ve anjiyogenezis gibi patolojik süreçlerde de yer alırlar (Wiseman ve diğ. 2003). MMP-9 ekspresyonunu ya da aktivitesini azaltmayı tasarlayan terapiler, otoimmün hastalıklarda terapötik seçenekler olarak hizmet edebilir (Shapiro ve diğ. 2002). Özellikle otoimmün hastalıklarda MMP9 geninde artış göstermesine karşı ECHO bileşiğindeki düşük dozdaki anlamlı azalışın olması ters olumlu etki ettiğini hem de toksik etkisinin az olduğunu düşündürdü.

SORL1 genindeki genetik varyasyonun, çoğaltılmış genetik çalışmalar yoluyla AH ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bir tip I transmembran proteini olarak SORL1, birkaç çeşitli alandan oluşur ve hem düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü ailesine hem de vakuolar protein sınıflandırma 10 (VPS10) alan reseptör ailesine aittir. Ortaya çıkan veriler, SORL1'in, APP trafiğinin ve işlenmesinin merkezi düzenleyicisi olarak ortaya çıkması, A β yıkımına dahil olma, tau proteini ile etkileşim dahil olmak üzere çeşitli yollarla AH'ye katkıda bulunduğunu göstermektedir. SORL1, trans-Golgi ağı ve erken endozomlar arasında APP'nin anterograd ve retrograd hareketi için farklı sitosolik adaptör setleriyle etkileşime girer ve böylece öncülün amiloidojenik parçalanmayı destekleyen endositik bölmelere verilmesini kısıtlar (Rui-Hua Yin ve diğ. 2015). SORL1 ve etkileşimli adaptörlerindeki kusurlar, taşıma kusurlarına ve APP'nin amiloidojenik işlenmesinin artmasına sebep olur ve hastalarda AH için önemli risk faktörlerini gösterir (Thomas ve Olay 2013). Bizim çalışmamızda SORL1 geninde anlamlı artma veya azalma görülmemiştir. Ancak SORL geninin işlevi ile bilgilere bakıldığında APP geniyle ilişkisi ECHO bileşiğinde APP geninde azalış göstererek Amiloid birikimin azaldığı düşünüldüğünde anlamlı artış veya azalış göstermemesi olabilir.

BIN1 geni diğer çeşitli proteinler ile etkileşime giren vücut dokularında bulunan bir protein yapmak için bir dizi talimatlar içerir. BIN1 proteininin, materyallerin hücre yüzeyinden hücreye taşınmasında (endositoz) rol oynadığı

düşünülmektedir. BIN1 proteini, bir tümör baskılayıcı protein görevi görebilir, bu da hücrelerin çok hızlı veya kontrolsüz bir şekilde büyümesini ve bölünmesini engellediği anlamına gelir (Böhme diğ. 2014). Bu bağlamda bileşiklerde anlamlı bir sonuç bulunamamıştır.

CD33 protein seviyeleri ve CD33-pozitif mikroglia sayısı, yaşa uygun kontrollere göre AH'lı beyinlerde artar. Tersine, AH'na karşı koruma sağlayan CD33 SNP rs3865444'ün minör allelinin, hem CD33 mikroglial ekspresyonunda hem de AH'lı beyinde çözünmeyen A β -42 seviyelerinde azalmaya yol açtığı gösteriyor. Ayrıca, CD33-immünoreaktif mikroglia sayıları, AD vakalarında çözünmeyen A β -42 seviyeleri ve amiloit plak yükü ile pozitif korelasyon gösterir. (Mandrekar ve diğ. 2009) Yaptığımız çalışmada uygulanan bileşiklerde CD33 geninde anlamlı artış veya azalış görülmemiştir.

CD2AP ve diğer bazı AH risk genlerinin (BIN1 ve PICALM) de otofaji yolağına katıldığı tahmin edilmektedir. CD2AP podositlerinde, otofaji sinyallemede yer alan önemli proteinlerden biri up regüle edildi, bu da otofaji sinyallemesini etkileyerek CD2AP kaynaklı glomerüler bazal membranın dış yüzünü kaplayan oldukça özelleşmiş hücreler olan podosit hasarının olmadığını gösteriyordu (Li ve diğ. 2015). Ayrıca CD2AP içermeyen podositlerde tam uzunluktaki kaspaz-1'in aşağı düzenlendiği gözlemlendi. Bununla birlikte, otofaji sinyallemede CD2AP'nin spesifik işlevi hala belirsizdir ve daha fazla ele alınması gerekiyor (Kuusela ve diğ. 2016). Yaptığımız deneyler sonucunda bileşiklerde anlam ifade eden değerler bulunamamıştır.

İzole edilmiş bazı bileşiklerin biberiyenin ham ekstresinin, AH'nin skopolamin ile indüklenen demans modeli kullanılarak *in vivo* test edildiğinde hafıza bozukluğunu iyileştirdiği gösterilmiştir. *Rosmarinus officinalis* kültürleri ve bunların lipopolisakkarit ile aktive edilen mikroglia üzerindeki anti-inflamatuar etkileri görülmüştür (Farmasötik Biyoloji 2006). Biberiye diterpenlerinin hem mikroglial hücrelerde hem de diğer inflamatuvar modellerde güçlü anti-enflamatuar aktivitesi bu nedenle AH ile mücadelede potansiyellerini göstermektedir (Forestive diğ. 2013). AH'nin birçok patolojik süreci içeren karmaşık bir hastalık olduğu düşünüldüğünde, biberiye diterpenleriyle gösterilenler gibi çok işlevli ilaçlarla tedavi

uygulanabilir bir terapötik yaklaşım oluşturur. AH'deki nörodejenerasyon süreci, Parkinson hastalığı gibi diğer hastalıklarla pek çok benzerliğe sahiptir (Cuajungco ve diğ. 2000, Tougu ve diğ. 2011). Bu bilgiler bakıldığında biberiye bitkisinden elde edilen bileşiklerin genel olarak farklı terapötik profile sahip olabilir. Yapılan çalışmamızda *Rosmarinus officinalis* ekstraktı ilgili ise elde edilen veriler anti-Alzheimer etkisine ters verilere sahiptir. Özellikle AH ile ilişkisi olan PSEN1, PSEN2 ve APP genlerindeki EC₀₈ olan yüksek dozda artış bunun sonucu olduğunu düşündürdü. MCHC bileşiğiyle yapılan çalışmada genlerde anlamlı pozitif veya negatif ifade farklılığı görülmemiştir. Bu bağlamda MCHC bileşiğinin anti-Alzheimer etkisi olmayabilir veya daha fazla araştırma yapılarak deneylerin tekrarlanması gerekebilir. Genel olarak PHC ve ECHO bileşiğinin anti-Alzheimer etkilerinin olduğunu söyleyebiliriz. Elde edilen sonuçlar yeni izole edilen PHC ve ECHO bileşiklerinin anti-Alzheimer etkisine destekler niteliktedir. ECHO bileşiği daha düşük dozda sitotoksik etkiye sahip olmasından dolayı daha etkili olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca ECHO bileşiği yüksek dozda ters etki ettiğini söylemek mümkündür. MCHC bileşiğiyle yapılan çalışmada genlerde anlamlı pozitif veya negatif ifade farklılığı görülmemiştir. Bu bağlamda MCHC bileşiğinin anti-Alzheimer etkisi olmayabilir veya daha fazla araştırma yapılarak deneylerin tekrarlanması gerekebilir.

