



**NÖRAL HASTALIKLARDA ALTERNATİF BİR İLAÇ ADAYI
OLABİLECEK *Glaucium corniculatum* EKSTRAKTLARININ APOPTOZ,
İNFLAMASYON VE ASETİLKOLİNESTERAZ (AChE)'İ BASKILAMA
POTANSİYELLERİNE GÖRE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fatma Gonca KOÇANCI

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EKİM 2018

Fatma Gonca KOÇANCI tarafından hazırlanan “NÖRAL HASTALIKLARDA ALTERNATİF BİR İLAÇ ADAYI OLABİLECEK *Glaucium corniculatum* EKSTRAKTLARININ APOPTOZ, İNFLAMASYON VE ASETİLKOLİNESTERAZ (AChE)’ı BASKILAMA POTANSİYELLERİNE GÖRE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Belma ASLIM

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

Başkan: Prof. Dr. Zekiye SULUDERE

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

Üye: Prof. Dr. Nursel GÜL

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

Üye: Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

Üye: Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

Tez Savunma Tarihi: 22/10/2018

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

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

Fatma Gonca KOÇANCI

22/10/2018

NÖRAL HASTALIKLARDA ALTERNATİF BİR İLAÇ ADAYI OLABİLECEK
Glaucium corniculatum EKSTRAKTLARININ APOPTOZ, İNFLAMASYON VE
ASETİLKOLİNESTERAZ (AChE)'İ BASKILAMA POTANSİYELLERİNE GÖRE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Fatma Gonca KOÇANCI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ekim 2018

ÖZET

Alzheimer, Parkinson, Huntington ve amiyotrofik lateral skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklar, kolinerjik iletim kaybı (AChE enzim artışı), apoptoz ve inflamasyonun neden olabileceği nöronal hasar ile karakterizedir. Nörodejeneratif hastalıklar için geliştirilen mevcut ilaçlar, hastalığın tam anlamıyla tedavisini sağlayamamaktadır. Bu tez çalışmasında, nörodejeneratif hastalıkların ortak mekanizmaları üzerinde etkisi ortaya konmuş, doğal ve yeni bir bitkisel ajanın bulunması amaçlanmıştır. *Glaucium corniculatum* bitkisinin kloroform, metanol ve su ekstraktlarında toplam alkaloid, flavonoid ve fenolik bileşik miktarı spektrofotometre ile, biyoaktif bileşen içeriği ise GC-MS ve HPLC ile belirlenmiştir. Ekstraktların *in vitro* ve hücresel asetilkolinesteraz inhibitör (AChE-i) özellikleri Ellman yöntemi ile belirlenmiş, hidrojen peroksit (H₂O₂) ile AChE aktivitesi indüklenmiş farklılaştırılmış PC12 (fPC12) hücre modelinde AChE gen ve protein düzeyinde etkileri qRT-PCR ve western blot hibridizasyon yöntemleriyle incelenmiştir. Aynı hücre modeli ile apoptoza indüklenen fPC12 hücrelerinde, ekstraktların apoptozu inhibe edici etkileri qRT-PCR ve western blot hibridizasyon yöntemleriyle belirlenmiştir. Ayrıca, BV-2 hücrelerinde lipopolisakkarit (LPS) ile oluşturulan inflamatuvar hücre modelinde ekstraktların TNF- α ve IL-6 üzerindeki etkileri ELISA kitleri ile tespit edilmiştir. Her üç ekstrede de alkaloid (93-112 mg/g ekstre), flavonoid (0,71-1,55 mg/g ekstre) ve fenolik bileşen (1,45-1,70 mg/g ekstre) belirlenmiştir. Ellman yöntemiyle gerçekleştirilen analizlerde tüm ekstraktların *in vitro* ve hücresel AChE-i etkilerinin olduğu saptanmış, gen (% 29-90 AChE inhibisyonu) ve protein düzeyinde (% 16-21 AChE inhibisyonu) elde edilen veriler de bu sonuçları doğrulamıştır. Test edilen tüm yöntemlerde metanol ekstraktı, AChE-i özellik bakımından diğer ekstrelerle göre öne çıkmış olup, ekstrelerin allokriptopin alkaloidini, rutin ve kuersetin flavonoidini yüksek oranda içerdiği dikkati çekmiştir. Ekstrelerin nöral apoptoza indüklenmiş hücre modelinde Bax, Kaspaz 3, 9 ve Bcl-2 gen ve proteinlerini baskılayarak, nöral apoptozu giderici etki gösterdiği tespit edilmiştir. *G. corniculatum*'un üç ekstrelerinin de LPS kaynaklı TNF- α (% 12-70 oranında) ve IL-6 (% 23-96 oranında) indüksiyonunu önemli ölçüde engellediği ve BV-2 hücrelerinde anti-inflamatuvar etki gösterdiği saptanmıştır. Apoptoz ve inflamasyon yollarında su ekstrelerinin 1000 μ g/mL'lik konsantrasyonu, diğer uygulamalara göre öne çıkmıştır. Bunun ekstredeki tetrahidroberberin ve oleamid miktarıyla ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Sonuçlar, *G. corniculatum* ekstraktlarının nörodejeneratif hastalıklar üzerinde üç farklı mekanizma ile etkili olabileceğini göstermiştir.

Bilim Kodu : 20309
Anahtar Kelimeler : *Glaucium corniculatum*, total bitki ekstraktı, PC12 hücre hattı, BV-2 hücre hattı, nörodejeneratif hastalıklar, AChE, apoptoz, inflamasyon.
Sayfa Adedi : 196
Danışman : Prof. Dr. Belma ASLIM

THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF *Glaucium corniculatum* EXTRACTS,
WHICH MAY BE CANDIDATES FOR AN ALTERNATIVE DRUG IN NEURAL
DISEASES, ACCORDING TO THEIR SUPPRESSION POTENTIAL OF APOPTOSIS,
INFLAMMATION AND ACETYLCHOLINESTERASE (AChE)

(Ph. D. Thesis)

Fatma Gonca KOÇANCI

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

October 2018

ABSTRACT

Neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's diseases, and Amyotrophic lateral sclerosis are characterized by neuronal damage which may be caused by loss of cholinergic transmission (AChE enzyme increase), apoptosis and inflammation. Existing drugs against these neurodegenerative diseases can not provide a complete cure. In this thesis, a natural and new herbal agent, the effect of which has been revealed on the common mechanisms of neurodegenerative diseases, has been aimed to be discovered. The amount of alkaloid, flavonoid and phenolic compounds in the chloroform, methanol and water extracts of *Glaucium corniculatum* have been determined by spectrophotometer and their bioactive component contents determined by GC-MS and HPLC. The *in vitro* and cellular acetylcholinesterase inhibitor (AChE-i) properties of the extracts have been determined by ELISA, their effects of AChE mRNA and protein expression determined by qRT-PCR and western-blot hybridization methods in differentiated PC12 (fPC12) cell model which AChE activity induced with hydrogen peroxide (H₂O₂). Apoptosis inhibitory effects of extracts have been determined by qRT-PCR and western blot hybridization methods in the apoptosis-induced fPC12 cells with the same cell model. Furthermore, the effects of extracts on TNF- α and IL-6 in the lipopolysaccharide (LPS)-induced microglial BV-2 cell model have been determined by ELISA kits. In all three extracts, alkaloid (93-112 mg/g extract), flavonoid (0.71-1.55 mg/g extract) and phenolic component (1.45-1.70 mg/g extract) were determined. In the analysis carried out by the Ellman method, it was determined that all extracts had *in vitro* and cellular AChE-i effects and these data obtained at the gene (29-90% inhibition of AChE) and protein (16-21% inhibition of AChE) level also confirmed these results. In all of the methods tested, the methanol extract came out with respect to AChE-i properties, and it was noted that the extract contains a high proportion of allocryptopine alkaloid, rutin and quercetin flavonoids. In the neural apoptosis induced cell model, the extracts were found to suppress the Bax, Caspase 3, 9 and Bcl-2 genes and proteins and showed a neural apoptosis inhibiting effect. It was determined that three extracts of *G. corniculatum* significantly inhibited LPS-induced TNF- α (ratio of 12 to 70%) and IL-6 (ratio of 23 to 96%) induction and showed anti-inflammatory effects in BV-2 cells. The 1000 μ g/mL concentration of water extract was more prominent than other applications in the pathways of apoptosis and inflammation. This was thought to be related to the amount of tetrahydroberberin and oleamide in the extract. The results demonstrated that *G. corniculatum* extracts may be effective in the neurodegenerative diseases through three different mechanisms.

Science Code : 20309

Key Words : *Glaucium corniculatum*, total plant extract, PC12 cell line, BV-2 cell line, neurodegenerative diseases, AChE, apoptosis, inflammation.

Page Number : 196

Supervisor : Prof. Dr. Belma ASLIM

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve doktora eğitimim süresince bilgisini, deneyimini ve fikirlerini benimle paylaşarak bana her konuda destek olan, sevgi ve anlayışını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Belma ASLİM'a, en içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda kullandığım bitki materyallerinin toplanmasını ve teşhisini sağlayan Sayın Prof. Dr. Zeki AYTAÇ'a, tez çalışmama öneri ve katkılarından dolayı tez izleme komitemde yer alan Sayın Prof. Dr. Zekiye SULUDERE ve Sayın Prof. Dr. Nursel GÜL'e, tezimin son haline gelmesinde katkılarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK ve Sayın Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ'a, bazı deneysel çalışmalarda deneyimlerinden ve bilgilerinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. Uğur TAMER'e ve Sayın Doç. Dr. İ. Çağatay KARAARSLAN'a, bazı deneysel çalışmalarına yardımlarından dolayı Arş. Gör. Hayriye AKEL'e ve Esin Nagihan KASAP'a, Gazi Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda birlikte çalıştığım arkadaşlarıma, yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Ümmügülsüm TÜKENMEZ'e, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Öğrenci İşleri personeli Doğan KARA'ya teşekkürlerimi arz ederim.

Tezim süresince çalışmalarına zaman ayırmama olanak sağlayan ve bu tezin oluşmasında bana verdiği destek ile büyük katkısı olan INTECRO Robotik, Otomasyon, Ar-Ge, Mühendislik, Mak. San. Tic. A.Ş. Yönetim Kurulu Başkan Yrd. ve CEO'su Sayın Ahmet Ali ŞEN'e, Genel Müdür Yrd. Sayın Cihan ŞENSOY'a ve tüm INTECRO Robotik ailesine teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Sevgisi, desteği ve sabrı ile hep yanımda olan, yol göstericim, hayat arkadaşım Mustafa KOÇANCI'ya, hayatlarının daha ilk yıllarında küçük bedenleri ve büyük kalpleriyle bana verdikleri destek için oğullarım Bekir Rüzgar KOÇANCI ve Mete Deniz KOÇANCI'ya, beni yetiştirip bugünlere getiren, sonsuz destekleri ile bana güç veren annem Aysel ÖKTEM ve babam Başar ÖKTEM'e; kardeşim Ceyhun ÖKTEM'e tüm aileme ve arkadaşlarıma bütün kalbimle teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından 05/2017-01 No'lu proje ile desteklenmiştir. Maddi katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Rektörlüğü'ne ve 116S299 nolu proje kapsamında aldığım burstan dolayı TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	7
2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar	7
2.2. Nörodejeneratif Hastalıklara Sebep Olan Etmenler	8
2.2.1. Genetik faktörlerin nörodejeneratif hastalıklardaki rolü.....	9
2.2.2. Proteinlerin yanlış katlanması ve agregasyonunun nörodejeneratif hastalıklardaki rolü.....	11
2.2.3. Oksidatif stresin nörodejeneratif hastalıklardaki rolü	14
2.2.4. Mitokondriyal disfonksiyonun nörodejeneratif hastalıklardaki rolü.....	15
2.2.5. Kolinerjik iletim kaybı ve asetilkolinesterazın (AChE) nörodejeneratif hastalıklardaki rolü.....	16
2.2.6. İnflamasyonun nörodejeneratif hastalıklardaki rolü.....	18
2.3. Nöral Ölüm Yolakları ve Nörodejeneratif Hastalıklardaki Rolü	22
2.3.1. Apoptoz	22
2.3.2. Nekroz	26
2.3.3. Otofajik hücre ölümü	29
2.3.4. Paraptoz.....	29

	Sayfa
2.3.5. Fagositozla hücre ölümü (Fagoptoz).....	30
2.4. Nörodejeneratif Hastalıkların Tedavisi İçin Geliştirilen İlaçlar ve Etki Mekanizmaları	30
2.4.1. AChE inhibitörleri (AChE-i'leri).....	30
2.4.2. Dopaminerjik etkili ilaçlar	33
2.4.3. Anti-inflamatuar ilaçlar	34
2.4.4. Gamma-aminobutirik asit (GABA) agonistleri.....	34
2.4.5. N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör baskılayıcıları	35
2.4.6. Antioksidan bileşikler	35
2.4.7. Anti-apoptotik GSK-3 β inhibitörleri.....	35
2.5. Nörodejeneratif Hastalıkların Tedavisinde Kullanılan Alternatif Bitkisel Sekonder Metabolitler	37
2.5.1. Fenolik bileşikler.....	38
2.5.2. Alkaloidler.....	43
2.6. Nörodejeneratif Hastalıkların Araştırılmasında Kullanılan Model Hücre Hatları	47
2.6.1. PC12 hücre hattı	47
2.6.2. BV-2 hücre hattı	48
2.7. <i>Glaucium corniculatum</i> (L.) Rudolph Türünün Genel Özellikleri	49
2.7.1. <i>G. corniculatum</i> türünün sekonder metabolitleri	51
2.7.2. <i>G. corniculatum</i> türünün biyolojik aktivitesi ve nörolojik hastalıklardaki etkinliği.....	51
3. MATERYAL VE METOT	53
3.1. Materyal	53
3.1.1. Çalışmada kullanılan bitki ve temini.....	53
3.1.2. Çalışmada kullanılan hücre hatları	53
3.2. Metot	54
3.2.1. Bitki ekstraktlarının hazırlanması	54

3.2.2. Bitki ekstraktlarında bazı sekonder metabolitlerin ve biyoaktif bileşiklerin spektrofotometre, GC-MS ve HPLC ile tayini.....	54
3.2.3. PC12 hücrelerinin geliştirilmesi ve farklılaştırılması.....	58
3.2.4. BV-2 hücrelerinin geliştirilmesi ve morfolojisinin kontrolü.....	60
3.2.5. Hücre canlılık testi ile sitotoksik etkinin belirlenmesi	60
3.2.6. Bitki ekstrelerinin <i>in vitro</i> ve hücresel AChE aktivitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi.....	63
3.2.7. Bitki ekstrelerinin gen düzeyinde etkilerinin belirlenmesi.....	68
3.2.8. Bitki ekstrelerinin proteinler üzerinde etkilerinin western blot hibridizasyon ile belirlenmesi	75
3.2.9. İnflamasyonun ELISA ile belirlenmesi.....	77
3.3. İstatistiksel Analizlerin Yapılması ve Sonuçların Değerlendirilmesi	79
4. DENEYSEL BULGULAR	81
4.1. Ekstre Verimine Ait Bulgular	81
4.2. Ekstrelerdeki İçerik Analizine Ait Bulgular	81
4.2.1. Spektrofotometrik analiz	81
4.2.2. GC-MS ve HPLC analizi.....	82
4.3. PC12 Hücrelerinin Farklılaşma Kontrolü	83
4.4. Farklı H ₂ O ₂ Konsantrasyonlarının PC12 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	84
4.5. Bitki Ekstrelerinin PC12 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	86
4.6. H ₂ O ₂ 'nin ve Bitki Ekstrelerinin Birlikte PC12 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi..	87
4.7. Bitki ekstrelerinin <i>In Vitro</i> Asetilkolinesteraz (AChE) İnhibitör Etkisi	89
4.8. Hücresel AChE'nin H ₂ O ₂ ile İndüksiyonu.....	90
4.9. Bitki Ekstraktlarının fPC12 Hücresel AChE Seviyesine Etkisi.....	92
4.9.1. Bitki ekstraktlarının hücresel AChE indükleyici etkisi.....	92
4.9.2. Bitki ekstraktlarının hücresel AChE inhibitör etkisi	93
4.9.3. Bitki ekstraktlarının hücresel AChE indüksiyonunu engelleyici etkisi ...	94

4.10. H ₂ O ₂ ile Oluşturulmuş Nörodejeneratif fPC12 Hücre Modelinde Bitki Ekstrelerinin mRNA ve Protein İfade Düzeylerine Etkisi.....	95
4.10.1. H ₂ O ₂ ile AChE aktivitesi uyarılmış fPC12 hücrelerinde bitki ekstrelerinin AChE mRNA ve protein ifade düzeylerine etkisi.....	95
4.10.2. H ₂ O ₂ ile nöral apoptoza indüklenmiş fPC12 hücrelerinde bitki ekstrelerinin apoptotik mRNA ve protein ifade düzeylerine etkisi.....	99
4.11. LPS ile İndüklenmiş İnflamatuar BV-2 Hücrelerinde Bitki Ekstrelerinin Anti-inflamatuar Etkilerinin Belirlenmesi	111
4.11.1. BV-2 hücrelerinin gelişim kontrolü	111
4.11.2. Farklı LPS konsantrasyonlarının BV-2 hücre canlılığına etkisi.....	111
4.11.3. Farklı konsantrasyonlarda bitki ekstrelerinin BV-2 hücre canlılığına etkisi	112
4.11.4. Bitki ekstreleri ve LPS'nin BV-2 hücre canlılığına etkisi	113
4.11.5. BV-2 hücrelerinde LPS'nin TNF- α indükleyici konsantrasyonlarının belirlenmesi	114
4.11.6. Bitki ekstraktlarının TNF- α indüksiyonunu engelleyici etkisi.....	115
4.11.7. Bitki ekstraktlarının IL-6 indüksiyonunu engelleyici etkisi.....	117
5. TARTIŞMA	121
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	145
KAYNAKLAR	149
ÖZGEÇMİŞ	195

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Nörodejeneratif hastalıklar üzerinde etkili ilaçlar ve etki mekanizmaları	36
Çizelge 2.2. Nörodejeneratif hastalıklar üzerinde etkili bitkisel sekonder metabolitler ve etki mekanizmaları	46
Çizelge 3.1. qRT-PCR için kullanılan primerler ve özellikleri	69
Çizelge 3.2. Revers-trankripsiyon reaksiyon içeriği	70
Çizelge 3.3. QRT-PCR koşulları	72
Çizelge 3.4. QRT-PCR programı	72
Çizelge 3.5. Western blot hibridizasyon için kullanılan antikorlar, dilüsyon oranları ve moleküler ağırlıkları	77
Çizelge 4.1. <i>G. corniculatum</i> bitkisinden üç farklı çözücü ile elde edilen ekstre miktarı ve verimi	81
Çizelge 4.2. <i>G. corniculatum</i> bitkisinden üç farklı çözücü ile elde edilen ekstrelerde toplam alkaloid, flavonoid ve fenolik bileşik miktarı (mg/g ekstre)	81
Çizelge 4.3. <i>G. corniculatum</i> total kloroform, metanol ve su ekstralarında biyoaktif bileşik analizi	82
Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyon ve sürelerde H ₂ O ₂ uygulanmış PC12 hücrelerinin kontrole göre yüzde hücre canlılıkları	85
Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde (saat) <i>G. corniculatum</i> ekstralarının PC12 hücre canlılığına etkileri	87
Çizelge 4.6. H ₂ O ₂ ve <i>G. corniculatum</i> ekstratlarının PC12 hücre canlılığı üzerine konsantrasyon ve süreye bağlı etkileri	89
Çizelge 4.7. <i>G. corniculatum</i> ekstralarının farklı konsantrasyonlarda <i>in vitro</i> % AChE inhibisyonları	90