Genel olarak PHC ve ECHO bileşiğinin anti-Alzheimer etkilerinin olduğunu söyleyebiliriz. Elde edilen sonuçlar yeni izole edilen PHC ve ECHO bileşiklerinin anti-Alzheimer etkisine destekler niteliktedir. ECHO bileşiği daha düşük dozda sitotoksik etkiye sahip olmasından dolayı daha etkili olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca ECHO bileşiği yüksek dozda ters etki ettiğini söylemek mümkündür.

5. SONUÇ

Sonuç olarak, bu çalışmada Alzheimer hastalığının araştırmaları için uygunluğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiş, insan nöroblastoma (SH-SY5Y) hücre hattı kullanılarak, Alzheimer hastalığı tedavisi için kumarin türevi PHC, MCHC, ECHO bileşiklerinin ve *Rosmarinus officinalis* ekstraktın AH-ilişkili genlerin mRNA düzeyinde değişimlerine bakıldı.

SHSY-5Y hücre hattı üzerindeki genler PHC ve ECHO bileşiğinin uygulanması sonucunda gördüğümüz anlamlı değişimlerden dolayı AH'nın tedavisine katkı sağlayabileceği düşünölmektedir. Bulgular sonucunda PHC ve ECHO bileşiği çok hedefli güçlü bir anti-Alzheimer etkiye sahip bileşikler olabilme düşünösesi ilerleyen süreçlerde farklı deneylerle desteklenerek daha kesin sonuçlar elde edilebileceğini bilgisini vermektedir.

MCHC ilgili çalışmaların tekrarlanması etkilerin daha net ve doğru olarak tanımlanmasına yardımcı olacaktır. *Rosmarinus officinalis* ekstraktıyla ilgili ise elde edilen veriler anti- Alzheimer ile ters etkiye sahiptir diye düşünölebilir. Elde edilen tüm bu verilerin ışığında literatürde yer almayan yeni kumarin türevi bileşiklerin anti- Alzheimer etki mekanizmaları aydınlatılarak çalışmaların daha da detaylandırılmasıyla Alzheimer hastalığında iyileştirici farmakolojik çalışmalar açısından ileri çalışmaların önü açılmıştır. Yapılan çalışmamızın sonucuna ek olarak A β -40 protein ile nöroblastoma hücreleri indöklenebilir. Daha ileriki süreçlerde ise hayvan deneylerinde gerekli çalışmaların yapılmasıyla desteklenerek bileşiklerin çalışma mekanizmasının daha iyi anlaşılabilir.

6. KAYNAKLAR

Albert, A., and Willis, J. B., “Improved syntheses of acridines. Part V. The dechlorination of 5-chloroacridines and a new synthesis of acridine”, *Chem. Ind.*, 65(1), 26–28, (1946).

Anand, P. and Singh, B., “Synthesis and evaluation of novel 4-[(3H,3aH,6aH)-3-phenyl]-4,6-dioxo-2-phenyldihydro-2H-pyrrolo[3,4-d]isoxazol-(3H,6H,6aH)-yl] benzoic acid derivatives as potent acetylcholinesterase inhibitors and anti-amnestic agents”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20, 521–530, (2012).

Angelantonio, S., “Donepezil modulates nicotinic receptors of substantia nigra dopaminergic neurones”, *Br. J. Pharmacol.*, 141(4), 644-652, (2004).

Apostolova, L. G., “Alzheimer’s disease”, *Continuum (Minneapolis Minn)*, 22, 419-434, (2016).

Arioğul, S., “Alzheimer tip demansta risk faktörleri”, 5. *Ulusal İç Hastalıkları Kongresi Kitabı*, 102-105, (2003).

Bales, K. R., “Lack of Apolipoprotein E dramatically reduces amyloid β -peptide deposition”, *Nature Genetics*, 17, 263–264, (1997).

Bartus, R. T. and Dean, R. L., “BB er and LS Lippa”, *Science*, 217,408, (1982).

Bertram, L., McQueen, M. B., Mullin, K., Blacker, D. and Tanzi, R. E., “Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database”, *Nature Genetics*, 39(1), 17-23, (2007).

Biedler, J. L., Helson, L. and Spengler, B. A., “Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture”, *Cancer Research*, 33, 2643–2652, (1973).

Bickel, U., Thomsen, T., Fischer, J. P., Weber, W. and Kewitz, H., “Galanthamine: pharmacokinetics, tissue distribution and cholinesterase inhibition in brain of mice”, *Neuropharmacology*, 30, 447-454, (1991).

Bird, T. D. and Miller, B. L. “Alzheimer's disease and other dementias”, *Harrisons Principles of Internal Medicine*, 16(2), 2393, (2005).

- Bowen, D. M., Smith, C. B., White, P., and Davidson, A. N., “Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies”, *Brain*, 99(3), 459–496, <https://doi.org/10.1093/brain/99.3.459>, (1976).
- Böhm, J., Biancalana, V., Malfatti, E., Dondaine, N., Koch, C., Vasli, N., et. al., “Adult-onset autosomal dominant centronuclear myopathy due to BIN1 mutations”, *Brain*, 137, 3160-70. doi: 10.1093/brain/awu272., (2014).
- Böhm, J., Biancalana, V., Malfatti, E., Dondaine, N., Koch, C., Vasli, N., et.al., “Drug treatments in Alzheimer’s disease”, *Clin. Med.*, 16(3), 247, (2016).
- Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K. and Arrighi, H.M. “Forecasting the global burden of Alzheimer’s disease”, *Alzheimers Dement*, 3, 186-191, (2007).
- Brühlmann, C., Ooms, F., Carrupt, P. A., Testa, B., Catto, M., Leonetti, F. and Carotti, A., “Coumarins derivatives as dual inhibitors of acetylcholinesterase and monoamine oxidase”, *J. Med. Chem.*, 44(19), 3195-3198, (2001).
- Cacace, R., Slegersa, K., and Broeckhoven C., “Molecular genetics of early-onset Alzheimer’s disease revisited”, *Alzheimers Dement*, 12(6), 733-48, doi: 10.1016/j.jalz, (2016).
- Calero, M., Rostagno, A., Matsubara, E., Zlokovic, B. and Frangione, B., “Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer’s disease”, *Microsc. Res. Tech.*, 50, 305–315, (2000).
- Cankurtaran, M. ve Arıoğul S., “Alzheimer hastalığı ve vasküler demansta risk faktörleri”, *Hacettepe Üniversitesi İç Hastalıkları AD Geriatri Ünitesi, Yan Dal Uzmanlık Tezi*, (2004).
- Caselli, R. J., Beach, T. G., Knopman, D. S., and Graff-Radford, N. R., “Alzheimer disease: scientific breakthroughs and translational challenges”, *Mayo. Clin. Proc.*, 92, 6, 978-994, (2017).
- Castro, A. and Martinez, A., “Peripheral and dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: Implications in treatment of Alzheimer’s disease”, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 1, 267–272, (2001).
- Cavalli, A., Bolognesi, M. L., Minarini, A., Rosini, M., Tumiatti, V., Recanatini, M. et.al., “Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases”, *J. Med. Chem.*, 51(3), 347–372, <https://doi.org/10.1021/jm7009364>, (2008).
- Cedazo- Minguéz, A., “Apolipoprotein E and Alzheimer’s disease: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities”, *J. Cell. Mol. Med.*, 11, 1227-1238, (2007).

Chen J. H., Ou H. P. and Lin C. Y., “Carnosic acid prevents 6-hydroxydopamine induced cell death in SH-SY5Y cells through glutathione synthesis”, *Chem. Res. Toxicol.*, 25 (9), 1893–1901, doi: 10.1021 / tx300171u, (2012).

Citron, M., Westaway, D., Xia, W. et al. “Mutant presenilins of Alzheimer’s disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice”, *Nat. Med.*, 3, 67-72, (1997).

Colin, L. M., Randall, B., Kaj, B., Christopher, C. R., Reisa, A. S. and Jeffrey, L. C., “Alzheimer’s disease”, *Nature*, 1, 15056, (2015).

Colombres, M., Sagal, J. P., Inestrosa, N. C., “An overview of the current and novel drugs for Alzheimer’s disease with particular reference to anti-cholinesterase compounds”, *Current Pharmaceutical Design*, 10, 3121–3130, (2004).

Cooper, K., Anthony Leong, A. S., “A guide to diagnostic antibodies for immunohistology”, *London: Greenwich Medical Media*, ISBN 978-1-84110-100-2, (2003).

Corada, M. M., Brookmayer, R., Paganini-Hill, A., Berlau, D. and Kawas, C.H., “Dementia incidence continues to increase with age in the oldest old: the 90+ study”, *Ann Neurol*, 67,114-121, (2010).

Cruse, G., Beaven M. A. and Music S. C., “The CD20 homologue MS4A4 directs trafficking of KIT toward clathrin-independent endocytosis pathways and thus regulates receptor signaling and recycling”, *Molecular Biology of the Cell*, 26, 1711-1727, (2015).

Cuajungco, M. P., Goldstein, L.E. and Nunomura, A., “Evidence that the β -amyloid plaques of Alzheimer's disease represent the redox-silencing and entombment of A β by zinc”, *J. Biol. Chem.*, 275 (26), 19439–19442, doi: 10.1074 / jbc.c000165200, (2000).

Danysz, W. Parsons, C. G., Mobius, H. J., Stoffler, A. and Quack, G., “Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer’s disease: A unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action”, *Neurotox Research*, 2, 85-97, (2000).

Darreh-Shori, T. and Soininen, H., “Effects of cholinesterase inhibitors on the activities and protein levels of cholinesterases in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer’s disease: A review of recent clinical studies”, *Curr. Alzheimer Research*, 7(1), 67–73, (2010).

Davies, P. and Maloney, A. J., “Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer’s disease”, *Lancet*, 308(8000), 1403, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(76\)91936-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(76)91936-X), (1976).

Davis, K. L. and Powchick, P., “Tacrine”, *Lancet*, 345(8950), 625–630, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)90526-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)90526-X), (1995).

Devanney, N. A., Andrew N. S., and Gensel, J. C., “Microglia and macrophage metabolism in CNS injury and disease: The role of immunometabolism in neurodegeneration and neurotrauma”, *Experimental Neurology*, 113310, (2020).

Doglio, L. E., Kanwar R. and Jackson G. R., “Gamma-cleavage-independent functions of presenilin, nicastrin, and Aph-1 regulate cell-junction organization and prevent tau toxicity in vivo”, *Neuron*, 50, 359-75, (2006).

Dozly Prospektüs, Abdi ibrahim ilaç Sanayi ve Ticaret A.Ş., 209/67, (2006).

Drachman, D. A., and Leavitt, J., “Human memory and the cholinergic system”, *Archives of Neurology*, 30(2), 113–121. <https://doi.org/10.1001/archneur.1974.00490320001001>, (1974).

Ehlenberger, Alfred G., and Victor Nussenzweig., “The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis”, *J. Exp. Med.* , 145(2), 357-371, (1977).

Fang, D., Nguyen, T. K., Leishear, K., Finko, R., Kulp, A.N., Hotz, S., et.al., “A tumorigenic subpopulation with stem cells in melanoma”, *Cancer Research*, 65 (20), 9328-37, (2005).

Fearon, D. T., Isao K. and George G. T., “Membrane distribution and adsorptive endocytosis by C3b receptors on human polymorphonuclear leukocytes”, *J. Exp. Med.* , 153.(6), 1615-1628, (1981).

Foresti, R., Bains, S. K. and Pitchumony, T. S., “Nrf2-HO-1 Small molecule activators of the antioxidant axis modulate both metabolism and inflammation in BV2 microglia cells”, *Pharmacol. Res.*, 76, 132–148, doi: 10.1016 / j.phrs.2013.07.010, (2013).

Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M. and Wilcock, G. K., “The cholinergic hypothesis of Alzheimer’s disease: a review of progress”, *J. Neurol., Neurosurgery & Psychiatry*, 66(2), 137–147, <https://doi.org/10.1136/jnnp.66.2.137>, (1999).

Fulton, B. and Benfield, P., “Galanthamine”, *Drugs Aging*, 9, 60-6, 66-67, (1996).

Gandy, S., “The role of cerebral amyloid β accumulation in common forms of Alzheimer disease”, *J. Clin. Investig.*, 115(5), 1121-1129, (2005).

- Gandy, S., “Perspective: prevention is better than cure”, *Nature*, 475(7355), (2011).
- Gao, Sujuan, Hendrie, H. C., Hall, K. S. and Hui, S., “The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis”, *Archives of General Psychiatry*, 55(9), 809-815, (1998).
- Geula, C. and Darvesh, S., “Butyrylcholinesterase, cholinergic neurotransmission and the pathology of Alzheimer’s disease”, *Drugs of Today*, 40, 711–721, (2004).
- Georganopoulou, D. G, Chang, L. and Nam, J. M., “Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer’s disease”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 2273, (2005).
- Giri, M., Zhang, M. and Lü, Y., “Genes associated with Alzheimer’s disease: an overview and current status”, *Clinical Interventions in Aging*, 11, 665.
- Goedert, M. and Spillantini, M.G., “A century of Alzheimer’s disease”, *Science*, 314, 777-781, (2006).
- Gurland, B. J., Wilder, D. E., Lantigua, R., Stern, Y., Chen, J., Killeffer, et.al., “Rates of dementia in three ethnorracial groups” *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 14(6), 481-493, (1999).
- Haass, C., Schlossmacher, M. G, Hung A. Y., et al., “Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism”, *Nature*, 359, 322-5, (1992).
- Hane, F. T., Robinson, M., Lee, B. Y., Bai, O., Leonenko, Z. and Albert, M. S. “Recent progress in Alzheimer’s disease research, part 3: Diagnosis and treatment”, *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(3), 645-665, (2017).
- Hampel, H., Caraci, F., Cuello, A. C., Caruso, G., Nisticò, R., Corbo, M. and Lista, S., “A path toward precision medicine for neuroinflammatory mechanisms in Alzheimer's disease”, *Frontiers in Immunology*, 11, 456, (2020).
- Hardy, J. A., and Higgins, G. A., “Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis”, *Science*, 256(5054), 184-186, (1992).
- Hardy, J. and Selkoe, D. J., “The amyloid hypothesis of Alzheimer’s disease: progress and problems on the road to therapeutics”, *Science*, 297, 353-6, (2002).
- Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F. and Feinstein, D. L., “Neuroinflammation in Alzheimer's disease”, *Neurology*, 14(4), 388-405, (2015).