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Nörodejenerasyona sebep olan etmenler.....	8
Şekil 2.2. APP'nin metabolizasyonu	13
Şekil 2.3. Tau proteininin hiperfosforilasyonu ve NFY'lerin oluşumu.....	14
Şekil 2.4. Mitokondride ROS oluşumu, nötralizasyonu ve ROS artışının nörodejeneratif hastalıklardaki rolleri.....	16
Şekil 2.5. AChE'nin 7. kromozom üzerindeki yeri.....	17
Şekil 2.6. ACh'nin AChE tarafından hidrolizi.....	18
Şekil 2.7. İnflamasyonun oksidatif stres ve nörodejenerasyon ile bağlantısı.....	20
Şekil 2.8. İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolları.....	24
Şekil 2.9. AChE inhibitörlerinin (AChE-i) nöral apoptozdaki rolü.....	31
Şekil 2.10. AChE inhibitörlerinin (AChE-i) fonksiyonları	32
Şekil 2.11. Flavonoidlerin nörodejeneratif mekanizmalardaki rolleri	39
Şekil 3.1. Standart eğrileri ve regresyon denklemleri A: Alkaloid (Boldin) B: Flavonoid (Rutin) C: Fenolik bileşik (Gallik Asit).....	56
Şekil 3.3. Protein (BSA) standart eğrisi ve regresyon denklemi.....	65
Şekil 3.2. Primerler ile hedef gen bölgelerinin erime eğrileri A: AChE B: Bax, C: Kaspaz 3, D: Kaspaz 9, E: Bcl-2, F: GAPDH.....	74
Şekil 3.4. A: TNF- α standart eğrisi ve regresyon denklemi B: IL-6 standart eğrisi ve regresyon denklemi	79
Şekil 4.1. 6, 12, 24 ve 48 saat 50 ve 100 μ M H ₂ O ₂ uygulanmış fPC12 hücrelerinde kontrole göre % AChE aktivitesi	92
Şekil 4.2. H ₂ O ₂ ve <i>G. corniculatum</i> ekstrelerinin fPC12 hücrelerinde kontrole göre % AChE aktiviteleri	95
Şekil 4.3. H ₂ O ₂ 'nin ardından farklı konsantrasyonlarda <i>G. corniculatum</i> ekstreleri uygulanmış fPC12 hücrelerinde AChE mRNA ifade düzeyleri	96
Şekil 4.4. H ₂ O ₂ 'nin ardından farklı konsantrasyonlarda <i>G. corniculatum</i> ekstreleri uygulanmış fPC12 hücrelerinde AChE protein seviyesi.....	98
Şekil 4.5. H ₂ O ₂ 'nin ardından farklı konsantrasyonlarda <i>G. corniculatum</i> ekstreleri uygulanmış fPC12 hücrelerinde Bax mRNA ifade düzeyleri.....	100

Şekil	Sayfa
Şekil 4.6. H ₂ O ₂ 'nin ardından farklı konsantrasyonlarda <i>G. corniculatum</i> ekstreleri uygulanmış fPC12 hücrelerinde Bax protein seviyesi	101
Şekil 4.7. H ₂ O ₂ 'nin ardından farklı konsantrasyonlarda <i>G. corniculatum</i> ekstreleri uygulanmış fPC12 hücrelerinde Kaspaz 3 mRNA ifade düzeyleri.....	102
Şekil 4.8. H ₂ O ₂ 'nin ardından farklı konsantrasyonlarda <i>G. corniculatum</i> ekstreleri uygulanmış fPC12 hücrelerinde Kaspaz 3 protein seviyesi.....	104
Şekil 4.9. H ₂ O ₂ 'nin ardından farklı konsantrasyonlarda <i>G. corniculatum</i> ekstreleri uygulanmış fPC12 hücrelerinde Kaspaz 9 mRNA ifade düzeyleri.....	105
Şekil 4.10. H ₂ O ₂ 'nin ardından farklı konsantrasyonlarda <i>G. corniculatum</i> ekstreleri uygulanmış fPC12 hücrelerinde Kaspaz 9 protein seviyesi.....	107
Şekil 4.11. H ₂ O ₂ 'nin ardından farklı konsantrasyonlarda <i>G. corniculatum</i> ekstreleri uygulanmış fPC12 hücrelerinde Bcl-2 mRNA ifade düzeyleri	108
Şekil 4.12. H ₂ O ₂ 'nin ardından farklı konsantrasyonlarda <i>G. corniculatum</i> ekstreleri uygulanmış fPC12 hücrelerinde Bcl-2 protein seviyesi.....	109
Şekil 4.13. Farklı konsantrasyonlarda 24 saat LPS uygulanmış BV-2 hücrelerinde kontrole göre % canlılık miktarları	112
Şekil 4.14. Farklı konsantrasyonlarda 24 saat <i>G. corniculatum</i> ekstraktlarının uygulandığı BV-2 hücrelerinde kontrole göre % hücre canlılık miktarları	113
Şekil 4.15. LPS'nin ardından uygulanan farklı konsantrasyonlarda <i>G. corniculatum</i> ekstraktlarının BV-2 hücre canlılığına etkisi	114
Şekil 4.16. Farklı konsantrasyonlarda 24 saat LPS uygulamalarının BV-2 hücrelerinde TNF- α seviyesine etkileri.....	115
Şekil 4.17. <i>G. corniculatum</i> ekstraktları ve LPS'nin BV-2 hücrelerinde TNF- α seviyesine etkileri.....	117
Şekil 4.18. <i>G. corniculatum</i> ekstraktları ve LPS'nin BV-2 hücrelerinde IL-6 seviyesine etkileri.....	118

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. <i>G. corniculatum</i> gövde, yaprak ve çiçeği	53
Resim 3.2. <i>G. corniculatum</i> çiçeği.....	53
Resim 4.1. NGF ile uyarılmış PC12 hücrelerinde nörit farklılaşmasının ışık mikroskop görüntüleri (40X büyütme)	84
Resim 4.2. NGF ile uyarılmış PC12 hücrelerinde nörit farklılaşmasının floresan mikroskop görüntüleri (A: Floresan izotiyosiyonat (FITC), hücre gövdesi boyaması; B: HOECHST, hücre çekirdeği boyaması, 40X büyütme)	84
Resim 4. 3. BV-2 hücrelerinin ışık mikroskop görüntüleri A: Uygulama yapılmamış BV-2 hücreleri, B: 24 saat 1 µg/mL LPS ile muamele edilmiş BV-2 hücreleri (10X büyütme).	111

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
bç	Baz çifti
cm	Santimetre
g	Gram
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
L	Litre
M	Molar
mg/L	Miligram/Litre
mL	Mililitre
n	Tekrar sayısı
°C	Santigrat derece
pH	Asitlik bazlık birimi
pmol/ µL	Pikomol/mikrolitre
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
µg	Mikrogram
µg/mL	Mikrogram/Mililitre
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
rpm	Dakikada devir sayısı (Rotations per minute)
Kısaltmalar	Açıklamalar
7q22	7. kromozomun uzun kolunun 22. bölgesinde
Ach	Asetilkolin

Kısaltmalar**Açıklamalar**

AChE	Asetilkolinesteraz
AChE-i	AChE inhibitör
AH	Alzheimer hastalığı
AIF	Apoptoz uyarıcı faktör
ALS	Amiyotrofik lateral sikleroz
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
APOE4	Apolipoprotein alleli ε4
APP	Amiloid prekürsör protein,
Asetil Ko A	Asetil koenzim A
ATP	Adenosin trifosfat
Aβ	Amiloid beta
Bax	Bcl-2 ile ilişkili X proteini
BCG	Bromokrezol yeşili
BChE	Butirilkolinesteraz
Bcl-2	B hücre lösemi/lenfoma-2
BSA	Bovine serum albümin
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
CH₃CO₂K	Potasyum asetat
ChAT	Kolinasetiltransferaz
CLU	Klusterin
COX	Siklooksijenaz
CO₂	Karbondioksit
CR1	Kompleman komponenti (3b/4b) reseptör 1
Ct	Döngü eşiği
ddH₂O	Çift distile su
dH₂O	Distile su
DISC	Ölüm Başlatma Sinyali Kompleksi
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DTNB	5,5'-Ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
ELISA	Enzim bağımlı immün test

Kısaltmalar**Açıklamalar**

FADD	Fas-ilişkili ölüm alan proteini
FDA	Amerikan İlaç Dairesi
FITC	Fluoresan izotiyosiyonat
fPC12	Farklılaştırılmış PC12 hücreleri
GABA	Gamma-aminobutirik asit
GAPDH	Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz
GFAP	Glial fibrilar asidik proteini
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	İndirgenmiş glutasyonun
GSK	Glikojen sentaz kinaz
GSK-i	Glikojen sentaz kinaz inhibitörü
GS-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
GSSH	Oksitlenmiş glutasyon
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
ILGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörü
Kasp-i	Kaspaz inhibitörü
Lipid A	Bifosforillenmiş lipid
LPS	Lipopolisakkarit
MAP	Mikrotübül ilişkili proteinler
MOMP	Mitokondriyal dış zar permeabilizasyonu
mPTP	Mitokondriyal zar geçirgenliğinin değişimi
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
NADPH	İndirgenmiş nikotinamid-adenine dinükleotid fosfat
NADPH	Nikotinamid-adenine dinükleotid fosfat
NCBI Ref. Sek.	NCBI Genbank'dan alınan referans sekansı
NFY	Nörofibriler yumaklar
NF-κB	Nükleer faktör-Kb
NGF	Nöron büyüme faktörü
NMDA	N-metil-D-aspartat
NO	Nitrik oksit

Kısaltmalar**Açıklamalar**

NSAİİ	Non-steroidal anti-inflamatuar ilaç
OD	Optik Yoğunluk
PARK	Parkinson hastalığına bağlı genler
PARP	Poli adenozin difosfat polimerazların
PBS	Fosfat tamponlu tuzlu su çözeltisi
PFA	Paraformaldehit
PGE2	Prostaglandin E2
PICALM	Fosfatidilinositol bağlayıcı klatrin birleştirme proteini
PINK1	PTEN ile uyarılan kinaz 1
PS	Polisakarit
PSEN	Presenilin
PVDF	Poliviniliden difluorid
QRT-PCR	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RIP	Pesepör interaktif protein
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT	Reverse transkripsiyon
SD	Standart sapma
SDS-PAGE	SodyumDodesilSülfat PoliAkrilamidJel Elektroforezi
SOD	Süperoksit dismutaz
sp	Tür
spp	Türler
TARDBP	Transaktif yanıtı DNA-bağlayıcı protein
TBS	Tris-tamponlu tuzlu su
TGF	Transforme edici büyüme faktörü
TLR	Toll-benzeri reseptör
TNF	Tümör nekroz faktörü
UBQLN	Ubiquilin
UCH	Ubikitin karboksi terminal hidrolaz
UNAM	Bilkent Üni. Malzeme Bilimi ve Nanoteknoloji Enst.
UPS	Ubikitin-proteazom sistemi

1. GİRİŞ

Nörodejeneratif hastalıklar, sinir sisteminin yapı taşı olan ve sinirsel iletişimin sağlanmasında ana unsur olan nöronların işlev kayıpları, hasarları ve ölümleri ile karakterize kronik ve ilerleyici bir grup hastalıktır. Nörodejeneratif hastalıkların en önemli temsilcileri, Alzheimer hastalığı (AH), Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı ve amiyotrofik lateral sikleroz (ALS)'dur (Jeong, 2017).

2015 yılında dünya üzerinde 46,8 milyon insanın demans hastası olduğu, bu sayının 2030 yılına kadar 74,7 milyon olacağı, 2050 yılında ise 131,5 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (Prince, Wimo, Guerchet, Ali, Wu ve Prina, 2015). Türkiye'de nörodejeneratif hastalıkların prevalansı ile ilgili bilgilere dayanarak, 600 bin Alzheimer, 100-200 bin Parkinson, 6000-8000 ALS hastası olduğu tahmin edilmektedir (İnternet 1). Nörodejeneratif hastalıklar, dünyada kardiyovasküler hastalıklar, inme ve kanser sonrası en yaygın ölüm nedenidir. Bu tip ilerleyici hastalıklarda hasta bakım masrafları da çok yüksek maliyetler gerektirmektedir (Prince ve diğerleri, 2015).

Nörodejeneratif hastalıklar, her ne kadar farklı fenotipik ve genotipik özelliklere sahip olsalar da hücrel mekanizmaların seviyesinde benzerlikler sergileyen ve ortak nöropatolojik özellikleri paylaşan rahatsızlıklardır (Barnham, Masters ve Bush, 2004; Hardy ve Selkoe, 2002). Hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) birikiminin, kolinerjik transmisyonunda rol oynayan ve sinaptik iletimi sonlandıran asetilkolinesteraz enziminin (AChE) artışına bağlı olarak kolinerjik sistemin bozulmasının, inflamasyonun ve apoptozun nöronal kayıp ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Gürer, 2005; Cooke, Evans, Dizdaroglu ve Lunec, 2003; Evans ve Cooke, 2004).

Bu hastalıklar için geliştirilen mevcut ilaçlar, hastalık belirtilerinin ortaya çıkmasını geciktirerek hastalığın seyrini yavaşlatmakta; fakat tam anlamıyla bir tedavi sağlayamamaktadır. Nörodejeneratif hastalıkların ortak mekanizmaları arasında AChE, oksidatif stres ve inflamasyon indüksiyonu olduğundan, nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için yeni ilaçların keşfine yönelik çalışmalar, AChE inhibitör (AChE-i) özellik gösteren, antioksidan ve anti-inflamatuar potansiyele sahip etken maddelerin tespiti üzerine yoğunlaşmıştır. Oluşabilecek yan etkinin de en aza indirgenmesini sağlamak adına, bu çalışmalarda yoğun olarak doğal kaynaklı etken maddeler ele alınmaktadır.

Nöral ölümden etkili olduğu bilinen en önemli mekanizmalardan biri, oksidatif strestir. Oksidatif stres, hücredeki ROS oluşum ve giderim dengesinin ROS artışı lehine bozulması ile başlayan ve hücrede lipit peroksidasyonunun, nükleer ve mitokondriyal DNAda tek ve çift zincir kırıklarının oluşmasına sebep olan bir durumdur (Cooke ve diğerleri, 2003; Evans ve Cooke, 2004; Gürer, 2005). Hücrelerde meydana gelen bu hasarların, geri dönüşümsüz bir hal aldığı hücrenin kendi kendini yok etmesine sebep olduğu bilinmektedir. Bu durumun sinir hücrelerinde gerçekleşmesi halinde ise nörodejenerasyonun başlayacağı bildirilmiştir (Gürer, 2005; Lipton ve Rosenberg, 1994; Berridge, Bootman ve Lipp, 1998; Nicholls ve Budd 1998). Oksidatif mekanizma bozuklukları, nörodejeneratif hastalıklar ile ilgili nöropatolojilerde gösterilmiştir (Meydani, 2001). Oksidatif strese sebep olan birçok ROS tespit edilmiş olmasına rağmen, hidrojen peroksit (H_2O_2)'in demir ve bakır gibi geçiş metalleri ile etkileşerek, hidroksil (OH) ve peroksinitrit (NO) gibi daha zararlı radikaller oluşturduğu ve diğer ROS'lara göre daha kararlı bir yapıda olduğu bildirilmiştir (Willcox, Ash ve Catignani, 2004). H_2O_2 'nin, sinir hücrelerinde ölümü tetiklediği, apoptotik genler ve proteinlerin ifadesinin artışına, anti-apoptotik genler ve proteinlerin ifadesinin ise azalışına sebep olduğu bilinmektedir (Feng ve diğerleri, 2013; Nair, Olanow ve Sealfon, 2003). Bu bilgiler, nörodejeneratif hastalıkların tedavisi ve / veya önlenmesinde ROS inaktivasyonuna sebep olan antioksidan ve anti-apoptotik bitkisel ajanların tespitine yönelik çalışmaları önemli kılmıştır. Bitki kimyasallarından olan sekonder metabolitlerin, organizmanın bir stres faktörüne maruz kaldığı durumda üretildiği ve anti-apoptotik, antioksidan, serbest radikal süpürücü etkilerin olması nedeniyle nörodejeneratif mekanizmaların blokasyonunda iyi bir aday olabileceği öngörülmektedir (Abdel-lateif, Maghrabi ve Eldeab, 2016; Nimse ve Pal, 2015; Al-Snafi, 2016).

Demansın en sık görülen şekli olan AH'nin, temel olarak kolinesteraz metabolizmasındaki değişim ve dejenerasyon ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Shen, 2004). AH'nin en önemli belirteçlerinden biri, merkezi sinir sisteminin önemli bir nöromediyatörü olan, asetilkolin (ACh)'i hidroliz eden ve dolayısıyla miktarının azalmasına ve post-sinaptik aktivitesinin sonlanmasına sebep olan AChE'nin, çeşitli beyin bölgelerinde artmasıdır (Francis, Palmer, Snape ve Wilcock, 1999). H_2O_2 'nin, AChE aktivitesinin artmasına ve inflamatuvar yolların harekete geçmesine sebep olduğu da gösterilmiştir (Toiber ve diğerleri, 2008). Nörodejeneratif hastalıklarda etkili olan oksidatif stresin, nörodejenerasyondan sorumlu olan yollar üzerinde çoklu etkisinin olması, nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde ve / veya önlenmesinde antioksidan etken maddelerin ve AChE-i'lerinin keşfini önemli hale

getirmiştir (Koçancı ve Aslım, 2016). Bugün AH'nin ilaçla tedavisinde en geçerli strateji AChE-i'leridir (Anand, Gill ve Mahdi, 2014). Ancak, mevcut AChE-i'ler ile AH semptomlarının tam anlamıyla tedavisi mümkün olamamaktadır. Ayrıca, bu ilaçlar baş dönmesi, bradikardi, atriyal aritmi, miyokard enfarktüsü, anjina, nöbetler, sino-atriyal ve atriyoventriküler blok gibi yan etkilere sahiptir (Wollen, 2010; Rowland, Rigby, Harper ve Rowland, 2007). Bu sebepten, AH tedavisinde tam başarı sağlayamayan ve AH'de koruyucu etkisi olmayan AChE-i ilaçların yerine, daha etkin ve yan etkisi daha az olan, yeni ve doğal ajanların keşfi önemli bir çalışma alanı haline gelmiştir. Bitkilerin savunma mekanizmaları için ürettiği alkaloidler, flavonoid, tanenler, saponinler gibi sekonder metabolitler, bitkilere terapötik özellikler kazandırabilmektedir. Ayrıca, bitki sekonder metabolitlerinin doğal yapıda olması ve sentetik ajanlara göre daha az yan etkiye sebep olabilme potansiyeli bakımından AChE-i özelliklerinin araştırılması için iyi bir kaynaktır. AChE-i aktiviteye sahip bileşiklerin çoğunun azotlu bileşikler olması nedeniyle, özellikle alkaloid bileşikler sentezleyen bitkiler üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır.