- Hensley, K., “Neuroinflammation in Alzheimer's disease: mechanisms pathologic consequences, and potential for therapeutic manipulation”, *Journal of Alzheimer's Disease*, 21(1), 1-14, (2010).
- Hattori, H., “Depression and depressive state with Alzheimer's disease”, *Nippon Rinsho*, 67(4), 835-44, (2009).
- Heilbronn, E., “Inhibition of cholinesterases by tetrahydroaminacrin”, *Acta Chemica Scandinavica*, 15(6), 1386-1390, (1961).
- Hernandez, F. and Avila, J., “Tauopathies”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(17), 2219-223, (2007).
- İşeri, P. ve Efendi, H., “Alzheimer hastalığında donepezil ve rivastigminin etkinliği ve güvenilirliği”, *Geriatri*, 6(4), 119 -123, (2003) .
- Jann, M. W., “Rivastigmine a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer’s disease”, *Pharmacotherapy*, 20(1), 1–12, (2000).
- Jiang, T., Yu, J. T., Hu, N., Tan, M. S., Zhu, X. C., and Tan, L. “CD33 in Alzheimer's disease”, *Molecular Neurobiology*, 49(1), 529-535, (2014).
- Kang, S. Y., Lee, K. Y., Sung, S. H., Park, M. J., and Kim, Y. C., “Coumarins isolated from *Angelica gigas* Inhibit acetylcholinesterase: Structure– activity relationships” *J. Nat. Prod.* , 64(5), 683-685, (2001).
- Kelley, B. J. and Petersen, R. C., “Alzheimer's disease and mild cognitive impairment”, *Neurol. Clin.*, 25(3), 577-609, (2007).
- Kinney, J. W., Bemiller, S. M., Murtishaw, A. S., Leisgang, A. M., Salazar, A. M. and Lamb, B., “Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease”, *Translational Research & Clinical Interventions*, 4, 575-590, (2018).
- Kirsch, K. H., Georgescu, M.M., Ishimaru, S., Hanafusa, H., “CMS: An adapter adapter involved in cytoskeletal rearrangements”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (11), 6211—6, doi: 10.1073, (1999).
- Kovalevich, J. and Dianne L., “Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology”, *Neuronal Cell Culture*, 9-21(2013).
- Kulhmann A. and Röhl C., “Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro. Cultures of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and their anti-inflammatory effect on lipopolysaccharide-activated microglia”, *Pharm. Biol*, 44 (6), 401-410, doi: 10.1080 / 13880200600794063, (2006).

Kuusela, S., Wang, H., Wasik, A. A., Suleiman, H. and Lehtonen, S., “Tankyrase inhibition exacerbates kidney damage in the absence of CD2AP”, *Cell Damage Dis.*, 7(7), e2302, (2016).

Kyriazis, G. A., Wei, Z. and Vandermeij, M., “Numb endocytic adapter proteins regulate the transport and processing of the amyloid precursor protein in an isoform-dependent manner: implications for Alzheimer disease pathogenesis”, *J. Biol. Chem.*, 283, 25492–502, (2008).

Landsdall, C. J., “An effective treatment for Alzheimer’s disease must consider both amyloid and tau”, *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research*, 7, 1-11, (2014).

Li, H. L., Yang, P., Liu, Z. J., Sun, Y. M. and Lu, S. J., “Common variants are associated with sporadic Alzheimer’s disease in the complete Chinese population”, *Psychiatr Genet.*, 25, 21-25, (2015).

Liao, Y. C., Lee W. J. and Hwang, J. P., “ABCA7 gene and the risk of Alzheimer's disease in Han Chinese in Taiwan”, *Neurobiol Aging.*, 35(10), 7-13, doi: 10.1016/j.neurobiolaging, (2014).

Lleó, A., Greenberg, S. M. and Growdon, J. H., “Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease”, *Annual Review of Medicine*, 57,513-533, (2006).

Lue, L. F., Brachova, L., Civin, W.H., et al., “Inflammation, A beta deposition and neurofibrillary tangle formation as correlates of Alzheimer's disease neurodegeneration”, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55, 1083-1088, (1996).

Luana, B., “Neuropsychiatric symptoms of the elderly with Alzheimer's disease and the family caregivers' distress”, *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 1518-8345, (2016).

Mahley, R. W., Palaoğlu, K. E., Atak, Z., Dawson-Pepin, J., Langlois, A. M., Cheung, V. and Vakar, F., “Turkish Heart Study: lipids, lipoproteins, and apolipoproteins”, *J. Lipid Res.*, 36(4), 839-859, (1995).

Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., and Huang, Y., “Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer’s disease”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103(15), 5644-5651, (2006).

Mahmoudi, R., Kisserli, A., Novella, J. L., et al., “Alzheimer's disease is associated with low density of the long CR1 isoform”, *Neurobiol. Aging*, 36(4), 1766-e5, (2015).

Mandrekar, S., Jiang, Q., Lee, C. Y., Koenigsnecht-Talboo, J., Holtzman, D. M. and Landreth, G.E., “Microglia mediate the clearance of soluble Abeta through fluid phase macropinocytosis”, *Neuro. Sci.*, 29(13), 4252-62, (2009).

Manly, J. J. and Mayeux, R., “Ethnic differences in dementia and Alzheimer disease”, Washington, *National Academies Press*, 95-142, (2004).

Martocchia, A. and Falaschi, P., “Current strategies of therapy in Alzheimer’s disease”, *Open Neuropsychopharm.*, 1, 19-23, (2008).

Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., et al., “Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82, 4245-9, (1998).

Mesulam, M. M., Guillozet, A., Shaw, P., Levey, A., Duysen, E. G., Lockridge, O., “Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine”, *Neuro. Sci.*, 110, 627–639, (2002).

Mesulam, M., “Principles of behavioral and cognitive mythology”, (Çeviri Editörü: H. Gürvit), *Oxford University, Yelkovan Yayıncılık*, (2004).

Michael, S. and Wolfe, M.S., “Presenilin-1, handbook of proteolytic enzymes”, *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 273-278, (2013).

Minati, L., Edginton, T., Bruzzone, M. G. and Giaccone, G., “Current concepts in Alzheimer’s disease: a multi disciplinary review”, *American Journal of Alzheimer’s Disease & Other Dementias*, 24(2), 95-121, (2009).

Moceri, V., “Early risk factors and development of Alzheimer’s disease”, *Neurology*, 54, 415-420, (2000).