Nörodejeneratif hastalıklarda ortak bir diğer belirteç ise, nöroinflamasyondur. Nöroinflamasyon, bir organizmanın merkezi sinir sisteminde oluşan hasarı, enfeksiyonu veya nörodejeneratif hastalıklara sebep olan zararlı uyaranları gidermeye çalıştığı, hücreleri ve beynin genel işlevini korumak için iyileşme sürecini başlattığı biyokimyasal ve hücresele bir süreçtir (Gendelman, 2002). Akut nöroinflamatuvar yanıt, serbest radikaller, sitokinler ve kemokinler gibi inflamatuvar mediatörlerin salınmasına sebep olarak hasarlı dokunun onarılmasına katkıda bulunurken; kronik nöroinflamasyon, inflamatuvar mediatörlerin sürekli salınımını, oksidatif stres artışını ve apoptozu teşvik ederek nörodejenerasyonuna sebep olmaktadır (Milatovic, Zaja-Milatovic ve Gupta, 2014). Bu nedenle, nörodejenerasyonun tedavisine veya önlenmesine yönelik çalışmalarda inflamatuvar mekanizmaların anlaşılması ve anti-inflamatuvar ajanların keşfi önem kazanmıştır (Bakar ve Yuluğ, 2009). Araştırmalara göre anti-inflamatuvar ajan kullanımı, nörodejeneratif hastalıkların gelişim riskini azaltır (Bakar ve Yuluğ, 2009). Buna karşın, mevcut anti-inflamatuvar ajanların tedavide etkisi, istenilen düzeyde değildir. Yapılan çalışmalar, bitki sekonder metabolitlerinin, AChE inhibisyonu, serbest radikallerin etkilerinin giderilmesi, oksidatif DNA hasarının tamiri dışında, anti-inflamatuvar mekanizmalarla da nörodejenerasyonu baskılama potansiyellerine dikkat çekmiştir (Recio, Andujar ve Rios, 2012). Bitki sekonder metabolitleri, yüzyıllardır bellek bozukluğu tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır. Bileşenlerin etki mekanizmalarının yapısal özellikleri ile ilişkili olduğu ve özellikle alkaloid,

flavonoid ve fenolik bileşik gibi sekonder metabolitlerin nörodejeneratif hastalıklarda birçok yolak üzerinde etki gösterdiği bilinmektedir (Kumar ve Khanum, 2012; Bağlı, Goussia, Moschos, Agnantis ve Kitsos, 2016). *Papaveraceae* familyası üyesi olan ve geleneksel şifacılar tarafından hafıza artırıcı olarak kullanılan *Glaucium corniculatum* türü, bu sekonder metabolitleri içermesi bakımından nörodejeneratif hastalıklar üzerinde iyileştirici ve / veya koruyucu etki potansiteli olabilecek bitkilerden biridir (Ahmed, Ghalib, Sasikala ve Ahmed, 2013; Orhan, Sener, Choudhary ve Khalid 2004). Ayrıca, *G. corniculatum*'un AH'nin tedavisinde kullanılan en etkili strateji olan AChE'yi inhibe etme potansiyellerinin oldukça yüksek olduğu da belirlenmiştir (Orhan ve diğerleri, 2004). Ancak, literatürdeki bu çalışmaların, genellikle *in vitro* ile sınırlı kaldığı ve *G. corniculatum*'un nörodejeneratif mekanizmalar üzerinde detaylı etkisinin gösterildiği bir çalışmanın bulunmadığı dikkati çekmiştir. Bu tez çalışmasında, *G. corniculatum*'un üç farklı ekstresinin hidrojen peroksit (H_2O_2) ile nöral dejenerasyona uğratılmış, nörit benzeri farklılaştırılmış PC12 hücreleri (fPC12) üzerinde AChE ve apoptoz baskılayıcı ve lipopolisakkarit (LPS) uygulaması ile inflamasyon oluşturulmuş BV-2 hücreleri üzerinde anti-inflamatuar etkileri ilk defa ortaya konulmuştur.

Bu tez çalışmasında, *G. corniculatum* bitkisinin kloroform, metanol ve su ekstraktları ile çalışılmıştır. Ekstrelerin toplam alkaloid, flavonoid ve fenolik bileşik miktarları spektrofotometre, muhtemel biyoaktif bileşik içerikleri ise gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenmiştir. Çalışmamız kapsamında *G. corniculatum* ekstrelerinin *in vitro* ve hücresele (H_2O_2 kaynaklı AChE indüksiyonu gerçekleştirilmiş fPC12 hücrelerinde) AChE-i özellikleri hem gen hem de protein seviyesinde tespit edilmiştir. Ekstrelerin, H_2O_2 ile nöral apoptozun indüklendiği fPC12 hücre modelinde, Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 mRNA ve protein ekspresyon seviyesinde oluşan indüksiyonu inhibe edici, Bcl-2 mRNA ve protein ekspresyon seviyesinde oluşan inhibisyonu ise giderici etkileri incelenmiştir. Ayrıca, ekstrelerin LPS uygulaması ile inflamasyon oluşturulmuş BV-2 hücrelerinde, tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ve interlökin-6 (IL-6) pro-inflamatuar sitokinlerinin indüksiyonunu engelleyici etkileri incelenerek, anti-inflamatuar özellikleri ortaya konulmuştur.

Bu çalışması ile;

1. *G. corniculatum*'un üç farklı çözücü ile (kloroform, metanol ve su) elde edilmiş toplam ekstrelerinin ekstre verimleri, toplam alkaloid, flavonoid ve fenolik bileşik miktarları ve

biyoaktif bileşenleri tespit edilmiş olacaktır. Nörodejeneratif mekanizmalarda biyoaktif bileşenler bakımından en etkin olabilecek ekstre çözücüsü belirlenmiş olacaktır.

2. fPC12 hücrelerinde H₂O₂ ile nörodejeneratif hücre modelinin ve BV-2 hücrelerinde LPS ile inflamatuvar hücre modelinin oluşturulacağı en uygun konsantrasyon ve uygulama süresi belirlenecektir. Aynı zamanda, ekstrelerin nörodejeneratif ve inflamatuvar hücre modellerinde etkin olabilecek ve yüksek toksik etki göstermeyecek konsantrasyon ve uygulama süreleri tespit edilmiş olacaktır.
3. Ekstrelerin, AH'nin tedavisi için en geçerli strateji olan AChE-i etkisi hem *in vitro* hem de hücresele olarak saptanmış olacak ve H₂O₂ ile indüklenmiş fPC12 hücrelerinde AChE mRNA ve protein ifadesi üzerinde baskılayıcı etkileri belirlenmiş olacaktır. Böylece ekstrelerin AChE baskılayıcı etkisi üç farklı metotla belirlenecek, metotlarla sonuçlar doğrulanacağı gibi her üç yöntemin mukayesesi de yapılmış olacaktır.
4. Farklı çözücülerden elde edilen ekstrelerin bileşen farklılığının, AChE inhibisyonundaki etkinliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu şekilde AChE aktivitesi indüklenmiş nörodejeneratif hücre modelinde etkin olabilecek bileşen veya bileşenler belirlenmiş olacaktır.
5. Ekstrelerin H₂O₂ ile indüklenmiş fPC12 hücreleri üzerinde nöral hücre ölümünü giderici etkileri apoptoz yolağı üzerinde hem gen hem de protein seviyesinde belirlenmiş olacaktır.
6. Nöral apoptoza indüklenmiş hücre modelinde apoptozun baskılanmasında hangi ekstrenin ve dolayısıyla hangi bileşen veya bileşenlerin etkin olduğu ortaya konulacaktır.
7. Ekstrelerin AChE-i özellikleri ile nöral apoptoz baskılayıcı etkileri arasındaki ilişki ortaya konulmuş olacaktır.
8. Ekstrelerin LPS ile indüklenerek nöral inflamasyon oluşturulmuş BV-2 hücreleri üzerinde anti-inflamatuvar etkileri tespit edilmiş olacaktır.
9. Ekstrelerin AChE ile nöral apoptozu baskılayıcı ve anti-inflamatuvar etkilerinin ilişkili olup olmadığı ortaya konulmuş olacaktır. Ayrıca, ekstrelerin bileşen içeriklerine göre hangi mekanizma üzerinden etkili olacağı araştırılmış olacaktır.

Çalışmamız *G. corniculatum* ekstrelerinin nörodejeneratif hücre modelleri üzerinde AChE, nöral apoptoz ve inflamasyon olmak üzere üç farklı mekanizma ile etkisinin ortaya konulacağı ilk çalışma olması nedeni ile özgündür. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için yeni, bitkisel kaynaklı ajanların elde edilmesi ve etki mekanizmalarının ortaya konulması ile alternatif tedavi ve / veya korumaya yönelik yeni ilaç geliştirme çalışmalarına katkı

sağlanmış olacaktır. Bu çalışmanın sonuçlarına bağlı olarak, nörodejeneratif hastalıkların ortak mekanizmaları üzerinde etkileri kanıtlanmış yeni ve bitkisel bir ajan belirlenebilecektir. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilen çıktılar ile nörodejeneratif hücre modellerinde *G. corniculatum*'un ağırlıkla hangi bileşeninin hangi mekanizma üzerinden etkili olduğu da ortaya konulacaktır.

Bu alışma, 05/2017-01 No'lu BAP projesi tarafından desteklenmiştir.



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar

Nörodejenerasyon, nöronların yapısal fonksiyonel kaybını temsil eden bir terimdir. Nörodejeneratif hastalıklar, Alzheimer hastalığı (AH), Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, iskemi, Amiyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi farklı klinik fenotiplere ve genetik etiyojiye sahip değişik nörodejenerasyon süreçlerini kapsar (Gürer, 2005; Barnham ve diğerleri, 2004). Nörodejeneratif hastalıklar, serebral korteks, bazal gangliyonlar, serebellum, beyin sapı ve motor sistemleri alanlarında nöronal hücre kaybı ile karakterize edilir (Reitz, Brayne ve Mayeux, 2011; Reeve, Simcox ve Turnbull, 2014).

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre (World Health Organization, 2006), dünyada nörolojik bozukluklar sebebiyle gerçekleşen ölümün, toplam ölümlerdeki yüzdesi 2005 yılında 11,67, 2015'te 11,84 olarak belirlenmiştir. Bu oranın 2030'da % 12,22 olacağı öngörülmektedir. 2005 yılından dünya çapında nörodejeneratif hastalıklara sahip 25 milyon kişi olduğu ve bu rakamın her yıl 4 milyon arttığı bildirilmiştir. Herhangi bir önleyici veya tedavi edici stratejinin geliştirilememesi durumunda, bu rakamın 2040'da 80 milyon olacağı tahmin edilmektedir (Farooqui, 2010: 393).

Birleşmiş Milletler, Ekonomik ve Sosyal İşler Dairesi, Nüfus Bölümü'nün 2017'de yayınladığı Dünya Nüfus Beklentileri raporuna göre, 2050 yılında dünya nüfusunun 9,8 milyar, 80 yaş ve üzeri dünya nüfusunun ise 400 milyon olacağı bildirilmiştir (İnt-2). Bu durum, 2050'de dünya nüfusunun % 24,5'inin 80 yaş ve üzeri kişilerden oluşacağı anlamına gelmektedir. Türkiye'de ise toplam nüfusun % 8,7'sinin 65 yaş üstü olduğu ve 65 yaş üstü nüfusun diğer yaş gruplarına kıyasla hızlı bir artış gösterdiği kaydedilmiştir. Buna paralel olarak nörodejeneratif hastalıkların sayısında da hızlı bir artış izlenmektedir. Türkiye'de 600 bin AH'li kişi olduğu belirtilmiştir (İnt-1). AH'den sonra en sık görülen nörodejeneratif hastalığının Parkinson olduğu ve Türkiye'de 100-120 bin civarında Parkinson hastası bulunduğu kaydedilmiştir (İnt-3). Türkiye'de toplam 6000-8000 civarında ALS hastası olduğu ve her yıl 1500-4500 civarı hastanın ALS tanısı aldığı da belirtilmiştir (İnt-4).

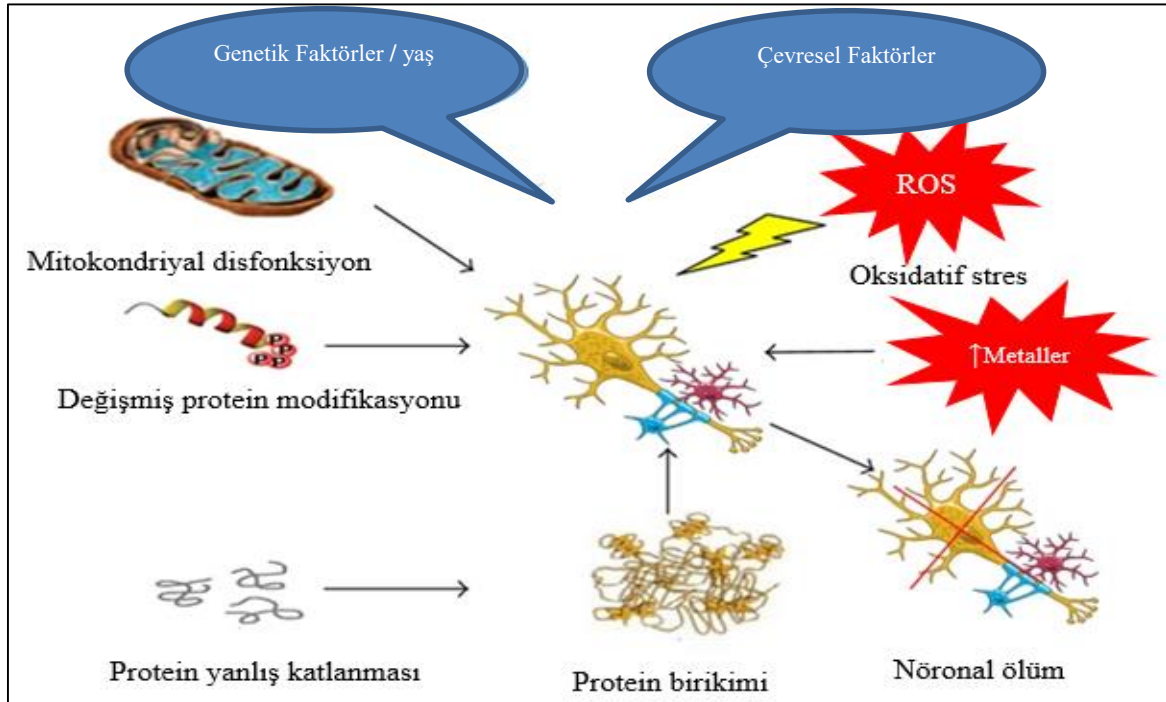
Nörodejeneratif hastalıkların yaş ile birlikte ilerlediği ve genellikle 65 yaş üstü nüfusu etkilediği göz önüne alındığında, nüfustaki yaşlanma hızının nörodejeneratif hastalıklar için

potansiyel bir risk oluşturduğu açıktır. Bu durum, nörodejeneratif hastalıkların teşhis ve tedavisinin önemini ortaya çıkarmaktadır.

Bu hastalıkların maddi, toplumsal ve kişisel etkileri göz önüne alındığında sebeplerinin, önlemlerinin ve tedavilerinin belirlenmesi, temel ve klinik araştırmaların önceliği haline gelmiştir. Nörodejeneratif hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde etkin ve yan etkisi az olan yeni ilaçların keşfedilmesi, her geçen gün önem kazanmaya devam etmektedir.

2.2. Nörodejeneratif Hastalıklara Sebep Olan Etmenler

Nörodejeneratif hastalıklardaki kompleks klinikopatolojik bulguların biyolojik temelleri belirsiz olmasına rağmen (Mehler ve Gokhan, 2000), bu tür hastalıklarda meydana gelen nöron kaybının, genetik faktörler, protein yanlış katlanmaları ve agregasyonu gibi anormal protein dinamikleri, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres ve serbest radikal oluşumu, kolinerjik iletimin bozulması, inflamasyon oluşumu ve hücre ölümü gibi çok faktörlü durumlar ile ortaya çıktığını gösteren kanıtlar vardır (Sheikh, Haque ve Mir, 2013; Gürer, 2005; West, Coleman, Flood, Troncoso, 1994; Price ve diğerleri 2001; Gómez –Isla ve diğerleri 1996; Selkoe, 2001) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Nörodejenerasyona sebep olan etmenler (Sheikh ve diğerleri, 2013)

2.2.1. Genetik faktörlerin nörodejeneratif hastalıklardaki rolü

Nörodejeneratif hastalıklarda, genetik faktörler büyük oranda hastalığın gelişimi için çevresel faktörlere yatkınlık zemini yaratır. Genetik yatkınlığın hem kalıtsal hem de sporadik nörodejeneratif hastalıkların başlangıç ve ilerlemesinde önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir (Hagenaars ve diğerleri, 2018).

AH ve AH'nin genetik faktörleri

AH, 1906 yılında Dr. Alois Alzheimer tarafından tanımlanan ve merkezi sinir sisteminin çeşitli kısımlarında sinir hücresi ve sinaps kayıpları ile karakterize edilen en yaygın nörodejeneratif hastalıktır (Alzheimer, 1906). 2015 Dünya Alzheimer Raporunun verilerine göre, dünyada yaklaşık 46 milyon kişinin Alzheimer hastası olduğu bilinmektedir. Bu rakamın, 2030 yılında 74,7 milyon; 2050 yılında ise 131 milyon olacağı tahmin edilmektedir (Prince ve diğerleri, 2015).

AH'de otozomal dominant geçişten sorumlu olan şimdiye kadar 3 ayrı gen tanımlanmıştır: Amiloid prekürsör protein (APP), presenilin 1 (PSEN1) ve presenilin 2 (PSEN2) (Hooper, 2005). Bu genlerin, hücrede AChE'nin oranının artması ve birikmesi ile ilgili olduğu ve AH'nin erken başlangıçlı (65 yaş altı) formlarının gelişmesine katkı sağladığı belirtilmiştir (Zou, Liu, Che ve Huang, 2014). Erken başlangıçlı AH'ye sahip vakaların yaklaşık %70'inde APP, PSEN1 ve PSEN2 genlerinde mutasyonlar tespit edilmiştir (Fargo ve Bleiler, 2014).

Sporadik AH ile apolipoprotein alleli $\epsilon 4$ (APOE4), klusterin (CLU), fosfatidilinositol bağlayıcı klatrin birleştirme proteini (PICALM) ve kompleman komponenti (3b/4b) reseptör 1 (CR1) genleri arasında güçlü bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (Hooper, 2005). APOE4'ün AH'nin başlangıcını ve ilerlemesini nasıl etkilediği henüz kanıtlanmamış olsa da, APOE'de meydana gelen mutasyonların hücrede nörotransmitterlerin salınımı gibi kritik görevlerin aksamasına ve nörodejenerasyonun oluşmasına sebep olabileceği bildirilmiştir (Kim, Basak ve Holtzman, 2009). CLU'nun apoptozun giderilmesinde görevli olduğu bilinmektedir (Jones ve Jomary, 2002). CLU'da meydana gelen mutasyonların, nörodejeneratif ve inflamatuvar hastalıklar gibi oksidatif stres ile ilgili birçok rahatsızlıkla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Koltai, 2014; Sansanwal, Li ve Sarwal, 2015; Lin ve diğerleri, 2014).

PICALM mutasyonlarının, AH'nin en önemli belirteçlerinden olan hücrede amiloid beta (A β) proteinin birikmesine sebep olduğu ve geç başlangıçlı AH insidansında etkili olduğu kaydedilmiştir. Ayrıca, PICALM mutasyonlarının, AH'ye sebep olacak taupati, sinaptik işlev bozukluğu, düzensiz lipid metabolizması, bağışıklık bozukluğu gibi A β -bağımsız yollarda etkisinin olabileceği de gösterilmiştir (Xu, Tan ve Yu, 2015). CR1 gen polimorfizmlerinin, A β birikimi, taupati, immün disfonksiyon ve glial aracılı nöroinflamasyon dahil olmak üzere, AH patogenezi üzerinde olası etkilerinin varlığı bildirilmiştir (Zhu ve diğerleri, 2015).

Parkinson hastalığı ve Parkinson hastalığının genetik faktörleri

Parkinson hastalığı, AH'den sonra ikinci en yaygın nörodejeneratif hastalık olup, esasen 55 yaş üzerindeki insanları etkilemektedir. Patolojik olarak dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ve hayatta kalan nöronlarda eozinofilik intrasitoplazmik inklüzyonların (Lewy cisimcikleri) varlığı ile karakterizedir (Vonsattel ve diğerleri, 1985).

Primer parkinsonizm vakalarının büyük çoğunluğu sporadiktir, ancak olguların yaklaşık % 10'unda pozitif bir aile öyküsü görülmektedir (Thomas ve Beal 2007). Parkinson hastalığına bağlı genlerdeki (PARK) mutasyonların ailesel parkinsonizm patogeneziyle ilişkisi bulunmuştur (Mochizuki, 2007). 18 spesifik kromozomal bölgelerde bulunan ve buldukları kromozomal lokuslara göre adlandırılan PARK ailesi proteinleri, α -sinüklein, parkin, PTEN ile uyarılan kinaz 1 (PINK1), lösin açısından zengin tekrar kinaz 2 ve ubiquitin karboksi terminal hidrolaz L1 (UCHL1) kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucu oluşur. Bunlardan parkin ve UCHL1, hasarlı veya yanlış katlanmış proteinleri parçalayan ubiquitin-proteazom sistemine (UPS) bağlıdır (Farrer, 2006). Buna ek olarak, parkin ve PINK1 de dahil olmak üzere, bu genlerin birçoğu mitokondri ile bağlantılıdır ve mitokondriyal fonksiyonlarda ve oksidatif stres direncinde rol alabilir (Dodson ve Guo, 2007). Çeşitli kaynaklardan elde edilen veriler, Parkinson hastalığından sorumlu genlerde meydana gelen mutasyonların, toksin kaynaklı ölüme, oksidatif strese, mitokondriyal kompleks 1'deki kusurlara, protein agregasyonuna ve UPS'nin bozulmasına yol açtığını ortaya koymaktadır (Gandhi ve Wood, 2005).

ALS ve ALS'nin genetik faktörleri

ALS, motor nöronların dejenerasyonu ve ölümü ile karakterize edilen bir nörodejeneratif bozukluktur (Ince ve diğerleri, 2011). ALS'li kişilerin motor nöronlarında bunina cisimcikleri, lewy cisimciğine benzer cisimcikler, hyalin inklüzyonları ve ubikitin pozitif inklüzyonlar gibi farklı inklüzyonların varlığı belirlenmiştir (Bergmann, 1993; Williams ve Windebank, 1991; Brooks, Miller, Swas ve Munsat, 2000; Murayama, Mori, Bouldin, Suzuki ve Tomonaga, 1990).

ALS, otozomal dominant, otozomal resesif veya X'e bağlı bir şekilde kalıtılabilir. ALS'li kişilerin % 90'ının net genetik bağlantısı olmayan sporadik vakalar olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, vakaların geriye kalan % 10'u ailesel kalıtım göstermektedir (Maruyama ve diğerleri, 2010). ALS'de, süperoksit dismutaz 1 (SOD1)'e ek olarak, sarkoma füzyon, ubikilin 2 (UBQLN2), kromozom 9'un 72 nolu açık okuma bölgesi ve transaktif yanıt DNA-bağlayıcı protein kodlayan genlerdeki mutasyonlar, tipik klinik fenotip ile yakından ilişkilidir. Bu mutasyonların, oksidatif stres, glutamat eksitotoksisite, apoptoz, anormal nörofilament fonksiyonu, protein yanlış katlanması, RNA işleme bozulma, artmış inflamasyon ve mitokondriyal disfonksiyon gibi motor nöron dejenerasyonuna yol açan çeşitli yollardan sorumlu olduğu kaydedilmiştir (Chen, Sayana, Zhang ve Le, 2013).

Huntington hastalığı ve huntington hastalığının genetik faktörleri

Huntington hastalığı, kronik ve ilerleyici istemsiz hareketler, kognitif bozukluklar, duygudurum bozuklukları ve davranışsal değişimler ile karakterize olan nörodejeneratif bir hastalıktır. Huntington hastalığına, bireyin huntingtin adı verilen bir geninin iki kopyasındaki otozomal dominant mutasyonun neden olduğu bilinmektedir (Dunn, 2016). Trinükleotid tekrar bozukluğu sonucu, huntingtin geninde oluşan sitozin-adenin-guanin tekrarlarının sayısındaki artışın, hastalığa sebep olduğu bilinmektedir (Myers, 2004).

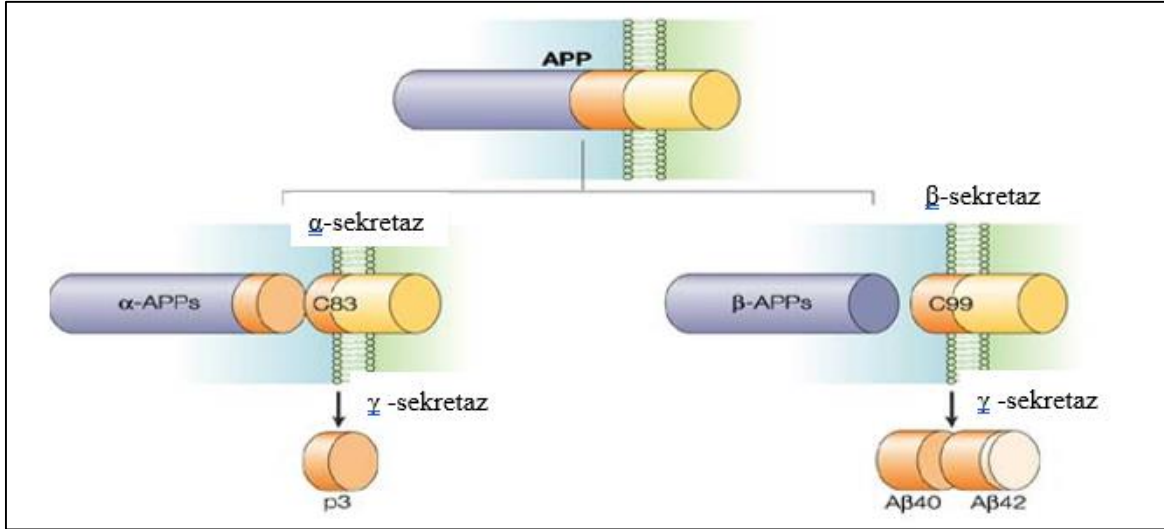
2.2.2. Proteinlerin yanlış katlanması ve agregasyonunun nörodejeneratif hastalıklardaki rolü

Proteinler, metabolizma reaksiyonlarını katalize etmek, DNA replikasyonu sağlamak, uyarılara cevap vermek ve moleküllerin bir yerden başka bir yere taşınmasını sağlamak gibi çok çeşitli görevleri üstlenen ve hücrenin yapıtaşısı olan makro moleküllerdir (Dobson,

2003). Hücresel proteinler, biyokimyasal ve fonksiyonel aktivitelerini sağlamak için üç boyutlu konformasyonlar oluşturur. Proteinlerin kısmi veya yanlış katlaması, fonksiyonel olarak inaktif hale gelmelerine sebep olur. Tamamlanmamış translaşyonel polipeptit ürünleri, yanlış katlanmış ara ürünler ve oligomerik protein komplekslerinin bağlanmamış alt birimleri, bir agregasyon veya yığın oluşturma eğilimi olan hidrofobik bölgeleri açığa çıkarır (Hartl ve Hayer-Hartl, 2009). Hücresel ortamın hidrofilik doğasına bağlı olarak, farklı katlanmış proteinlerden gelen hidrofobik yüzeyler birbiriyle etkileşime girmeye ve hücresele agregatları oluşturmaya eğilimlidir (Balch, Morimoto, Dillin ve Kelly, 2008). Nörodejeneratif hastalıklara sahip kişilerde, protein yanlış katlanmaları sonucu oluşan kümelenmiş proteinlerin varlığı gözlemlenmiştir. Proteinlerin yanlış katlanması ve birikmesi, AH, Huntington hastalığı, Parkinson hastalığı ve ALS gibi çok sayıda nörodejeneratif hastalık için yaygın moleküler olaylar olarak kabul edilmektedir (Chiti ve diğerleri, 2000; Dobson, 2006). Bu proteinlerin en önemlileri A β ve tau proteinleridir.

Amiloid beta (A β) proteininin nörodejeneratif hastalıklardaki rolü

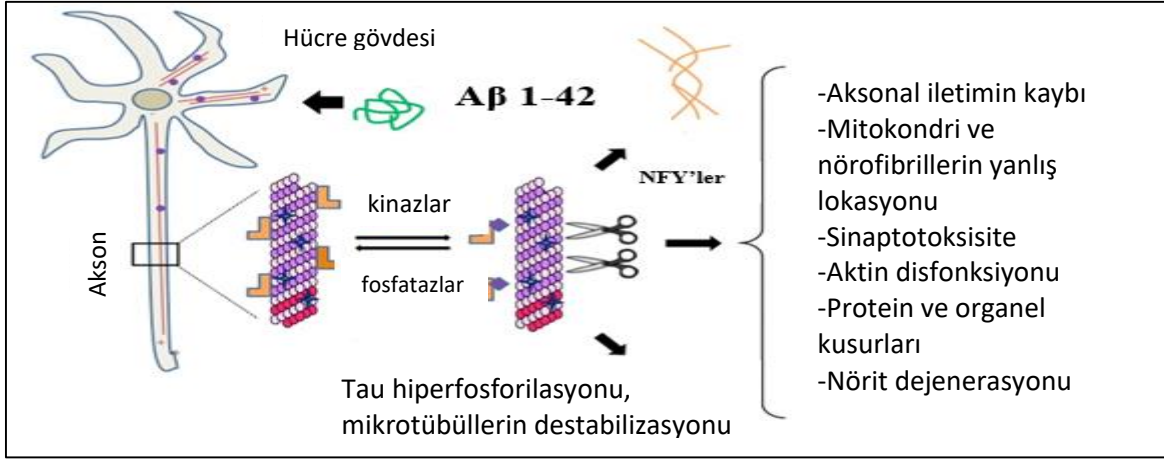
Amiloid beta (A β), 21. kromozomda kodlanan ve bir transmembran proteini olan APP'nin, metabolizasyonu sonucu oluşan bir proteindir. APP'nin metabolizasyonunda iki yol bulunmaktadır: Bunlardan ilki, alfa (α) sekretaz ve gama (γ) sekretaz enzimlerinin rol oynadığı ve APP'nin parçalanması sonucu oluşan ürünlerin toksik olmadığı non-amiloidojenik yoldur. APP'nin α -sekretaz ile parçalanmasının ardından α -APP fragmanı ve karboksi (C)-terminal C83 peptidi oluşur. C83 peptidinin γ -sekretaz ile metabolizasyonu ile (A β)17-40-42 olarak da bilinen toksik olmayan p3 peptidi oluşur. İkinci yol ise, beta (β) sekretaz ve γ sekretaz enzimleri aracılığıyla A β 40 (A β 1-40) ve A β 42 (A β 1-42)'nin oluştuğu amiloidojenik yoldur. Bu yolda APP'nin β -sekretaz ile parçalanmasının ardından β -APP fragmanı ve karboksi (C)-terminal C99 peptidi oluşur. C99 peptidinin γ -sekretaz ile metabolizasyonu ile toksik A β 40 ve A β 42 oluşur (Hooper, 2005) (Şekil 2.2). Sınır hücrelerinde APP molekülünün yanlış kesim işlemleri sonrasında oluşan toksik A β proteinin amiloid plak adı verilen noktalar şeklinde biriktiği tespit edilmiştir. Biriken A β 'nin nörotoksik etki gösterdiği, mitokondri ve sinaps hasarına ve mikrotübüllerin stabilizasyonunu sağlayan tau proteinin hiperfosforilasyonuna yol açarak nörodejenerasyona sebep olduğu bildirilmiştir (Mohandas, Rajmohan ve Raghunath 2009).



Şekil 2.2. APP'nin metabolizasyonu (İnt-5)

Tau proteininin nörodejeneratif hastalıklardaki rolü

Tau, 17. kromozom tarafından kodlanan, hücre iskeleti oluşumunda rol oynayan, mikrotübül ilişkili proteinler (MAP) ailesinden bir proteindir. Bunlar, hücrenin şeklinin korunması ve hücre içi taşımanın sağlanması gibi kritik görevleri olan mikrotübüllerin alt birimlerinin bir arada tutulması ve yapısının korunmasında görevlidirler (Karol, Ayvalı ve Suludere, 2000:187). Hücre bölünmesi, hücre hareketi, organellerin hücre içi taşınması, aksonal gelişim süreçlerinde tau proteini fosforlanmakta ve mikrotübüllerden ayrılmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklarda (AH, Niemann-Pick hastalığı, fronto-temporal demans, progresif supranükleer paralizi, Parkinson hastalığı), tau proteininin hiperaktif kinazlar ve / veya hipoaktif fosfatazlar aracılığıyla hiperfosforilizasyona uğradığı ve mikrotübüllere bağlanma yeteneğinin bozulduğu tespit edilmiştir (Meydani, 2001). Mikrotübüllere bağlanamamış hiperfosforile tau monomerlerinin nörofibriler yumaklar (NFY'ler) şeklinde kondanse olduğu ve NFY'lerin hücre içine sığmayacak derecede biriktiğinde, hücre iskeletinin bütünlüğünü ve aksonal transportu bozarak hücreyi parçalamak suretiyle hücre ölümüne sebep olduğu bildirilmiştir (Meydani, 2001) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Tau proteininin hiperfosforilasyonu ve NFY'lerin oluşumu (İnt-6)

2.2.3. Oksidatif stresin nörodejeneratif hastalıklardaki rolü

Oksidatif stres

Oksidatif stres, canlı organizmalarda normalde oluşan; fakat, belirli bir dozun üzerinde olduğunda hücre fonksiyonlarını ve sağkalımını tehlikeye sokan serbest radikal moleküllerinin hücre içi artışı ile ortaya çıkan bir durumdur. Serbest radikaller, protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyallere bağlanabilen, proteinlerin sistein sülfhidril gruplarını, amino asit kalıntılarını, nükleer ve mitokondriyal DNA'yı okside ederek yapı ve fonksiyonlarına zarar verebilen bileşiklerdir (Cooke ve diğerleri 2003). Serbest radikaller ve sebep oldukları zararlı etkiler, antioksidan sistemler tarafından ortadan kaldırılır. Bu işleyişin bozulduğu durumlarda ise, hücrede oksidatif stres ortaya çıkar (Koca ve Karadeniz, 2003).

Oksidatif stresin nörodejeneratif hastalıklardaki rolü

Nöronal hücreler, ekstrasellüler alandaki moleküler bilgiye cevap olarak dallanmalar oluşturabilen ve patolojik durumlara göre nörit rejenerasyonunu uyarabilen hücrelerdir. Bu durum, merkezi sinir sistemi ağının oluşması için gereklidir (Díez-Revuelta ve diğerleri, 2010). Bu sinir ağının, pek çok nörodejeneratif hastalıkta, oksidatif stres tarafından kesintiye uğradığı bildirilmiştir (Gillespie, Mullan ve Harrison, 2014). Kültüre edilmiş nöronlarda oluşan nörit kısalması, nörorejeneratif potansiyelin bir göstergesi olarak kabul edilir (Mitchell, Hanson, Quets-Nguyen, Bergeron ve Smith, 2007). Yapılan çalışmalar, hücrede

oksidatif stres sonucu oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışının, ortalama nörit uzunluğu, toplam nörit sayısı ve hücre başına düşen toplam dallanma sayılarında azalmaya sebep olduğu göstermiştir (Tusi, Abraki, Amini ve Khodaghali, 2012). Ayrıca, hücrede serbest radikal artışına bağlı olarak, lipit peroksidasyonu, nükleer ve mitokondriyal DNA'da tek ve çift zincir kırıkları ve mutasyonlar oluşabilir (Cooke ve diğerleri 2003; Evans ve Cooke, 2004; Gürer, 2005). Oluşan mutasyonlar sonucunda, hücrenin enerji döngüsünde ve genel fonksiyonunda bozulmalarla başlayan, multi sistemik hastalıklar baş gösterir (Koopman, Willems ve Smeitink, 2012; Oldfors ve Tulinus, 2007). Serbest radikaller aracılığıyla meydana gelen lipit peroksidasyonunun, hücre içinde kalsiyum iyonları (Ca^{+2})'nin aşırı yükselmesine, solunum zincirinin geriye dönüşümsüz olarak bloke olmasına ve sonuçta hücrenin kendini yok etmesine sebep olduğu kanıtlanmıştır (Gürer, 2005; Lipton ve Rosenberg, 1994; Berridge ve diğerleri, 1998; Nicholls ve Budd, 1998).