Mohebali, N., Shahzadeh Fazeli, S. A., Ghafoori, H., Farahmand, Z., Mohammadkhani, E., Vakhshiteh, F., et.al., “Effect of flavonoids rich extract of capparispinosa on inflammatory involved genes in amyloid-beta peptide injected rat model of Alzheimer’s disease”, *Nutr. Neuro. Sci.*, 21(2), 143–150, (2018).

Musial, A., Bajda, M., and Malawska, B., “Recent developments in cholinesterases inhibitors for Alzheimer’s disease treatment”, *Current Medicinal Chemistry*, 14(25), 2654–2679, (2007).

O’Kennedy, R. O. and Thornes, R. D., “Suggested modes of action of coumarins and some comments on their significance”, *Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action*, (1997).

Parsons, C. G., Danysz, W., Dekundy, A., & Pulte, I., “Memantine and cholinesterase inhibitors: complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer’s disease”, *Neurotox. Res.*, 24(3), 358-369, (2013).

Patterson, C., “Alzheimer’s Disease International”, *The World Alzheimer Report*, (2018).

Piazzzi, L., Cavalli, A., Colizzi, F., Belluti, F., Bartolini, M. and Mancini, F., “Multi-target directed coumarin derivatives, hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18(1), 423-426, (2008).

Plassman, B.L., Langa, K. M., Fisher, G.G., Heeringa, S. G., Weir, D. R., Ofstedal, M., et. al., “Prevalence of dementia in the United States: the aging, demographics, and memory study”, *Neuroepidemiology*, 29, 125-132, (2007).

Polinsky, R. J., “Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer’s disease”, *Clin. Ther.*, 20(4), 634–647, (1998).

Prodeus, A. P., Goerg, S., Shen, L. M., Pozdnyakova, O. O., Chu, L., Alicot, E. M., et.al., “A critical role for complement in maintaining self-tolerance”, *Immunity*, 9 (5), 721-31, (1998).

Rees, T., Hammond, P.I., Soreq, H., Younkin, S. and Brimijoin, S., “Acetylcholinesterase promotes beta-amyloid plaques in cerebral cortex”, *Neurobiol. Aging.*, 24, 777–787, (2003).

Rogaeva, E., Meng, Y., Lee, J. H, et al. “The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease”, *Nat Genet.*, 39(2), 168–177, (2007). Rylett, R. J., Ball, M. J. and Colhoun, E. H., “Evidence for high affinity choline transport in synaptosomes prepared from hippocampus and neocortex of 196 patients with Alzheimer’s disease”, *Brain Res.*, 289(1–2), 169–175, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90017-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90017-3), (1983).

Scarpini, E., Schelterns, P., Feldman, H., “Treatment of Alzheimer’s disease current status and new perspectives”, *Lancet Neuro.*, 2(9), 539–547, [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(03\)00502-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(03)00502-7), (2003).

Sakae, N., Liu, C.C. and Shinohara, M., “ABCA7 deficiency accelerates amyloid-beta generation and Alzheimer’s neuronal pathology”, *J. Neuro. Sci.*, 36:3848–59, (2016).

Sarfo, F., Gebregziabher, M., Ovbiagele, B., Akinyemi, R., Owolabi, L., Obiako, R., et. al., “Multilingual validation of the questionnaire for verifying stroke-free status in West Africa”, *Stroke*, 47(1), 167-172, (2016).

Schenk, D., Barbour, R. and Dunn, W., "Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse", *Nature*, 400, 173-179, (1996).

Selekler, K., "Alois Alzheimer ve Alzheimer hastalığı", *Turkish Journal of Geriatrics*, 13, 9-14, (2010).

Selkoe, E. D., "Preventing Alzheimer's disease", *Science*, 337, 1488-1492, (2012).

Shah, R. S., Lee, H. G., Xiongwei, Z., Perry, G., Smith, M. A. and Castellani, R. J., "Current approaches in the treatment of Alzheimer's disease", *Bio. Med. Pharmacother*, 62,199-207, (2008).

Shapiro, S., Shoenfeld, Y., Gilburd, B., Sobel, E., and Lahat, N., "Intravenous gamma globulin inhibits the production of matrix Metalloproteinase-9 in macrophages", *Cancer*, 95(9), 2032-2037, (2002).

Shen, Q., Peng, Q., Shao, J., Liu, X., Huang, Z., Pu, X. and Gu, L., "Synthesis and biological evaluation of functionalized coumarins as acetylcholinesterase inhibitors", *Eur. J. Med. Chem.*, 40(12), 1307-1315, (2005).

Singh, M., Kaur, M., Kukreja, H., Chugh, R., and Silakari, O., "Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection", *Eur. J. Med. Chem.*, 70, 165-188, (2013).

Smith, M. J., Kwok, J.B., McLean, C.A., et al., "Variable phenotype of Alzheimer's disease with spastic paraparesis", *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 49,125-9, (2001).

Solomon, H., "The therapeutic potential of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes for Alzheimer's disease", *Evid-Based Compl. Alt.*, (2016).

Soodi, M., Saeidnia, S., Sharifzadeh, M., Hajimehdipoor, H., Dashti, A., Sepand, M. R., et.al., "Satureja bachtiarica ameliorate beta-amyloid induced memory impairment, oxidative stress and cholinergic deficit in animal model of Alzheimer's disease", *Metab. Brain Dis.*, 31(2), 395-404, (2016).

Suzuki, N., Cheung, T. T., Cai, X. D, et al., "An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants", *Science*, 264,1336-40, (1994).

Tanzi, R. E., "Editorial novel therapeutics for Alzheimer's disease", *Neurotherapeutics*, 5, 377-380, (2008).

Tateno, H., Li, H., Schur, M. J., Bovin, N., Crocker, P. R., Wakarchuk, W. W., and Paulson, J. C., “Distinct endocytic mechanisms of CD22 (Siglec-2) and Siglec-F reflect roles in cell signaling and innate immunity”, *Mol. Biol. Cell*, 27(16), 5699-710, (2007).

Tebar, F., Bohlander, S. K. and Sorkin, A., “Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic”, *Mol. Biol. Cell*, 10, 2687–2702, (1999).

Thomas, E. W. and Olav, M, A., “Sorting receptor SORL—a trafficking path to avoid Alzheimer disease”, *J. Cell Sci.*, 126(13), 2751-2760, (2013).

Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A. and Nair, M., “Alzheimer’s disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics”, *Int. J. Nanomedicine*, 14, 5541, (2019).

Tõugu, V., Tiiman, A. and Palumaa, P., “Interactions of Zn (II) and Cu (II) ions with Alzheimer's amyloid-beta peptide. Metal ion binding, contribution to fibrillization and toxicity”, *Metallomics*, 3(3), 250-261, (2011).

Ukhov, S. V., Kon’shin, M. E. and Odegova, T.F., “Synthesis and antimicrobial activity of 2 iminocoumarin-3-carboxylic acid amides”, *Pharm. Chem. J.*, 35(7), 364-365, (2001).

Wang, X.P. and Ding, H.L., “Alzheimer's disease: epidemiology, genetics, and beyond”, *Neuro. Sci. Bull.*, 24(2),105-109.4, (2008).