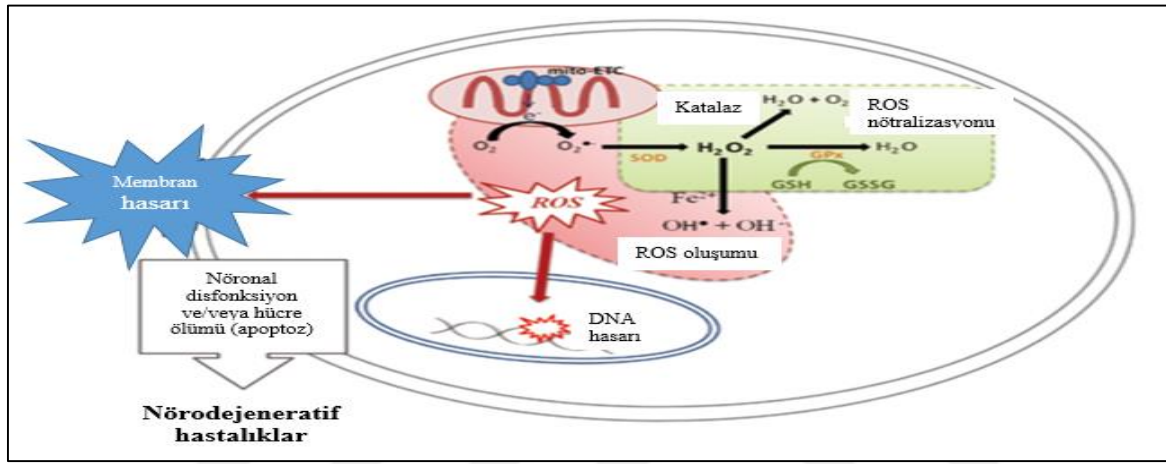
AH, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı ve ALS gibi nörodejeneratif hastalıklarda, santral sinir sistemindeki makromoleküllerde, artmış oksidatif hasar ile ilgili bulgular vardır (Tao, Shuangrong ve Lina, 2015; Kim ve Choi, 2010; Said, Hung, Zu, Hockberger ve Siddique, 2000; Valencia ve diğerleri, 2012). Enzimatik oksidaz aktivitenin doğal bir yan ürünü olan ROS'ların, kortikal nöron ve sinir hücrelerinde, AH belirtilerinden olan asetilkolinesteraz (AChE) enziminin artışına sebep olarak kolinerjik iletimi hasara uğrattığı; ayrıca, nöronlarda oksidatif stresi ve apoptozu arttırdığı gösterilmiştir (Kapur, Agid, Mizrahi ve Li, 2006; Garcimartin, López-Oliva, González, Sánchez-Muniz ve Benedí, 2017).

2.2.4. Mitokondriyal disfonksiyonun nörodejeneratif hastalıklardaki rolü

Mitokondriyal membran depolarizasyonu ve fonksiyon kaybı çoğu nörodejeneratif bozukluğun ortak bir özelliği olarak tanımlanmıştır. Hücrede amiloid oligomerlerin, yanlış katlanmış proteinlerin birikimesinin ve oksidatif stresin hem hücre hem de mitokondriyal membranların geçirgenliğini arttırdığı bilinmektedir (Mandemakers, Morais ve De Strooper, 2007; Jellinger, 2009).

Oksidatif fosforilasyon sırasında, adenosin trifosfat (ATP) oluşturmak için elektron taşıma zinciri kullanılır. Elektronlar, süperoksit anyon radikalleri üretmek için zaman zaman oksijen ile tutulur. Mitokondri içerisindeki süperoksit radikaller, manganez süperoksit dismutaz (SOD)'ın etkisi ile H_2O_2 'ye dönüştürülür. Mitokondrideki H_2O_2 , indirgenmiş

glutasyonun (GSH) oksitlenmiş glutatyona (GSSH) dönüşmesi ile oluşan glutasyon peroksidazın (GPx) etkisiyle suya ayırır. Bu yolakta oluşan bir düzensizlik, hücre içi ROS miktarında artışına sebep olur (Mandavilli, Boldogh ve Van Houten, 2005; Othman ve Yabe, 2015). Hücre içi ROS artışı, elektron transfer zincirindeki proteinlerin inhibisyonuna, mitokondriyal membran potansiyelinde azalmaya, ATP kaybına ve hücre ölümü ile sonuçlanan bir dizi reaksiyona sebep olabilir (Mandavilli ve diğerleri, 2005; Santos, Hunakova, Chen, Bortner ve Van Houten, 2002) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Mitokondride ROS oluşumu, nötralizasyonu ve ROS artışının nörodejeneratif hastalıklardaki rolleri (Othman ve Yabe, 2015)

Mitokondriyal disfonksiyonun nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkisi

Mitokondriyal dinamiklerdeki değişiklikler, ROS artışı, mitokondriyal DNA hasarı ve enerji üretiminin kaybı, AH, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı da dahil olmak üzere birçok nörodejeneratif hastalık ile ilişkili patofizyolojide görülmektedir (Van Houten, Woshner ve Santos, 2006).

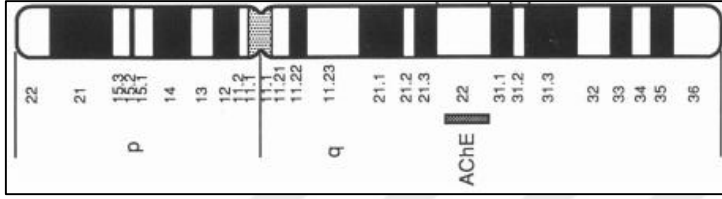
2.2.5. Kolinerjik iletim kaybı ve asetilkolinesterazın (AChE) nörodejeneratif hastalıklardaki rolü

Kolinasetiltransferaz (ChAT), asetilkolin (ACh), kolinesterazlar (Asetilkolinesteraz (AChE) ve butiril kolinesteraz (BChE)), kolinerjik reseptörlerden (muskarinik reseptörler ve nikotinik reseptörler) oluşan kolinerjik sistem, bilişsel performansın ve öğrenme-bellek süreçlerinin modülasyonu gibi pek çok farklı işlevi kontrol etmede önemli bir role sahiptir.

En yaygın nörodejeneratif hastalık olan AH'nin kesin tanısında en önemli belirteçlerden biri, kolinerjik fonksiyonların kaybıdır (Koçancı ve Aslim, 2016).

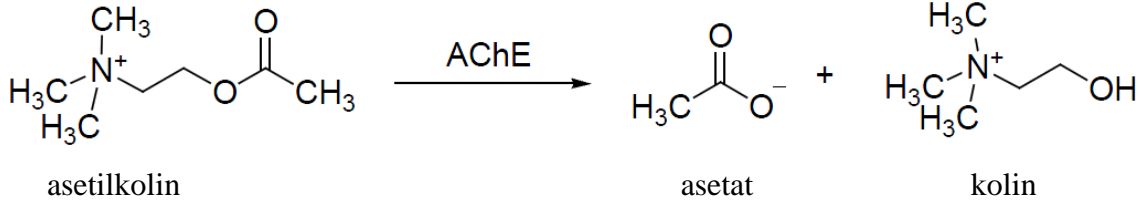
ACHe'nin yapısı ve fonksiyonları

ACHe, kolinerjik sinir iletiminde rol oynayan en etkili enzimlerden biridir (Koçancı ve Aslim, 2016). AChE'nin yapısı, ilk olarak *Torpedo californica*'da belirlenmiştir. AChE, 14 alfa sarmal ile çevrili 12 beta levhadan oluşmaktadır (Taylor, 1991). AChE geni, insanda 7. kromozomun uzun kolunun 22. bölgesinde (7q22) bulunur ve 100,889,993-100,896,685 bazları arasında yaklaşık 6 kilobaz (kb)'lık alanı kaplar (Sussman ve diğerleri, 1991) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. AChE'nin 7. kromozom üzerindeki yeri (Getman, Eubanks, Camp, Evans ve Taylor, 1992)

ACHe'nin hücre adezyonunu, nörit gelişimini, sinir ağı oluşumunu, tümör baskılamasını, sperm-yumurta etkileşimini ve hücre göçünü sağlamak gibi birçok fonksiyonu vardır. Fakat, birincil rolü, mitokondrilerde hücre solunumunun bir ürünü olan asetil koenzim A'dan (Asetil Ko A) ve lipid metabolizmasında önemli bir rol oynayan kolinden türetilen bir nörotransmitter olan ACh'nin, sinaptik boşlukta serbest bırakılmasıyla oluşan sinirsel impulsunun hızla sonlandırmasıdır. Pre ve post sinaptik nöronlar arasında bir sinyal iletimi oluşacağı zaman, ACh molekülleri sinaptik boşluğa salınır. Sinaptik boşluktaki ACh molekülleri, pre ve post sinaptik membranlarda bulunan ACh reseptörlerine bağlanır. Sinyal iletiminin gerçekleşmesinin ardından, ACh molekülleri reseptörden ayrılır. Reseptörlerden ayrılan ya da reseptörlere hiç bağlanamayan ACh molekülleri, AChE enzimi tarafından kolin ve asetata hidroliz edilir (Schumacher ve diğerleri, 1986) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. ACh'nin AChE tarafından hidrolizi (Schumacher ve diğerleri, 1986)

AChE'nin nörodejeneratif hastalıklardaki rolü

AH'nin başlangıç aşamasında gerçekleşen nöron kayıplarının, AChE enzim aktivitesinin artmasının ve buna bağlı olarak ACh miktarı ve aktivasyonunun azalması sonucu oluştuğu bildirilmiştir (Francis ve diğerleri, 1999; Şahin, 2002; Thacker, 2003). Hücrede AChE artışının, kolinerjik iletimin sağlanmasında rol oynayan ACh'nin, henüz sinyal iletimini gerçekleştirilmeden hidrolize edildilmesine sebep olduğu düşünülmektedir. Kolinerjik iletimdeki hasarların, birçok nörodejeneratif hastalık ile ilişkili olduğu bilinmektedir. AH'li hastaların postmortem beyin dokusu incelemelerinde, korteks ve hipokampüste AChE etkinliğinin arttığı tespit edilmiştir (Pillay, Maharaj, Daniel ve Daya, 2003). AH'li kişilerin AChE ifade eden kolinerjik nöronlarında, diğer nöronlara göre daha yüksek nöralapotoz olduğu da kaydedilmiştir (Zhang ve Greenberg, 2012; Colurso, Nilson ve Vervoort, 2003).

2.2.6. İnflamasyonun nörodejeneratif hastalıklardaki rolü

İnflamasyon

İnflamasyon, canlı dokunun her türlü canlı ve cansız yabancı etkene veya içsel/dışsal doku hasarına verdiği bir seri yanıttır. Mikroglial hücrelerden ve astrositlerden salınan sitokinler, inflamatuvar tepkinin seviyesini (yoğunluğunu ve süresini) düzenlenmede rol oynamaktadır (Tuppo ve Arias, 2005). Mikroglialar, merkezi sinir sistemi içinde yerleşik makrofajlardır ve normal koşullar altında beyin immün gözetim ve konakçı savunma işlevlerini yerine getirirler (Rock ve diğerleri, 2004). Mikroglialar, yaralanma, enfeksiyon veya inflamasyon gibi durumlarda aktive olurlar. Aktive olmuş mikroglialar, NO, prostaglandin E2 (PGE2) gibi çeşitli pro-inflamatuvar araçları, ROS'ları, bazı sitokinleri ve nörotoksik bileşikleri üretebilir (Takeuchi ve diğerleri, 2006; Stone, Reynolds, Mosley ve Gendelman, 2009).

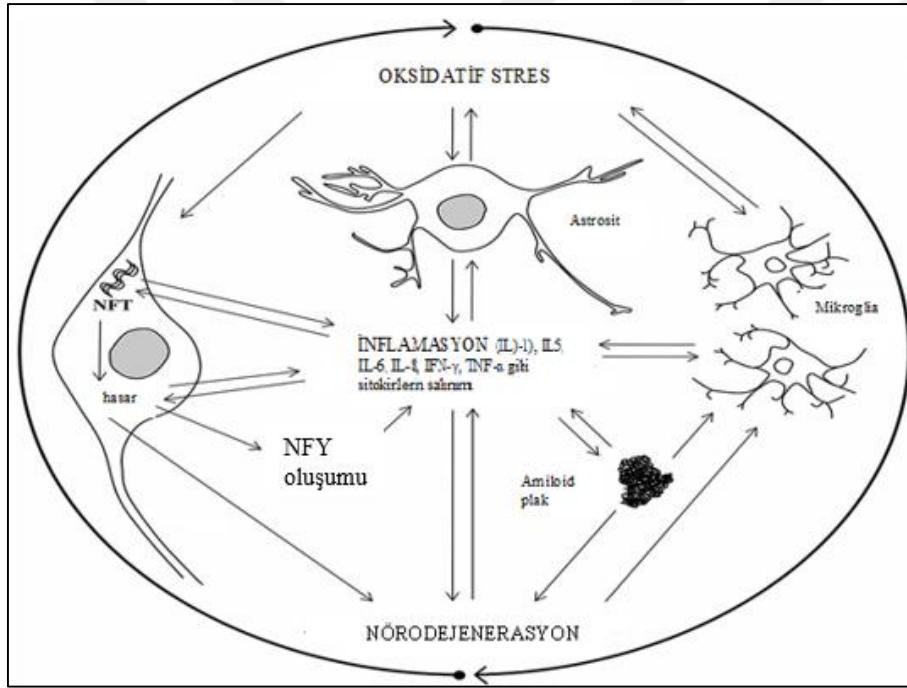
Sitokinler

Sitokinler, hücreler arasındaki etkileşim ve iletişim üzerinde spesifik etkilere sahip proteinlerdir (Rogers ve diğerleri, 1996). İki ana gruba ayrılırlar: Diğer sitokinlerin sentezlenmesini ve fonksiyonun artmasını sağlayan sitokine pro-inflamatuar sitokinler (interlökin ((IL)-1), IL5, IL-6, IL-8, interferon (IFN)- γ , tümör nekroz faktörü (TNF)), azalmasını sağlayanlara ise anti-inflamatuar sitokinler (IL-1R, IL-4, IL-10, IL-13, transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β)) denilmektedir (Leonard ve Myint, 2006). Anti-inflamatuar sitokinler, pro-inflamatuar sitokinleri inhibe edici özelliktedirler. Pro-inflamatuar sitokin seviyelerinin aşırı yüksek olması ya da anti-inflamatuar sitokin seviyelerinin düşük olması, sitotoksositeye yol açabilir. Bu durum, nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde kritik rol oynar.

İnflamasyonun nörodejeneratif hastalıklardaki rolü

Nörodejeneratif hastalıklarda görülen inflamasyonun, oksidatif stres ve nörodejenerasyon ile bağlantılı olduğu keşfedilmiştir. Travma, enfeksiyon ve toksik metabolitlerin artışı gibi çok çeşitli etmenler ile oluşan hücre içi oksidatif stres artışının, mikroglia ve astrosit hücrelerinin aktivasyonunu sağlayarak, nörodejenerasyona sebep olduğu bildirilmiştir (Heneka, 2006). Aktif mikrogliaların, AH (Prokop, Miller ve Heppner, 2013), Parkinson hastalığı (Long-Smith, Sullivan ve Nolan, 2009), ALS (Sargsyan, Monk ve Shaw, 2005), multipl skleroz (Napoli ve Neumann, 2010; Brown, 2001), çarpma (Yenari, Kauppinen ve Swanson, 2010), travmatik (Loane ve Byrnes, 2010) ve radyasyona bağlı beyin hasarı (Chiang, McBride ve Withers, 1993) gibi nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere hemen hemen her türlü nörolojik hastalıkta görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca, makrofajların, bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) gibi mikrobiyal tetikleyicilere karşı yanıt geliştirirerek aktifleştiği de bilinmektedir (Gordon, 2003; Dalton ve diğerleri, 1993; Ehrt ve diğerleri, 2001). Gram negatif bakterilerin dış membranının başlıca bileşeni olan LPS, inflamasyonu uyarıcı bir ajandır (Lee, Nagai ve Kim, 2002). LPS, beyindeki sirküventriküler organların, leptomeninglerin ve koroid pleksusun endotel hücrelerinde bulunan bağışıklık sisteminde rol oynayan Toll benzeri reseptörler ailesinden TLR4 reseptörüne ve monositlerin, mast hücrelerinin ve nötrofillerin yüzey membranına bağlanabilme özelliğine sahiptir. LPS'nin bağlanması ile oluşan TLR4 aktivasyonu, sitokin hedef genlerinin transkripsiyona neden olur (Ericsson, Liu, Hart ve Sawchenko, 1995; Herkenham, Lee ve Baker, 1998). Bu durum,

öncelikle sistemik dolaşım ile kolayca ulaşılan bölgelerde ve daha sonra beyin dokusunda bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B translokasyonuna ve pro-inflamatuar sitokin üretimine yol açar. LPS, monositleri ve makrofajları TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, ve IL-12 gibi pro-inflamatuar sitokinleri üretmek üzere aktive eder. LPS'nin mikroglia indüksiyonu gerçekleştirebileceği ve alt pro-inflamatuar araçların transkripsiyonel indüklenmesine, sitokinlerin, kemokinlerin ve nitrik oksidin salınmasına sebep olabileceği bildirilmiştir (Ethuin ve diğerleri, 2001). Aktif mikroglialar, hücrede NFY'lerin ve amiloid plakların birikmesine, ayrıca, IL-1, IL-5, IL-6, IL-8, IFN γ , TNF gibi pro-inflamatuar sitokin salınımının artmasına sebep olarak nörodejenerasyona yol açar (Şekil 2.7) (Gamba ve diğerleri, 2015).



Şekil 2.7. İnflamasyonun oksidatif stres ve nörodejenerasyon ile bağlantısı (Gamba ve diğerleri, 2015)

TNF- α , mikroglialardan salınan ve nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkili inflammatuar tepkinin düzenlenmesinde görev alan önemli bir pro-inflamatuar sitokindir. Pekçok inflammatuar sitokinler üzerindeki etkisi nedeniyle çok önemli bir düzenleyicidir. TNF- α 'nın aşırı ifade edilmesinin, doğrudan nöronal hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (McNaull, Todd, McGuinness ve Passmore, 2010; Álvarez, Cacabelos, Sanpedro, García-Fantini ve Aleixandre, 2007).