Wang, Y. and Qin, Z.H., “Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases”, *Acta Pharmacol. Sin.*, 30(4), 379, (2009).

Xu, W., Tan, C. C., Cao, X. P. and Tan, L., “Association of Alzheimer's disease risk variants on the PICALM gene with PICALM expression, core biomarkers, and feature neurodegeneration”, *J. Med. Chem.*, 12(21), 21202-21219, (2020).

Wiseman, B. S., Sternlicht, M. D., Lund, L. R., Alexander, C. M., Mott, J., Bissell, M. J. et al., “Site-specific inductive and inhibitory activities of MMP-2 and MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis”, *J. Cell Biol.*, 162, 1123-33, (2003).

Van, C. C., Van, B. C. and Sleegers, K., “The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives”, *Genet. Med.*, 18(5), 421-430, (2016).

Vassar, R., Bennett, B.D, Babu-Khan, S., et al., “Beta-secretase cleavage of Alzheimer’s amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE”, *Science*, 286, 735-41, (1999).

Vassar, R. and Kandalepas, P., “The β -secretase enzyme BACE1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease”, *Alzheimers Res. Ther.*, 3(3), 20-26, (2011).

Venugopala, K. N., Rashmi, V. and Odhav, B., “Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity”, *Biomed. Res. Int.*, (2013).

Vukovic, N., Sukdolak, S., Solujic, S. and Niciforovic, N. “An efficient synthesis and antioxidant properties of novel imino and amino derivatives of 4-hydroxy coumarins”, *Archives of Pharmacal Research*, 33(1), 5-15, (2010).

Yüce, B., “Hesperidin, rutin ve 7,8-dihidroksi-3-(4-metilfenil) kumarin bileşiklerinin lipit düşürücü ve antioksidan etkilerinin araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, Türkiye, 26-29, (2006).

Yin, R. H., Yu, J. T. and Tan, L., “The role of SORL1 in Alzheimer's disease”, *Mol. Neurobiol.*, 51(3), 909-918, (2015).

Zhou, J., Jiang, X., He, S., Jiang, H., Feng, F., Liu, W. and Sun, H., “Rational design of multitarget-directed ligands: strategies and emerging paradigms”, *J.Med.Chem.*, 62(20), 8881-8914, (2019).

<http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/noroloji/demans.html>

EKLER

7. EKLER

PSEN1 (Presenilin 1) Geni

Presenilin 1 geni 14q24.3 lokalizasyonunda yer almakta ve 12 ekzondan oluşmaktadır. Evrimsel açıdan bakıldığında; bitkiler, omurgalı ve omurgasızlarda yüksek derece dizi benzerliği gösteren presenilin homoloğu olgusu bilinmektedir. Fizyolojik koşullarda, PSEN1 proteinlerinin büyük çoğunluğu sitoplazmik kısımda yer alan büyük hidrofilikloop içerisinde N-terminal fragmanı (NTF) ve C-terminal fragmanı (CTF) oluşturacak şekilde endoproteolizise uğrar. APP'den β ve γ -sekretaz enzimleri ile $A\beta$ üretilmektedir; öncelikle APP ektodomaini ayrılmakta ve sonra da proteolizle $A\beta$ ve sitozolik APP intraselüler domain (AICD) oluşmaktadır. Sitozolik APP intraselüler domain, sitozole bırakılırken $A\beta$ hücre dışına salınmaktadır (Michael ve Wolfe 2013).

AH'de görülen $A\beta$ birikimi sadece bozulmuş APP üretiminde değil, APP'nin bozulmuş yıkımı ile de ortaya çıkabilmektedir. Günümüze kadar, PSEN1 geninde tanımlanmış ve patojen olduğu bilinen 219 mutasyon bulunmaktadır (Giri ve diğ. 2016). PSEN1 mutasyonlarında γ -sekretazproteoliziyle daha uzun ve agregasyona yatkın peptidler oluşmaktadır. PSEN1 mutasyonlarının çok büyük çoğunluğu yanlış anlamlı mutasyonlar olsa da insersiyon ve delesyonlar da görülmüştür. PSEN1 mutasyonları yalnızca başlangıç yaşı, nörolojik ve psikolojik belirtiler gibi klinik özelliklerde heterojenite göstermezler, nörofibriler yumak oluşumu, nöritik plak kompozisyonunda değişim gibi nöropatolojik bulgularda da farklılıklar vardır (Cacace ve diğ, 2016).

PSEN2 (Presenilin 2) Geni

Presenilin 2 geni, 1995'te PSEN1 geninin hemen arkasından bulunmuştur. 12 ekzonu olan bu gen 1q42.13 lokalizasyonunda bulunmaktadır (Şekil 12). PSEN1 geni ile yüksek homoloji göstermekte ve γ -sekretaz kompleksinde yer almaktadır; ancak amiloit β üretiminde daha az etkili olmaktadır (Bekris ve diğ. 2010). PSEN1 geni ile homolojisi %60 iken transmembran domaindeki benzerlik %90 kadardır. PSEN1 geninden farklı olarak daha çok kas ve pankreasta eksprese olmaktadır.

Günümüze kadar tanımlanmış ve patojen olduğu bilinen 16 mutasyon bulunmaktadır. Penetransı hasta sayısının azlığı nedeniyle tahmin edebilmek zordur (Cacace ve diğ. 2016).

APOE (Apolipoprotein E) Geni

Apolipoprotein E, neredeyse tüm lipoproteinlerin yapısında bulunmaktadır. APOE geni, 19q13.2 lokalizasyonunda bulunan ve dört ekzondan oluşan bir genidir. Apolipoprotein E proteini beyinde kolesterol transportunda majör rol oynamaktadır ve ayrıca inflamasyon kontrolü, sinaptik fonksiyonlar ve APP ve amiloid β metabolizmasında da rol oynamaktadır. Diyetteki değişimlere bağlı olarak, insanlarda APOE genine ait üç tane APOE e3 formu, e2 formu e4 formu polimorfizm bulunmaktadır. (Bekris ve diğ 2010). Her ne kadar APOE e4 alleli geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı açısından önemli bir risk faktörü olsa da tek başına hastalığa sebep olmaya yeterli değildir. Heterozigot e4 taşıyan bireylerde risk 3-4 kat artmaktayken homozigot e4 bireylerde 15 kat kadar artmaktadır; ancak bu risk artışı aile öyküsü, yaş ve cinsiyet gibi nedenlere bağlı değişkenlik gösterebilmektedir (Van ve diğ. 2016). APOE e4 alleli ayrıca hastalığın başlangıç yaşını da düşürmektedir ve APOE e4 allelinin yokluğu, bireyin Alzheimer hastası olmayacağı anlamına gelmemektedir (Caselli ve diğ 2017). Apo-E, beyin tarafından sentezlenen ana lipoproteindir ve beyin omurilik sıvısı (BOS)'da bulunan lipoproteinlerin bir bileşenidir. AH için bilinen en önemli risk faktörlerinden biri APOE'nin e4 izoformunun var olmasıdır (Liu ve diğ.2016).