Pro-inflamatuar etkiye sahip bir sitokin olan IL-6'nın, özellikle senil plak formasyonunun erken basamaklarında görev aldığı bilinmektedir (Mehlhorn, Hollborn ve Schliebs, 2000). AH'de görülen tau protein hiperfosforilasyonunda görev alan en önemli enzimlerden birisi cdk5/p35 kompleksidir. Bu enzim aktivitesinin, IL-6 artışından belirgin şekilde etkilendiği gösterilmiştir (Quintanilla, Orellana, González-Billault ve Maccioni, 2004). Nöroinflamasyonun, tau proteininin hiperfosforilasyonu yoluyla NFY'lerin oluşmasını sağlayarak AH süreçlerinde etkili olabileceği kaydedilmiştir (Saez, Pehar, Vargas, Barbeito ve Maccioni, 2004). Bu konuda yapılan çalışmaların sonuçları, sitokinlerin, tau proteininin modifikasyonunda görev aldıklarını ve AH'de etkili olduklarını ortaya koymaktadır (Zilka ve diğerleri, 2012). Aşırı miktarlarda üretilen IL-6, nöropatolojik durumla ilişkili bulunmuştur. Bunların arasında, gliozis ve kolinerjik iletinin bozulması yer almaktadır. Yüksek seviyelerde IL-6, merkezi sinir sistemi enfeksiyonu, travmatik beyin hasarı, AH ve Parkinson hastalığı da dahil olmak üzere çeşitli nörolojik bozukluklar ile ilişkilidir (Kossmann, Hans, Imhof, Trentz ve Morganti-Kossmann, 1996; Gruol ve Nelson, 1997). Parkinson hastalarının postmortem beyin dokularında ve serebrospinal sıvılarında; ayrıca, Parkinson hastalığı hayvan modellerinden alınan beyin dokularında TNF, IL-1 ve IL-6 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin arttığı gösterilmiştir (Barcia ve diğerleri, 2005; Boka ve diğerleri, 1994; Ferrari ve diğerleri, 2006; Mogi ve diğerleri, 2000; Nagatsu ve Sawada 2005; Sriram ve diğerleri, 2002; Sriram ve diğerleri, 2006; Brodacki ve diğerleri, 2008). AH'li kişilerin beyin, kan ve beyin omurilik sıvılarında sitokin seviyelerinin değiştiğini gösteren çalışmalar vardır. AH'li beyin dokularında IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , seviyelerinde artış olduğu kanıtlanmıştır (Walker, McGeer ve McGeer, 1997; McGeer ve McGeer, 2002). Huntington hastalarında, periferde ve merkezi sinir sisteminde immün aktivite gösterilmiş, sağlıklı kişilere göre IL-6, IL-8, IL-4, IL-5 ve TNF- α plazma seviyelerinin yükseldiği belirlenmiştir. Ayrıca, huntington hastalarında, mikrogial aktivasyon ve astrogliosis gibi hücrel değişikliklerin varlığı da kanıtlanmıştır (Björkqvist ve diğerleri, 2008; Hsiao ve Cherm, 2010). ALS'li kişilerin kanlarında ve beyin omurilik sıvılarında, immün sistem anormallikleri görülmüştür. İnflamasyon ve bağışıklık anormallikleri, ALS modeline sahip hayvanlarda da tespit edilmiştir. ALS'de glia aktivasyonunun karakterize edildiği ve ROS gibi potansiyel olarak sitotoksik moleküllerin, IL-1 β , TNF- α ve IL-6 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin aşırı üretimine sebep olduğu da bildirilmiştir (McGeer ve McGeer, 2002). Sinir sistemi hasarına sebep olan inflamasyon ve oksidatif strese karşı geliştirilecek bağışıklık tepkisinin, nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu olabileceği ortaya çıkmıştır (McCombe ve Henderson, 2011).

2.3. Nöral Ölüm Yolakları ve Nörodejeneratif Hastalıklardaki Rolü

1972'de hücre ölümünü, apoptoz (genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümü) ve nekroz (tesadüfi ve programlanmamış hücre ölümü) olmak üzere iki başlık altında toplanmıştır (Kerr, Wyllie ve Currie, 1972). 90'da ise hücre ölümü, tip I (apoptoz), tip II (otofaji) ve tip III (lizozomal olmayan hücre ölümü) olmak üzere üçe ayrılmıştır (Clarke, 1990). Tip I hücre ölümü, sitoplazmik yoğunlaşma, nükleer piknoz, kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması, zar kabarcıklanması, hücre iskeleti çöküşü ve membrana bağlı apoptotik cisimciklerin oluşumu ile karakterizedir (Yuan ve Yankner, 2000). Tip II hücre ölümü (otofajik ölüm), lizozomal orijinli sitoplazmik otofajik vakuollerin ortaya çıkması, mitokondrial dilatasyon, endoplazmik retikulum ve golgi organellerinin genişlemesi ile ilişkilendirilmiştir. Tip III hücre ölümü, hücre içi organellerin şişmesi ile başlar, onu sitoplazmada boşlukların oluşması izler ve lizozomal tutulum eksikliği nedeniyle Tip II hücre ölümünden ayırt edilir (Galluzzi ve diğerleri, 2007). 2005 yılında, Hücre Ölümü Adlandırma Komitesi hücre ölümünü morfolojik, enzimolojik, immunojenik özellikler ve fonksiyonel fazlar açısından değerlendirilerek, alt tiplere ayrılmıştır (Kroemer ve diğerleri, 2005). Buna göre, hücre ölümleri morfolojilerine göre: apoptotik, nekrotik, otofajik, mitozla ilişkili; enzimolojik özelliklerine göre: nükleaz ya da kaspazlar, katepsinler ve transglutaminazlar gibi farklı proteaz sınıflarını içeren, nükleaz ya da kaspazlar, katepsinler ve transglutaminazlar gibi farklı proteaz sınıflarını içermeyen; fonksiyonel özelliklerine göre: programlı, rastgele, fizyolojik, patolojik; immünolojik özelliklerine göre: immunogenik, immunogenik olmayan şeklinde sınıflandırılmıştır (Kroemer ve diğerleri, 2005).

Nörolojik hastalıklarda meydana gelen nöronal disfonksiyon, nöronal hücre ölümü sonucu oluşmaktadır. Nöronal ölüm mekanizmaları arasında, intrinsik ve ekstrinsik apoptoz, nekroptoz, partanatoz, ferroptoz, mitokondriyal zar geçirgenliğinin değişimi, otoliz, piroptoz, otofajik hücre ölümü, paraptoz ve fagoptozun olduğu belirtilmiştir (Fricker, Tolkovsky, Borutaite, Coleman ve Brown, 2018).

2.3.1. Apoptoz

Nöronal hücre ölümünün en iyi anlaşılan mekanizması, kaspaz ailesi, B hücre lösemi/lenfoma-2 (Bcl-2) ailesi ve apoptotik proteaz aktive edici faktör-1'den oluşan

evrimsel olarak korunmuş hücre yolu ile düzenlenen apoptozdur. Apoptoz, gelişim sürecinde santral ve periferik sinir sistemindeki nöronların ve glial hücrelerin erişkinlikte olmaları gereken sayısını kontrol eden ve fizyolojik yaşlanma sırasında nöron kaybından sorumlu olan temel mekanizma olarak tanımlanmıştır. Apoptozun, gelişmekte olan sinir sisteminde nöronal hücre sayısını ve nörit yoğunluğunu düzenleyen kritik bir mekanizma oluşu, beyin gelişimini düzenleyen önemli bir unsur olduğuna işaret etmektedir. Apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yollar ile oluştuğu bilinmektedir (Fricker ve diğerleri, 2018).

İntrinsik (içsel) apoptoz

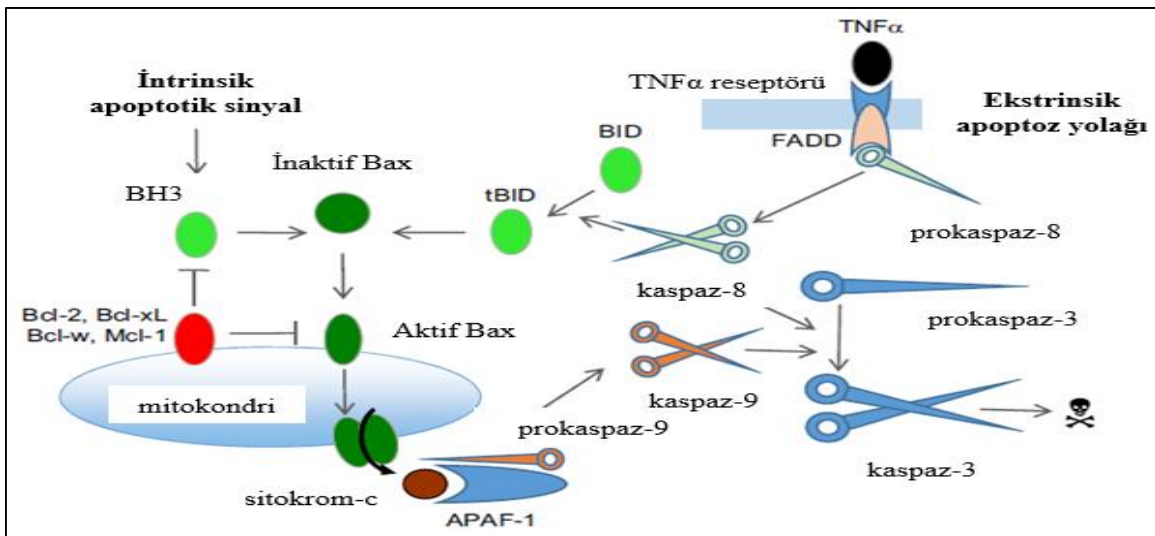
İntrinsik apoptoz, çeşitli mikroçevresel değişikliklerin başlattığı ve hücrede büyüme faktörü eksikliğine, DNA hasarına, endoplazmik retikulum stresine, ROS'ların aşırı yüklenmesine, mikrotübül destabilizasyonuna veya mitotik defektlere sebep olan düzenlenmiş bir hücre ölüm tipidir (Czabotar, Lessene, Strasser ve Adams, 2014; Pihán, Carreras-Sureda ve Hetz, 2017; Roos, Thomas ve Kaina, 2016; Vitale, Manic, De Maria, Kroemer ve Galluzzi, 2017). İçsel yolağın aktivasyonu, mitokondriyal dış zar permeabilizasyonunun (MOMP) geri dönüşümsüz olarak hasarlanmasına ve dolayısıyla, ATP üretiminin aksamasına yol açar (Galluzzi, Kepp ve Kroemer, 2016). Bcl-2 ailesi proteinleri, pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerden oluşan ve intrinsik apoptozun düzenlenmesinde önemli bir role sahip protein grubudur. Diğer proteinlerin sentezlenmesini ve fonksiyonlarının artmasını sağlayan üyelere pro-apoptotik (Bax, Bcl-X_s, Bak, Bad, Bid), protein fonksiyonlarının azalmasını sağlayanlara ise anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1) denilmektedir. Anti-apoptotik üyeler pro-apoptotik proteinlerin oluşmasını engelleyerek apoptozu önleme özelliğine sahiptir. Hücrel oksidatif stresin arttığı durumlarda, Bcl-2 homologu olan BH3 proteinleri aktive olur. Bu durum, Bax ve / veya Bak gibi pro-apoptotik üyelerin heterodimerizasyonu yoluyla kaspaz serbestleşmesini uyarır (Willis ve diğerleri, 2007). Bax ve / veya Bak aktifleştğinde, mitokondri zarının geçiş porlarının açıklığını değiştirebilme potansiyeline sahip sitokrom-c, hücreden serbestleşir. Serbestleşen sitokrom-c, Kaspaz 9 ve Kaspaz 3'ün aktivasyonuna sebep olur. Bu olayların sonucunda zar, hücre iskeleti ve çekirdek homeostazında değişime yol açan hasarlar ortaya çıkar (Friedlander, 2003; Favaloro, Allocati, Graziano, Di Ilio ve De Laurenzi, 2012). Anti-apoptotik üyeler olan Bcl-2 ve Bcl-X_L, Bcl-w ve Mcl-1 kaspazların öncü formlarının oluşumunu ya da kaspaz akışını direkt olarak aktive eden sitoplazmadaki apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve sitokrom-c gibi

apoptogenik faktörlerin mitokondriden serbestleşmesini engelleyerek apoptozu baskılayabilir (Fricker ve diğerleri, 2018) (Şekil 2.8).

Ekstrinsik (dışsal) apoptoz

Ekstrinsik apoptoz, hücre dışı mikroçevre değişiminin başlattığı, düzenlenmiş hücre ölümüdür (Flusberg ve Sorger, 2015; Gibert ve Mehlen, 2015). Ölüm reseptörleri olarak bilinen spesifik trans-membran reseptörlerinin, TNF ailesine ait ligandlara bağlanmasına neden olan hücre dışı sinyaller ile indüklenen bir ölüm şeklidir. Ölüm reseptörleri, ligandlara bağlanırken birçok reseptör molekülü bir araya getirilir ve kaspaz kaskadının aktivasyonuna yol açan Ölüm Başlatma Sinyali Kompleksi (DISC) olarak bilinen çok proteinli bir kompleks oluşur. Bu proteinlerden biri Fas-ilişkili ölüm alan proteini (FADD)'dir. FADD prokaspaz 8 moleküllerini bağlar, böylece Kaspaz 8 aktive olur. Aktif Kaspaz 8, ek Kaspaz 8 moleküllerini aktive ederek apoptozun başlamasına sebep olur (Fleten ve diğerleri, 2016; Lavrik ve Krammer, 2012) (Şekil 2.8).

İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolları arasında etkileşimler de sözkonusu olabilir. Bu durum, proapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinden Bid tarafından sağlanır. İntrinsik yolda aktive olan Kaspaz 8, Bid proteininin kesilmesini ve tBid proteininin oluşmasını sağlayabilir. tBid proteini, Bax aktivasyonunu ve MOMP'un indüksiyonunu sağlamak için mitokondriye giriş yapabilir. tBid, ekstrinsik yolağı aktive ederek mitokondriden sitokrom-c çıkışını gerçekleştirir (Fricker ve diğerleri, 2018) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolları (Fricker ve diğerleri, 2018)

Apoptozun nörodejeneratif hastalıklardaki rolü

Nöronal apoptozunun, birçok nörodejeneratif hastalığın patogenezi ile ilgili olan uyarılara yanıt olarak ortaya çıkabileceği belirlenmiştir (Mitchell ve diğerleri, 1994; Bonfoco, Krainc, Ankarcona, Nicotera ve Lipton, 1995). AH'den sorumlu A β proteini (Forloni, Bugiani, Tagliavini ve Salmona, 1996; Estus ve diğerleri, 1997), PSEN2 mutasyonları (Wolozin ve diğerleri, 1996), Parkinson hastalığı toksini olan 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) ve metaboliti (Tatton ve Kish, 1997), dopamin (Ziv ve diğerleri, 1994), ALS'den sorumlu SOD1 geninin aşırı ekspresyonu (Rabizadeh ve diğerleri, 1995), birçok nörodejeneratif hastalığın ortak sebebi olan mitokondriyal kompleks 1 inhibitörleri (Hartley, Stone, Heron, Cooper ve Schapira, 1994) ve H₂O₂ benzeri pro-oksidanlar (Slater, Stefan, Nobel ve Orrenius, 1995), nöronal apoptoz kaynağıdır. Yapılan incelemelerde, AH'li kişilerin beyin dokularında pro-apoptotik (Bax, Bac, Bad) proteinlerin seviyelerinin artışı ve öncül Kaspaz 8, 9 ve efektör Kaspaz 3, 6'nın varlığı tespit edilmiştir (Behl, 2000; Albrecht ve diğerleri, 2007; Stadelmann ve diğerleri, 1999; Rohn, Head, Nesse, Cotman ve Cribbs, 2001; Rohn ve diğerleri, 2002). Transgenik AH fare modellerinde intrinsik apoptotik yolun engellenmesinin, anti-apoptotik Bcl-2 geninin aşırı ekspresyonuna sebep olduğu, Kaspaz 9 ve 3 aktivasyonunu ise bloke ettiği gösterilmiştir (Rohn ve diğerleri, 2008; Corona, Pensalfini, Frazzini ve Sensi, 2011).

Parkinson hastalarının beyin dokularında Kaspaz 3, 8 ve 9 gibi nöronal apoptoz efektörlerinin ekspresyonlarının arttığı tespit edilmiştir (Anglade ve diğerleri, 1997; Hartmann ve diğerleri, 2001; Viswanath ve diğerleri, 2001). Ayrıca, Parkinson hastalarının nöromelanin içeren hücrelerinde apoptotik kromatin kümelerinin varlığı, apoptotik hücre ölümünün kanıtı niteliğindedir (Tompkins, Basgall, Zamrini ve Hill, 1997; Tatton, Maclean-Fraser, Tatton, Perl ve Warren, 1998; Tatton, 2000; Lev, Melamed ve Offen, 2003). Bu hücrelerde, aktive olmuş Kaspaz 3 de gözlenmiştir (Tatton, 2000). Parkinson hastalarının beyin postmortem dokularında, ekstrinsik apoptotik yolun aktivasyonu gösterilmiştir (Mogi ve diğerleri, 1994; Mogi ve diğerleri, 1996; Hartmann, Mouatt-Prigent, Faucheux, Agid ve Hirsch, 2002).

Kaspazların, Huntington hastalarının beyinlerinde de aktive olduğu gösterilmiştir (Vis ve diğerleri, 2005; Kiechle ve diğerleri, 2002). Huntingtin proteininin kendisinin, kaspazlar için bir substrat olduğu ve sinir hücreleri için toksik olabileceği kaydedilmiştir (Wellington ve

diğerleri, 2002; Wellington ve diğerleri, 2000). Kaspaz 8 ekspresyonunun, Huntington hastalarının beyin dokularında arttığı gösterilmiştir (Sanchez ve diğerleri, 1999). ALS’de Bcl-2 mRNA ekspresyonunun azaldığını, Bax ve Kaspaz 3 mRNA ve protein düzeylerinin ise arttığını gösteren biyokimyasal çalışmalar mevcuttur (Mu, He, Anderson, Springer ve Trojanowski, 1996; Ekegren, Grundström, Lindholm ve Aquilonius, 1999).

2.3.2. Nekroz

Nekroz kelimesi, ilk olarak Virchow tarafından hücreler ve dokulardaki pasif, yıkıcı değişiklikleri ifade etmek için kullanılmıştır (Lee ve diğerleri, 2018). Nekrotik hücrelerin hücre içi parçalarının ve salgılarının, apoptozdan farklı olarak bir inflamatuvar yanıtı tetiklediği belirlenmiştir. Nekrozun, beyinde nöroinflamasyonun başlatılması veya güçlendirilmesi ile ilişkili olduğu ve geri dönüşümsüz bir nöronal kaybın temsilcisi olduğu bildirilmiştir. Plazma membranlarının bütünlüğünün bozulması anlamına gelen nekroz, birçok farklı mekanizma ile oluşabilmektedir. Bu mekanizmalar iki başlık altında toplanmıştır: Düzenlenmiş (veya programlanmış) nekroz, genetik olarak kontrol ve bloke edilebilen aktif hücresel süreçleri içerirken; düzensiz nekroz, plazmaya doğrudan etki eden doku travması ya da toksinler sonucu oluşan durumlar gibi pasif süreçleri içermektedir (Berghe, Linkermann, Jouan-Lanhouet, Walczak ve Vandenaabeele, 2014). Düzenlenmiş nekrozun çeşitli formları nekroptoz, partanatoz, ferroptoz, mitokondriyal zar geçirgenliğinin değişimi, otoliz ve pirotozdur.

Nekroptoz

Hem dış kaynaklı hem de endoplazmik retikulum kaynaklı etkiler ile ATP düzeylerinin azalması sonucu oluşan, programlanmış nekrozdur. Nekroptozun, hücre membran bütünlüğünün bozulması, hücre ve endoplazmik retikulum dilatasyonu, organellerin parçalanması, hücrenin lizisi ile karakterize olan nekroz ve apoptoz niteliklerinin birlikte görüldüğü farklı hücre ölüm tiplerini temsil ettiği bilinmektedir. Nekroptoz, hücre ölüm reseptörlerinin TNF- α ve Fas gibi ligandlara bağlanması ile başlar. Bu durum kaspazlardan bağımsız şekilde gerçekleşir (Degterev ve diğerleri, 2005). Nekroptozun, reseptör interaktif protein 1 (RIP1) ve RIP3 kinazlar tarafından kontrol edildiği bilinmektedir (Christofferson ve Yuan, 2010). Beyinde travma, dejenerasyon ve enfeksiyon gibi çeşitli sebeplerle hasar görmüş sinir hücrelerinde, nekroptoz görülür. İnsan embriyonik kök hücre

kaynaklı motor nöronlarının, sporadik ALS'li kişilerden ya da SOD1 mutant farelerden türetilen astrositlere maruz kaldıklarında, RIP1 kinaz bağımlı nekroptozu uğradıkları gösterilmiştir. RIP1 inhibisyonunun, kortikal nöronların eksitotoksik ölümünü önlediğine dair bulgular vardır (Li, Yang, Ma, Qiao ve Zhang, 2008; Xu ve diğerleri, 2007). Ayrıca, nekroptoz inhibisyonunun, nöroinflamasyonun azalmasıyla sonuçlandığı gösterilmiştir (Chavez-Valdez, Martin, Flock ve Northington, 2012).