Epidemiyolojik çalışmalar APOE e4 taşıyıcılarının AH için daha yüksek bir riske sahip olduğunu ve Apo-E4'ün hastalığın oluşumundan ve gelişiminden sorumlu olduğunu göstermektedir. Ayrıca Apo-E4, hastalığa neden olan bütün biyokimyasal bozukluklar (amiloid beta depozisyonu, nörofibriler yumakların oluşumu, oksidatif stres, lipit dengesinin bozulması, sinaptik elastikiyet kaybı ve kolinerjik fonksiyon kaybı) ile ilişkili tek moleküldür. Bu veriler Apo-E4'ün toksik fonksiyonların kazanımı ve nöro koruyucu fonksiyonların azalması ya da her iki mekanizmayı birlikte tetikleyerek AH patogenezinde rol aldığına dikkat çeker.

SORL1 (Sortilin-Related Reseptör 1) Geni

11. kromozomun q kolunda lokalizedir ve özellikle MSS'de eksprese olarak, nöral APOE reseptör görevi görmektedir. APOE ϵ 4 allelinin Alzheimer hastalığı için risk faktörü olması nedeniyle SORL1 geni eksikliğinin de hastalığa katkıda bulunabileceği ilk kez 2007'de öngörülmüştür. Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı riski açısından yapılan çalışmalarda da AH ile anlamlı ilişkisi olan SNP'ler saptanmıştır. SORL1 geni ayrıca, APP'nin intraselüler transportu ve metabolizmasında rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda SORL1 geninin varyantlarının hipokampalatrofiye yol açarak Alzheimer hastalığı patogenezinde rolü olabileceği gösterilmiştir. Güncel verilere göre SORL1 yokluğunda amiloit β ekspresyonunun arttığı tahmin edilmektedir (Rogaeva ve diğ. 2007).

ABCA7 (ATP binding cassette subfamily A member 7) Geni

ABCA7 geni de yine GWAS çalışmalarıyla tanımlanmış ve ATP-binding cassette gen ailesine ait olan, özellikle de hipokampüste ve mikroglia hücrelerinde eksprese olan bir gendir. 19. kromozomun p kolunda yer almakta ve birçok değişik molekülün hücre içine veya dışına transportunda rol almaktadır.

Lipit transportunda da rol alan ABCA7 geni ayrıca fagositoz regülasyonu ile A β 'nin makrofajlar tarafından temizlenmesinde de rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda özellikle beyaz ırk ve Afro-Amerikanlar'da risk faktörü olabileceği söz edilmiştir. ABCA7 rs3764650 polimorfizmi, AH için risk artışı ile ilişkilendirilirken GG genotipi olması koruyucu faktör olarak nitelendirilmektedir (Liao ve diğ. 2014).

CLU (Clusterin) Geni

Clusterin geni 8. kromozom üzerinde yer alır ve apolipoprotein J olarak da bilinmektedir. Hücre ölümü, tümör progresyonu ve nörodejenerasyonda selüler debris klirensinde ana görevleri olduğu tahmin edilmektedir. CLU geni 2 farklı GWAS

çalışmasında önemli bir risk faktörü olarak tanımlanmış ve lipit transportu, apoptoz ve membran yapısının korunması gibi önemli görevlerde rol alan bir gen dir. Alzheimer hastalarında frontal korteks, hipokampus ve BOS'ta CLU seviyesi artmış olarak tespit edilmektedir. APOE genine benzeri olarak CLU geni de amiloid β plaklarında bulunmaktadır. CLU amiloid β birikimini baskılamaktadır ve inflamasyon ve oksidatif strese bağlı olarak apoptozu önlemektedir. Bu bulgularla CLU geninin Alzheimer hastalığının patogenezinde önemli görevi olduğu ve biyobelirteç olarak da kullanılabileceği düşünülmektedir (Giri ve diğ. 2016).

APP (Amiloit Prekürsor Protein) Geni

Erken gelişen Alzheimer hastalığı için etkili kabul gören ilk gen APP'dir. Bu gen kromozom 21q21.2'de bir gen bölgesi tarafından sentezlenmektedir. APP'den β amiloidpeptit oluşmaktadır. APP'nin aminoasit diziliminde valin yerine izolösin, fenilalanin veya glisin değişmesinin olması mutasyona neden olur. Bu ise amiloit depolanmasında rol oynar. Sonuçta bu erken yaşta AH'nın görülmesine neden olmaktadır (Mahley ve diğ. 1995). APP tüm hücrelerde 2 önemli yolla kademli olarak metabolize edilir. Hücrelerde en çok görülen yolak α sekretazın kestiği ve A β peptidin oluşturduğu yolaktır. Bu kesim işlemini bazen farklı enzimler yapar. Genellikle β sekretaz ve α sekretaz 40 ve 42 aminoasitlik A β izoformlarının oluşumuna sebep olurlar (Hernandez ve diğ. 2007).

MMP9 (Matriks metalloproteinaz) Geni

Proteinlerin embriyonik gelişme ve doku yenilenmesi gibi birçok yaşamsal olarak faaliyetlerin yanında metastaz gibi hastalık süreçlerinde ekstrasellülmatriksin parçalanması ile birçoğu aktif propeindurumana gelerek katkıda bulunan proteinaz ailesini oluşturmaktadır. MMP9 geni kan ve trombin tarafından tetiklenen, kılcal geçirgenliği arttıran, KBB'in yapısını bozan, endotelyal hücre yapısını bozarak nörotoksik olarak davranarak ödem ve nörolojik arasındaki korelasyonları etkileyen bir proteazdır (Sarfo ve diğ. 2016).

CD33 (Cluster of Differentiation 33) Geni

CD33, 67 kDa'lık tip I transmembranlikoproteinidir. Sialik asit bağlanan Ig benzeri lectin (SIGLEC) ailesinin üyesi olan CD33 geni 19q13.33 lokasyonunda bulunmaktadır. Transmembran reseptör kodlamaktadır. CD33 geni 18,797 baz çiftinden (bç)'den ve yedi ekzondan oluşmaktadır (Jiang ve diğ. 2014). CD33 proteini, sialik asidin tanınmasından mesul hücre dışı N-terminal Vsetimmünoglobulin domaininden ve C2 tipi immünglobulin tekrarlarından oluşur. CD33, karbohidrat-bağlayıcı protein olan ve hücrel aktiviteyi inhibe eden lektin gibi işler görür. İnsan CD33 proteinini 2 korunmuş sitoplazmik tirozin temelli motifleri vardır: Membran-proksimalimmüno reseptör tirozin bazlı inhibisyon motifi (ITIM) ve distal membran ITIM benzeri motif. ITIM ve ITIM-benzeri motifler inhibitör sinyal transdüksiyonunda görevlidir (Jiang ve diğ. 2014). CD33 clatrin bağımsız endositoz aracılı ile immün hücre-hücre etkileşimleri tetikler (Tateno ve diğ. 2007). CD33 Hücre-hücre etkileşimlerini tetiklediği gibi immün hücrelerin normal fonksiyonlarını inhibe eder (Jiang ve diğ. 2014).