Partanatoz

Partanatoz, poli adenozin difosfat polimerazların (PARP) aktivitesine bağlı düzenlenmiş bir nekroz türüdür (Fearnley ve Lees, 1991). PARP'ye bağlı ölüm, mitokondriden çekirdeğe AIF translokasyonu ve ardından kromatin yıkımı ile gerçekleşir (Cheung ve diğerleri, 2006; Culmsee ve diğerleri, 2005; Wang ve diğerleri, 2004; Yu ve diğerleri, 2002). Stres faktörleri ile aktifleşen PARP-1, AIF'nin indüklenmesine ve nükleer translokasyonuna sebep olur. AIF, mitokondriden salınan siklofilin A ile birleşerek bir kompleks oluşturur (Suzuki ve diğerleri, 2013). Siklofilin A-AIF kompleksinin, nükleer translokasyon yapabildiği, DNA'ya bağlanarak DNA'nın fragmentasyonuna sebep olmak suretiyle hücre ölümünü tetiklediği kaydedilmiştir. Siklofilin A-AIF kompleks oluşumunun inhibe edilmesinin, hipokampusta yer alan sinir hücrelerinin glutamat kaynaklı ölümünü önlediği bildirilmiştir (Doti ve diğerleri, 2015).

Çeşitli nörodejeneratif bozukluklarda, partanatozun rolünün olduğu kanıtlanmıştır. PARP-1'in ve bazı durumlarda PARP-2'nin genetik veya farmakolojik inhibisyonu, AIF'nin nükleer translokasyonunu azaltır ve inme, eksitotoksik stres ve Parkinson hastalığında nöroprotektif etki gösterir (Lu, Kamboj, Gibson ve Anderson, 2014; Cao ve diğerleri, 2007; Kuzhandaivel, Nistri ve Mladinic, 2010; Mandir ve diğerleri, 2000; Mandir ve diğerleri, 1999; Yu, Mechawar, Krantic ve Quirion, 2010). Ayrıca, Parkinson, AH ve ALS hastalarının hastalık ile ilgili sinir sistemi bölgelerinde, artmış AIF aktivasyonu ve AIF'nin nükleer translokasyonu gözlenmiştir (Burguillos ve diğerleri, 2011; Lee ve diğerleri, 2012).

Ferroptoz

Nöronlarda eksitotoksik stresle tetiklenebilen demir bağımlı düzenlenmiş bir nekrozdur. Ferroptoz, apoptoz, nekroz, nekroptoz ve otofajik hücre ölümlerinden morfolojik ve

biyokimyasal olarak farklıdır. Ferroptoz, erastin gibi toksik etkili bileşikler ile indüklenebilir. Ferroptozun indüklenmesinin ardından, kromatin yoğunlaşması ve mitokondriyal ve nükleer büzülme ile seyreden hücre ölüm süreci başlar. Mitokondriyal büzülme, ferroptozu diğer ölüm formlarından ayıran eşsiz bir belirteçtir (Dixon ve diğerleri, 2012). Ferroptozun, lipit peroksidasyonu ve AIF'nin nükleer translokasyonu yolu ile hücre ölümüne sebep olduğu gösterilmiştir (Pallast ve diğerleri, 2010; Yang ve diğerleri, 2016). Ferroptoz inhibisyonu ile, Parkinson hastalığı ve ALS gibi eksitotoksik ölümün görüldüğü nörodejeneratif hastalıklarda nöronal ölümün önlenebileceği gösterilmiştir (Cheah ve diğerleri, 2006; Wang ve diğerleri, 2011).

Mitokondriyal zar geçirgenliğinin değişimi

Mitokondriyal zar geçirgenliğinin değişimi (mPTP), bir hücre ölüm formudur. Oksidatif fosforilasyon ve düşük ATP seviyelerinin sebep olduğu hücre içi Ca^{+2} yüksekliğinin, mitokondriyal zar geçirgenliğinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir. Mitokondriyal matriks enzimi olan siklofilin D, mPTP'de etkili olan bir proteindir. Siklofilin D, adenin nükleotid taşıyıcılar ve fosfat taşıyıcıları gibi bir veya birkaç transmembran proteini ile etkileşime girerek mitokondriyal zar geçirgenliğinin artırılmasına sebep olabilir (Halestrap ve Richardson, 2015; Shanmughapriya ve diğerleri, 2015). Mitokondriyal zar geçirgenliğinin artışı, beyinde iskemi sırasında ortaya çıkar. İskemi ile indüklenen nöronal hücre ölümünün, siklofilin D inhibitörleri ile kısmen önlenildiği bildirilmiştir (Li, Kristián, He ve Siesjö, 2000). AH'nin patogenezinde de mPTP'nin rol oynadığı kaydedilmiştir. Siklofilin D inhibisyonunun, AH'de A β kaynaklı mitokondriyal disfonksiyon ve nöron ölümünü engellediği, öğrenme ve hafıza fonksiyonlarını geliştirdiği bildirilmiştir (Du ve diğerleri, 2008).

Lizozomal hücre ölümü (otoliz)

Otoliz, lizozomal membran permeabilizasyonundan kaynaklanan hücre ölümü olarak tanımlanır ve nörodejeneratif hastalıklarında görülen hücre ölüm şekillerinden biridir (Serrano-Puebla ve Boya, 2016). Parkinson hastalığında indüklenen lizozomal membran permeabilizasyonu sonucunda otoliz oluştuğu bildirilmiştir (Dehay ve diğerleri, 2010).

Piroptoz

Piroptoz, patojen uyarımlı konak hücre ölümü anlamına gelmektedir. Kaspaz 1'e bağımlı olarak gelişen hücre ölüm şeklidir (Bergsbaken, Fink ve Cookson, 2009). İnterlökin dönüştürücü enzim olan Kaspaz 1'in, makrofajlarda aktivasyonu sonucu inflamatuvar sitokinlerin üretildiği ve hücre ölüm süreçlerinin başladığı bildirilmiştir (Kroemer ve diğerleri, 2009). İskemi sonrası, kortikal nöron kültürlerinde Kaspaz 1 aktivasyonunun, mitokondriyal membran permeabilizasyonunu etkinleştirdiği ve hücre ölüm süreçlerinde etkili olduğu kaydedilmiştir (Zhang ve diğerleri, 2003). Nöronal Kaspaz 1 inhibisyonunun ise, iskemiye baskılandığı, ALS'nin SOD1 modelinde ve AH'nin A β modelinde nöral ölümü önlediği belirlenmiştir (Tan ve diğerleri, 2014).

2.3.3. Otofajik hücre ölümü

Otofaji, hücre bileşenlerinin, ortadan kaldırılabilmesi için lizozoma iletildiği süreçtir. Hücrenin besin elde edemediği durumlarda ve işgalci patojenlerin nötralize edilip ortadan kaldırılmasında otofaji gerçekleşir (Paulus ve Xavier, 2015). Otofajide, hücre bileşenleri otofagozomlar olarak bilinen veziküller yoluyla lizozomlara taşınır. Otofagozom formasyonu, otofajiye bağlı genler ve ek proteinleri içeren multi-protein kompleksini hedef alan bir sinyal dizisi ile başlatılır (Ohsumi, 2014). Bu kompleksin aktivasyonu, çeşitli sitoplazma parçalarını, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi organelleri içine alan omegazom olarak bilinen çift-membran yapılı tomurcukların oluşmasını sağlar (Ktistakis ve Tooze, 2016). Otofagozomların endozomlar veya lizozomlar ile parçalanması, hücre için hayati öneme sahip bazı proteinlerin ve organellerin de yıkımına sebep olabilmektedir (Gozuacik ve Kimchi, 2007). Otofajideki anormalliklerin, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli sağlık sorunlarının nedenleri arasında yer aldığı gösterilmiştir (Platz ve diğerleri, 2011). Otofagozom formasyonu için gerekli olan genlerin susturulması ile otofajinin ve dolayısıyla nörodejenerasyonun önlediği belirtilmiştir (Hara ve diğerleri, 2006).

2.3.4. Paraptoz

Hücreyi nekroza götüren, yapısal ve biyokimyasal açıdan apoptozdan farklı, programlı bir hücre ölümüdür. Paraptozda insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü 1 (ILGF-1)'in

aktivasyonunu, mitokondride ve endoplazmik retikulumda şişmeler ve hücre içinde vakuollerin oluşması seyreder (Hoa ve diğerleri, 2009). Bunu, inflamasyon takip eder. Paraptozda görülenlere benzer tipte sitoplazmik vakuoller, AH'de ve diğer tauopatilerde oluşan nörodejenerasyonlarda kaydedilmiştir (Fricker ve diğerleri, 2018).

2.3.5. Fagositozla hücre ölümü (Fagoptoz)

Fagositoz ile hücre ölümü (fagoptoz), bir hücrenin başka bir hücre tarafından fagosite edilmesi anlamına gelmektedir. Fagositozun inhibe edilmesinin, hücre ölümünü önlediği belirtilmiştir (Brown ve Neher, 2014). Toll-benzeri reseptör (TLR) ligandları, TNF- α veya A β ile mikrogliaların aktivasyonu, nöronların fagositozuna sebep olmaktadır. Bu durum, nörodejenerasyonun başlamasına vesile olmaktadır (Neher ve diğerleri, 2011). İnflamatuvar yanıt oluşturan LPS'nin, nöronların mikroglial fagositozuna ve dolayısıyla nöronal kayba sebep olabileceği bildirilmiştir (Neher, Neniskyte, Hornik ve Brown, 2014). İskemide de mikroglial fagositozun eşlik ettiği nöronal kayıp gözlenmiştir (Neher ve diğerleri, 2011).

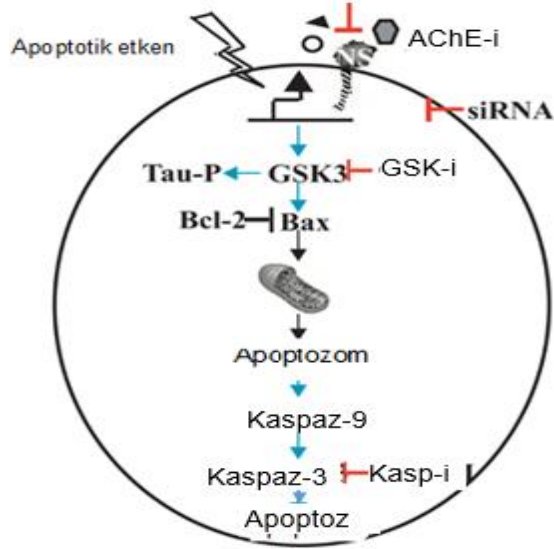
2.4. Nörodejeneratif Hastalıkların Tedavisi İçin Geliştirilen İlaçlar ve Etki Mekanizmaları

Amerikan İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde hali hazırda kullanılan ilaçlar mevcuttur. Bu ilaçların, AChE inhibisyonu, dopamin arttırıcı, dopamin reseptör agonisti, anti-inflamatuvar siklooksijenaz-2 (COX-2) inhibisyonu, gamma-aminobutirik asit (GABA) agonisti, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör baskılayıcı, antioksidan ve anti-apoptotik GSK-3 β inhibisyonu gibi özellikleri sebebiyle nörodejeneratif hastalıkların tedavisi / önlenmesinde etkili oldukları bilinmektedir (Durães, Pinto ve Sousa, 2018; Van der Schyf, 2011; Chauhan ve Mehla, 2015; Dey, Bhattacharya, Mukherjee ve Pandey, 2017).

2.4.1. AChE inhibitörleri (AChE-i'leri)

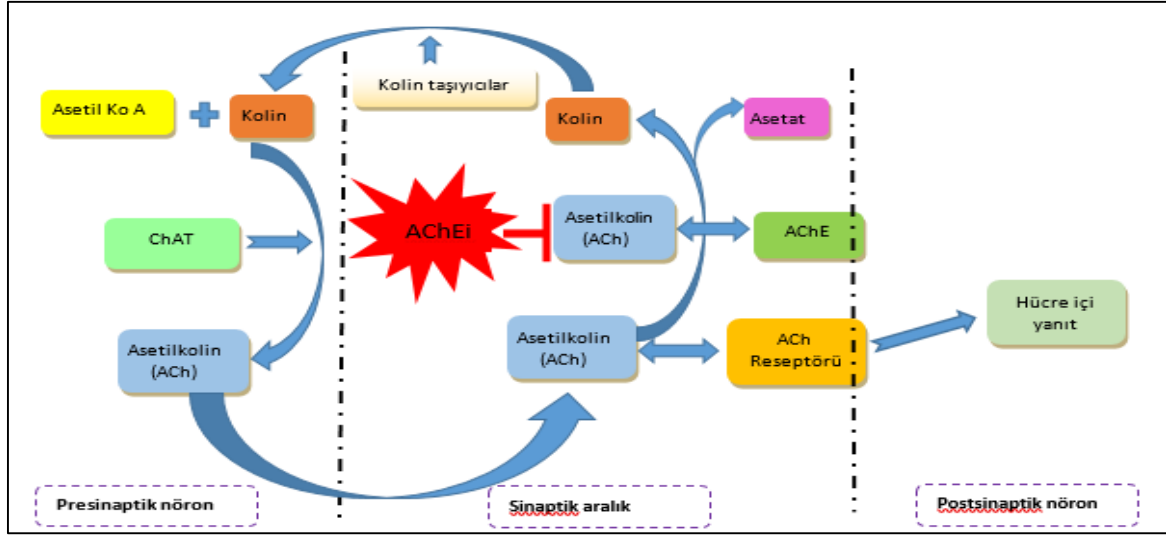
Hücrede artan AChE aktivitenin, pro-inflamatuvar sitokin ve interlökin üretimi gibi değişikliklere sebep olduğu bilinmektedir. AChE artışının, glukoz regülasyonu ve apoptozda etkili olan glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3)'ü harekete geçirerek pro-apoptotik proteinlerin (Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9) artışına sebep olduğu saptanmıştır. Ayrıca, GSK3 artışının anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2'yi bloke ettiği, böylece, hücrede apoptozun başlamasına

sebepe olduğu gösterilmiştir. GSK3 artışının, tau hiperfosforilasyonunu tetiklediği ve bu mekanizma üzerinden nörodejenerasyona sebep olduğu da belirtilmiştir. AChE, GSK3 ve Kaspaz inhibitörlerinin (AChE-i, GSK-i, Kasp-i) ise, bloke edici bir rol üstlenerek, apoptozu ve tau hiperfosforilasyonunu baskıladığı kanıtlanmıştır (Şekil 2.9) (Toiber ve diğeleri 2008).



Şekil 2.9. AChE inhibitörlerinin (AChE-i) nöral apoptozdaki rolü (Toiber ve diğeleri 2008)

AChE-i'ler, AChE enzimini geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz şekilde inhibe ederek, ACh'nin hidrolizini engellerler. Presinaptik nöronda Asetil Ko A ve kolinin, ChAT ile birleştirilmesi sonucu üretilen ACh, sinaptik aralığa salınır. Sinaptik aralıktaki ACh, postsinaptik membran üzerindeki asetilkolin reseptörüne bağlanır. Hücre içi bir yanıt tetiklendiğinde, ACh reseptörden ayrılır. AChE, sinaptik iletimi sonlandırmak için serbest kalan ACh'yi asetat ve koline hidrolize eder (Schumacher ve diğeleri, 1986). Kolin, kolin taşıyıcı tarafından presinaptik nöron içine taşınır ve ACh üretimi için bir substrat görevi görür. Hücrede AChE artışı olduğunda, ACh sinyal iletimini gerçekleştirilmeden hidrolize edilir. AChE-i'lerin AChE'yi inhibe ederek, ACh etki süresinin uzatılmasına, böylece hücrede şmpuls iletiminin doğru şekilde sağlanmasına yardımcı olduğu kanıtlanmıştır (Koçancı ve Aslim, 2016) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. AChE inhibitörlerinin (AChE-i) fonksiyonları (Jeger, 2013; Koçancı ve Aslim, 2016)

AChE-i'lerin, aktif mikrogial hücreler ile astrositleri baskılayarak sitokin üretimini durdurdukları bilinmektedir (Tabet, 2006). Yapılan çeşitli çalışmalarda, AChE-i tedavisinin periferik kan mononükleer hücreler üzerine etkileri incelenmiş ve tedavi sonrasında inflamasyonu baskılama yeteneğine sahip olan MCP-1 ve IL-4 üretiminin belirgin ölçüde arttığı, buna karşılık periferik kanda yükselen IL-1 β , IL-6, TNF- α düzeylerinin belirgin ölçüde baskılandığı gösterilmiştir (Gambi ve diğerleri, 2004).

Günümüzde AChE inhibisyonu, AH'nin ilaçla tedavisinde kullanılan en etkili yöntemdir. Bugün FDA onaylı AChE-i'ler rivastigmin (exelon®), takrinin (cognex®), donepezil (aricept®) ve galantamin (reminyl®)'dir (Casey, Antimisiaris ve O'Brien, 2010). Fakat, mevcut ilaçların, bradikardi, atriyal aritmi, miyokard enfarktüs, sino-atriyal ve atriyoventriküler blok gibi yan etkileri sebebiyle kullanımı kısıtlanmaktadır (Wollen, 2010; Rowland ve diğerleri, 2007). Bu nedenle, AH üzerinde koruyucu ve / veya iyileştirici potansiyeli olan, daha az yan etkiye sahip veya hiç yan etkisi olmayan yeni AChE-i'lerin belirlenmesi, önemli bir çalışma alanı haline gelmiştir. Araştırmacılar, yeni ve daha etkili AChE-i'lerin tespiti için, doğal etken maddeler olmaları bakımından, bitkisel kaynaklı bileşiklere odaklanmışlardır (Murray, Faraoni, Castro, Alza ve Cavallaro, 2013).

Farlow ve Hake'ye göre (2001) ideal AChE-i'lerin sahip olması gerek özellikler şöyle tanımlanmıştır:

- İyi tolere edilmelidir.
- Özellikle AChE artışının görüldüğü spesifik beyin bölgelerinde (serebral korteks ve hipokampus) etkili olmalıdır.
- % 60-80 oranında AChE inhibisyonu sağlamalıdır.
- Periferik kolinerjik sistem üzerine minimal etkilere sahip olmalıdır.
- Organ toksisitesi olmamalıdır (Farlow ve Hake, 2001; Ülger, Yavuz, Halil, Cankurtaran ve Arıoğul, 2009).