PICALM (Klatrin düzeneği bağlayıcı protein Fosfatidilinositol) Geni

A β 'nin damar duvarları boyunca ve kan dolaşımına transfer edilmesi, A β 'nin beyinden iraklaştırılmasının temel yoludur ve picalm, bu zamanda katılmak için ideal olarak endotel hücrelerinin içine yerleştirilir. PICALM ekspresyonunun Ap seviyelerinden etkilenip etkilenmediğini ve A β alımı ve endotel hücreleri tarafından taşınmasını etki edip etmediğini belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Wei ve diğ., 2020).

CR1 (Komplement Reseptör) Geni

Polimorfonükleer hücreler ve monositler üzerinde CR1 molekülleri, özellikle klatrin kaplı çukurlarda bulunan çeşitli bağışıklık kompleksleri ve partikülleri

tanınabilir (Fear ve diğ., 1981). Komplement reseptör 1 geni, 1q32 lokusundaki Kromozom 1 üzerinde yer alır. C-gama reseptörleri ve CR1, immünoglobulinler ve komplement proteinler tarafından opsonize edilmiş partiküllerin alımını desteklemek için sinerjizm olarak çalışır. Parçacıklar, lizozomlarda dahil ve yok edilir (Ehlenberger ve Nussenzweig 1977).

CR1 için çeşitli gen polimorfizmleri incelenmiştir. Gen varyansı, büyük moleküler ağırlık değiştiren ekleme/silme polimorfizmlerinden, hücre yüzeyindeki CR1 moleküllerinin yoğunluğunu etkileyen minimal protein değiştiren intronikyadaeksonik bir nükleotid polimorfizmlerine kadar değişebilir.

Otoimmün bozukluklar, birçok faktör ile ilişkilendirilmiştir. Otoimmün doku hasarında olan patojenik mekanizmalar ile ilgili önemli çalışmalar yapılmıştır. Mekanizmalardan bir tanesi CR1'i otoimmün bozuklukların etiyopatogenezi ile bağdaştırılır. Kemik iliği stromal hücreleri üzerindeki CR1 molekülüne tanıtıldığında C4b'nin kendi antijenlerine bağlanmasının, otoreaktif B hücrelerinin up regülasyonuna yani B hücresi toleransının korunmasına yol açtığı ileri sürülmüştür.

Etkileyici uçta CR1, vaskülatürde, glomerüllerde ve sinovyumda birikim üzerine kompleman aktivasyonu ve Fc aracılı flojistogenez yoluyla doku hasarına yol açabilen immün kompleksleri temizleyerek konak dokuyu korumaya imkan sağlar. Bir de CR1'in tamamlayıcı düzenleyici fonksiyonları ve otoimmün konakçı doku yıkımının iyileştirilmesinde önemli bir role sahip olabilir (Prodeus ve diğ., 1998).

BIN1 (Köprülemeİntegratörü) Geni

BIN1 geni diğer farklı proteinler ile etkileşime giren vücut dokularında bulunan protein yapmak için talimatlar içerir. BIN1 proteininin, materyallerin hücre yüzeyinden hücre içine taşınmasında (endositoz) ve hücrelerin kendi kendine yok etmesinde (apoptoz) rol oynadığı düşünülmektedir. BIN1 proteini, bir tümör baskılayıcı protein görevi görebilir, bu da hücrelerin çok hızlı ya da kontrolsüz bir şekilde büyümesini ve bölünmesini önlediği anlamına gelir.

BIN1 proteininin birkaç farklı izoformları BIN1 geninden üretilir. Bu izoformlar boyuta göre değişir ve çeşitli dokularda aktiftir. Kas hücrelerinde ifade edilen BIN1 proteini izoformunun, enine tübüller veya T tübüller gibi yapıların oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir. Bu yapılar, kas kasılması ve gevşemede rol oynadıkları kas hücrelerinin zarında bulunur (Böhm ve diğ.).

MS4A1 (B-lenfosit antijeni CD20) Geni

İnsanlarda CD20, MS4A1 geni tarafından kodlanır. Bu gen, zarı kapsayan 4A gen ailesinde bir üyesini kodlar. Bu yeni oluşmuş olan protein ailesinin üyeleri, ortak yapısal özellikler ve benzeri intron -ekson ekleme sınırlarıyla karakterize edilir ve hematopoietik hücreler ve lenfoid olmayan dokular arasında benzeri olmayan ekspresyon modelleri sergiler. Bu gen, B hücrelerinin gelişmesinde ve plazma hücrelerine farklılaşmasında rol oynayan bir B lenfosit yüzey molekülü kodlar. Bu aile üyesi, bir grup aile üyesi arasında 11q12'de yerleştirilmiştir. Bu genin alternatif olarak birleştirilmesi, aynı proteini kodlayan iki transkript varyantıyla sonuçlanır. B hücreli lenfomalarda, tüylü hücreli lösemide, B hücreli kronik lenfositik lösemide ve melanom kanseri kök hücrelerinde bulunur (Fang ve diğ.)

İmmünohistokimya, histolojik doku kesitlerinde hücrelerde CD20'nin varlığını belirlemek için kullanılabilir. CD20, çoğu B hücreli neoplazmın hücrelerinde mevcut kaldığından, başka türlü benzeri görünen T hücreli neoplazilerde bulunmadığından ve B hücreli lenfomalar ve lösemiler gibi durumların teşhis edilmesinde çok yararlı olabilir. Bununla beraber, bu tür tümörlerde CD20'nin varlığı veya yokluğu, hastalığın seyrinde her iki durumda da hemen hemen aynı olmakla birlikte prognozla ilgili değildir. CD20 pozitif hücreler bazen miyelom, Hodgkins hastalığı ve timoma vakalarında da bulunur (Cooper ve Anthony 2003).

CD2AP (CD2-ilişkili protein a) Geni

Bu gen, aktin hücre iskeletini düzenleyen yapı iskelesi molekülünü kodlar. Protein, çok sayıda aktin bağlanma bölgesi, SH3 alanları ve SH3 alanları için

bağlanma b6lgeleri içeren prolince zengin bir b6lge yardımıyla ipliksi aktin ve çeşitli hücre membran proteinleri ile doğrudan etkileşime girmektedir. Sitoplazmik protein, zar kıvrımlarına, lipit sallarına ve hücrelerin 6n kenarlarına yerleşir. Resept6r endositozu ve sitokinez sırasında oluşan dinamik aktin yeniden modellenmesi ve membran trafiğinde rol oynar. CD2AP geninin haplo yetmezliği, glomer6ler hastalığa yatkınlıkla ilişkilendirilir (Kirsch ve diğ. 1999).

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : ŞULE IRMAK
Doğum Yeri ve Tarihi : DENİZLİ/02.02.1994
Lisans Üniversitesi : UŞAK ÜNİVERSİTESİ
Elektronik posta : sleirmk.20@gmail.com
İletişim Adresi : Değirmenönü/DENİZLİ
Konferans listesi :

• Irmak S., Kale E., Sezer Senol F., Ozgun Acar O., Tataringa G., Zbancioc A., Skalicka-Wozniak K., Erdogan Orhan I., Sen A. (2019) Investigation of the Anti-Alzheimer Effect of Novel Coumarin Derivative. 7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İstanbul, Turkey.