2.4.2. Dopaminerjik etkili ilaçlar

Dopamin, hareketlerin sağlanması, öğrenme ve hafızanın geliştirilmesi ve korunması, davranışların belirlenmesi, uyku dengesinin sağlanması gibi durumlarda etkili olan ve beyinde salgılanan bir nörotransmitterdir (Rutledge ve diğerleri, 2009). Parkinson hastalığında beyin substantia nigra adı verilen bölgesinde, dopamin üreten nöronların kaybı söz konusudur. Parkinson hastalığının ilaçla tedavi yaklaşımlarında, dopamin seviyesini arttıran, dopamin reseptörlerini uyararak ve dopamin metabolizasyonunu azaltan ilaçlar gündemdedir. Dopamin prekürsörü olan levodopa adlı ilaç, dopamin seviyesinin artmasına katkıda bulunarak Parkinson hastalığında semptomların azaltılmasında etkili olmaktadır (Parkinson Study Group, 2004). Doğrudan postsinaptik domein reseptörlerini uyararak Parkinson semptomları üzerinde etkili olan ilaçlar, pergolid, lisurid, pridedil, kabergolin, bromokriptin, pramipeksol, ropinirol, apomorfindir (Rascol, Goetz, Koller, Poewe ve Sampaio, 2002). İnfluenza tedavisinde kullanılan bir antiviral olan amantadinin de nöronlarda dopamin sentezini arttırdığı bildirilmiştir (Goetz ve diğerleri, 2017). Dopamin eksikliği sebebiyle ortaya çıktığı düşünülen kolinerjik artışı düzenleyen anti-kolinerjik ilaçlar da, Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Bunlar: Biperiden, benztropin, bornaprin, orfenadrin, prosiklidin, triheksifenidil, tropatepindir (Rosa, Ferreira, Coelho, Freire ve Sampaio, 2010). Dopamini metabolize eden monoaminooksidaz-B enziminin inhibitörleri: selejilin, lazabemid, rasajilindir. Dopamini metabolize eden bir başka enzim olan katekol o-metiltransferaz inhibitörleri tolkapon ve entakapon da Parkinson hastalığı tedavisinde kullanılmaktadır (Cakmur, 2011).

2.4.3. Anti-inflamatuar ilaçlar

Artan kanıtlar, inflamasyonun birçok nörodejeneratif hastalığın patogeneğinde yer aldığını gösterir. Bu nedenle, anti-inflamatuar ilaçların, beyindeki inflamasyonun kümülatif etkilerini azaltabileceği öne sürülmüştür. Bugüne kadar yapılan bazı epidemiyolojik çalışmalar, anti-inflamatuar ilaçların sürekli kullanımı ile nörodejeneratif hastalıklarda ilerlemenin yavaşlatıldığı göstermiştir. Non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar (NSAİİ'ler), anti-inflamatuar, antipiretik ve analjezik özellikleri nedeniyle dünya çapında en yaygın olarak kullanılan ilaçlar arasında yer almaktadır. NSAİİ'lerin, siklooksijenaz (COX) enziminin inhibisyonu yoluyla anti-inflamatuar etkilere aracılık ettikleri keşfedilmiştir (Yaksh, Dirig ve Malmberg, 1998). Nöroinflamasyon ile ilişkili bir protein olan COX-2'nin, bazı beyin ve sinir fonksiyonlarının düzenlenmesinde, AH'de ve inflamasyonda rol oynadığı bilinmektedir (Kaufmann, Worley, Taylor, Bremer ve Isakson, 1997). Ayrıca, korteks ve hipokampüste postsinaptik sinyallerin oluşumunda etkilidir ve indirekt olarak glutamat geri alınımını artırır, nöronal hasara yol açar. COX-2 enziminin ekspresyonunun AH'li beyinlerde arttığı gösterilmiştir. AH'li beyinlerde hiperfosforile tau proteinlerinin oluşturduğu nörofibriler yumakların ortaya çıkmasından hemen önce COX-2 seviyesinin yükseldiği tespit edilmiştir (Oka, Itoh ve Takashima, 1999). ALS hastalarının ve ALS fare modellerinin spinal kordlarında da yüksek COX-2 seviyeleri belirlenmiştir (Yasojima, Tourtellotte, McGeer ve McGeer, 2001; Yoshihara ve diğerleri, 2002). Parkinson hastalığı fare modellerinde COX-2 spesifik inhibitörlerinin nöroprotektif etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Teismann ve Ferger, 2001). Nörodejeneratif hastalıklarda, COX-2 inhibisyonu yolu ile anti-inflamatuar etki gösteren ilaçlar, asetaminofen ve ibuprofendir. Ayrıca, indometasin, flurbiprofen ve sulindak gibi NSAİİ'lerin, COX-inhibisyonundan bağımsız olarak reseptör-g aktivasyonu (Sastre ve diğerleri, 2003; Camacho ve diğerleri, 2004), Ras sinyal yolunun inhibisyonu (Zhou ve diğerleri, 2003) ve presenilin-1 interaksyonu yoluyla amiloid- β birikimini azalttığı gösterilmiştir (Gasparini, Ongini ve Wenk, 2004).

2.4.4. Gamma-aminobutirik asit (GABA) agonistleri

Glutamik asidin bir ürünü olan gamma-aminobutirik asit (GABA), bir nörotransmitterdir (Pearl, 2018). Nöronlarda GABA işleyişinin bozulması, mental reterdasyon, epilepsi, Huntington hastalığı, Parkinson, ALS gibi pek çok nörolojik ve psikiyatrik hastalık ile ilişkili

bulunmuştur (Ramírez-Jarquín ve Tapia, 2017). GABA agonisti olan diazepam ve baklofenin Huntington hastalığı ve ALS tedavisinde kullanımı sözkonusudur (Liu ve diğerleri, 2018b).

2.4.5. N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör baskılayıcıları

İyon kanalı bağımlı reseptörler olarak da bilinen NMDA reseptörleri, Ca^{+2} geçişini sağlayan araçlardır. Hücrede NMDA reseptörlerinin fonksiyon artışı, Ca^{+2} düzensizlikleri ile gelişen nörodejenerasyona sebep olmaktadır (Bading, 2017). Kalsiyum kanal bloklayıcı etki gösteren dantrolen ve NMDA reseptör baskılayıcı etki gösteren rulizolün, ALS; memantin ise, AH tedavisinde etkili olduğu bilinmektedir (Larsen, Mau, Padilla ve Enciso, 2017).

2.4.6. Antioksidan bileşikler

Nöronlarda serbest radikallerin üretilmesi, tüm nörodejeneratif hastalıklarda ortak olan özelliktir (Shah ve diğerleri, 2008). Antioksidan ilaçların nörotoksik uyarılara karşı nörokoruyucu etki gösterdiği *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiştir (Przedborski ve Ischiropoulos, 2005; Aliev ve diğerleri, 2008). E vitamini, melatonin, resveratrol, karnozin ve koenzim Q10 gibi bir dizi antioksidan molekülün nörodejeneratif hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde yararlı olabileceği kanıtlanmıştır (Sureta ve diğerleri, 2011).

2.4.7. Anti-apoptotik GSK-3 β inhibitörleri

GSK-3 β , çeşitli substratları fosforile etme kabiliyeti nedeniyle hücre içi apoptotik sinyal yollarının modülasyonunda önemli bir rol oynar. Örneğin, AH'de, bu hastalığın nöropatolojisine doğrudan katılan protein tau, bu enzim tarafından fosforile edilir. Bu nedenle, GSK-3 β inhibisyonu, AH'nin tedavisi ve önlenmesinde uygun bir stratejidir (Hernandez, Nido, Avila ve Villanueva, 2009). Ayrıca, nöronlarda GSK-3 β 'nin aşırı aktivitesi pro-apoptotik özellik gösterir ve GSK-3 inhibisyonu nöroproteksiyonu sağlar (Bhat, Budd Haeberlein ve Avila, 2004). Lityumun doğrudan ve tersine çevrilebilir bir GSK-3 inhibitörü olduğu bildirilmiştir (Camins ve diğerleri, 2009). Eksitotoksisite, β -amiloid muamelesi ve H_2O_2 aracılı oksidatif stres gibi çeşitli apoptotik modellerde, programlanmış nöronal hücre ölümünü inhibe ettiği kaydedilmiştir (Martinez ve Perez, 2008). Ayrıca,

lityumun AChE inhibitör özelliği de literatürde gösterilmiştir (Jing, Jin, Wu ve Zhang, 2008).

Nörodenjeneratif hastalıklar üzerinde etkili ilaçlar ve etki mekanizmaları Çizelge 2.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Nörodenjeneratif hastalıklar üzerinde etkili ilaçlar ve etki mekanizmaları

Etki Mekanizması	İlaç Adı	Kaynak
Dopamin arttırıcı	Levodopa, bromocriptine, ropinirole, tolcapone, entacapone, amantadine, pramipexole, selegiline, lazabemide, rasagiline,	Parkinson Study Group, 2004; Goetz ve diğerleri, 2017; Cakmur, 2011
Anti-kolinergic	Biperiden, benztropine, bornaprine, orphenadrine, procyclidine, tropatepine, trihexifenidil, donepezil, rivastigmine, galantamine, tacrine	Casey ve diğerleri, 2010; Rosa ve diğerleri, 2010
Dopamin reseptör agonisti	Lisuride, pergolide, pridedil, cabergoline, bromocriptine, pramipexole, ropinirole, apomorphine	Rascol ve diğerleri, 2002
Anti-inflamatuar	Acetaminophen, ibuprofen, indometacin, flurbiprofen, sulindak, lityum	Sastre ve diğerleri, 2003; Camacho ve diğerleri, 2004; Gasparini ve diğerleri, 2004; Jing ve diğerleri, 2008
GABA agonisti	Diazepam, baclofen	Liu ve diğerleri, 2018b
NMDA reseptör antagonisti	Memantine, riluzole	Larsen ve diğerleri, 2017
Ca ²⁺ kanal bloklayıcısı	Dantrolene	Larsen ve diğerleri, 2017
Anti-oksidan	Melatonin, resveratrol, carnosin, Coenzyme Q10	Sureda ve diğerleri, 2011
Anti-apoptotik	Lityum	Martinez ve Perez, 2008

Nörodejenereatif hastalıkların tedavisi için geliştirilen mevcut ilaçlar, ancak semptomları yavaşlatarak hastalığın ilerlemesini geciktirmekte; tam anlamıyla bir koruma ve tedavi sağlayamamaktadır. Aynı zamanda, bu ilaçların sürekli kullanımlarında veya yüksek dozda alımlarında, motor hareket bozuklukları da ortaya çıkabilmektedir (Lleo, Greenberg ve

Growdon, 2006). Kullanılan sentetik nörokoruyucu ajanların denge bozukluğu, uyku hali, anksiyete, duygu durum bozuklukları gibi yan etkilerinin olduğu göz önüne alınarak, ilaç alternatiflerinin keşfi için doğal kaynaklı yeni tedavi yaklaşımlarına odaklanılmıştır (Leo ve diğerleri, 2006). Nörodejeneratif hastalıklarda etkin olabilecek yeni ilaçların keşfine yönelik çalışmalar, antioksidan, antiradikal ve immun sistemi güçlendirici potansiyele sahip doğal kaynaklı ilaçların keşfi ve geliştirilmesini hedef alan stratejilere göre planlanmaktadır. Nörodejeneratif hastalıkların yaşlanma ile olan bağlantısı sebebi ile kümülatif hücresel hasarı önleyecek ve / veya tedavi edecek yaklaşımlar, patolojik yaşlanmaya ilişkin olarak erişkin yaşantısında hücre ölümünün nedenlerini tanımlamaya odaklanmıştır (Mehler ve Gokhan, 2000). Bu nedenle, AChE ve apoptoz inhibisyonu ve anti-inflamatuvar yaklaşımlar, önemli tedavi stratejilerini oluşturmaktadır (Bakar ve Yuluğ, 2009; Sherwin 2000, Chertkow, 2002). Kullanılmakta olan AChE-i ilaçların azot içeren heterosiklik yapıda olduğu bilinmektedir. *Glaucium* cinsinin de bahsedilen ilaçlara benzer şekilde düzlemsel yapılı, aromatik ve hetero halka içeren alkaloid bileşikler bakımından zengin olduğu bilinmektedir (Doncheva ve diğerleri, 2014). *Glaucium* türlerinden biri olan *G. corniculatum*'un geleneksel şifacılar tarafından hafıza arttırıcı olarak kullanılması ve AChE'yi inhibe etme potansiyelinin oldukça yüksek olması, nörodejeneratif hastalıklar üzerinde iyileştirici ve / veya koruyucu potansiyelde olabileceğini göstermiştir (Ahmed ve diğerleri, 2013, Orhan ve diğerleri, 2004). Bu nedenle, bu tez çalışmasında *G. corniculatum*'un kloroform, metanol ve su olmak üzere üç çözücü ile ekstralarının elde edilmesi, ekstradaki içerik analizlerinin gerçekleştirilmesi, ekstraların AChE ve nöral ölümü inhibe edici ve anti-inflamatuvar etkilerinin değerlendirilmesi ile nörodejeneratif hastalıklarda mümkün önleyici ve / veya tedavi edici etkinliği belirlenmeye çalışılmıştır.

2.5. Nörodejeneratif Hastalıkların Tedavisinde Kullanılan Alternatif Bitkisel Sekonder Metabolitler

Bitki kimyasalları primer ve sekonder metabolitler olarak ikiye ayrılır. Primer metabolitler, büyüme, üreme ve metabolizmanın sürdürülmesi gibi yaşam için temel süreçlerde görevli olan metabolitlerdir. Sekonder metabolitler, primer metabolitlerden biyosentetik yollarla üretilmiş olan, büyüme ve gelişme gibi yaşam süreçlerinde temel rol oynamayıp tozlaşmada, çevresel koşullara uyum sağlamada, mikroorganizma, böcek ve diğer patojenlere karşı savunmada ve diğer bitkilerle rekabette rol oynayan organik bileşiklerdir (Adamczyk, Adamczyk, Smolander, Kitunen ve Simon, 2018). Sekonder metabolitler, organizma bir

stres durumuyla karşılaştığı zaman faaliyete geçen özelleşmiş metabolik yollar tarafından üretilirler. Bitkisel sekonder metabolitlerin, iyon kanallarını, spesifik reseptörleri inhibe veya aktive ederek, antioksidan ve sinir sistemi bozukluklarında koruyucu veya tedavi edici ajan olarak görev yapabileceği bildirilmiştir (Syad ve Devi, 2014; Chen, Peng, Tsai ve Hsu, 2007; Mendis, Kim, Rajapakse ve Kim, 2008; Park, Sapkota, Kim, Kim ve Kim, 2011). Nörodejeneratif hastalıklarda etkili olduğu bilinen sekonder metabolitlerin başında fenolik bileşikler ve alkaloidler gelir.

2.5.1. Fenolik bileşikler

Fenolik bileşikler, bir veya daha fazla hidroksil grubu ve fonksiyonel grupları içeren aromatik halkalı bileşiklerdir (Dai ve Mumper, 2010). Fenolik bileşiklerin, serbest radikallere bağlanarak ve onların aktivitelerini bloke ederek antioksidatif etki gösterdikleri kaydedilmiştir (Çetin, 2010: 3-19). Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere ikiye ayrılırlar (Nizamlıoğlu ve Nas, 2010).

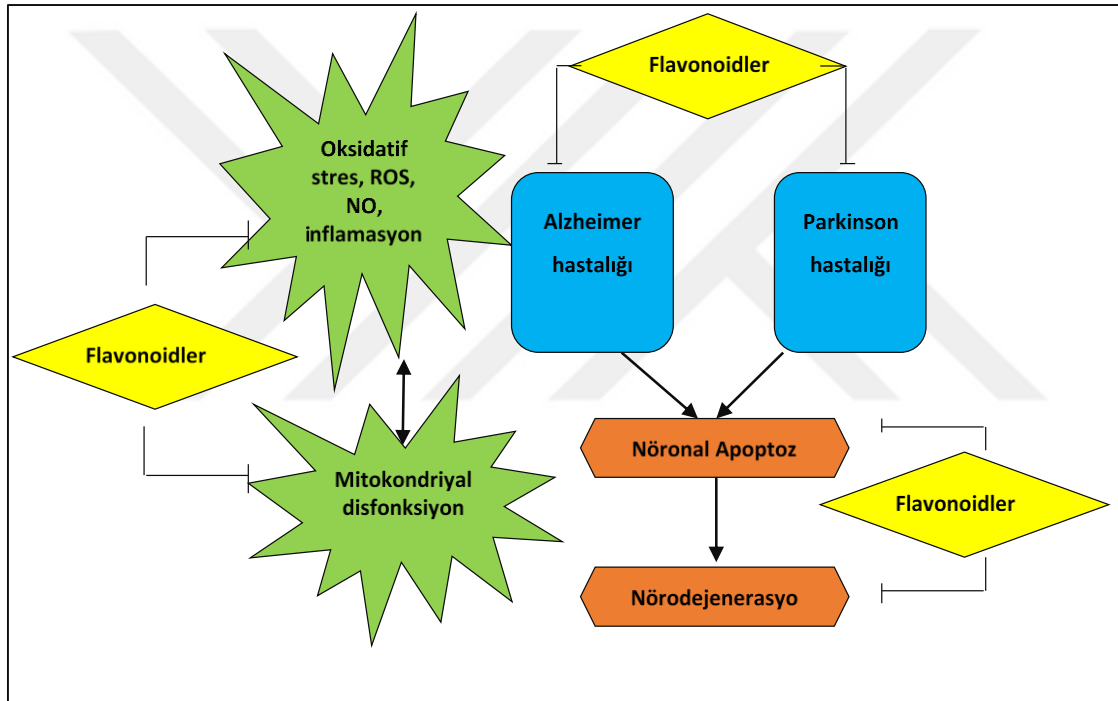
Fenolik asitler

Bitkilerin işlenmesi sırasında hidrolize şekilde ortaya çıkan, karbonhidratlar, glikozidler, aminoasitler veya proteinlerle reaksiyona girebilen, alkollerle fenol esterleri, amino bileşikleri ile amidleri, şekerlerle glikozitleri oluşturan fenolik bileşiklerdir (Ghasemzadeh ve Ghasemzadeh, 2011).

Flavonoidler

Flavonoidler, biyolojik olarak aktif ve terapötik olarak etkili polifenollerdir. Kimyasal yapılarına dayanarak flavanoller, flavonoller, flavonlar, flavanonlar, izoflavonlar, antosiyanidinler, kalkonlar gibi kategorilerde sınıflandırılırlar. Flavonoidlerin, anti-viral, anti-alerjik, anti-inflamatuar, anti-tümör ve antioksidan aktiviteler gibi çoklu biyolojik etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir (Gurung, Kim, Oh ve Sohng, 2013). Kan-beyin bariyerini geçebilir olmaları sebebiyle, protein fonksiyonunu ve gen ekspresyonunu etkileyen, moleküler seviyede nörofarmakolojik aktiviteler sergileyebilirler. Beyindeki nörotrofik faktörlerin düzenlenmesini sağlayarak, hafızanın güçlendirilmesine katkıda buldukları bildirilmiştir (Rendeiro ve diğerleri, 2013). Polifenoller açısından zengin

beslenmenin, nörotoksin kaynaklı hasara karşı nörokoruyucu etkiler sağladığı, öğrenme ve hafıza fonksiyonlarını desteklediği bilinmektedir (Vauzour, 2017). Ayrıca, flavonoidlerin oksidatif stres, ROS, nitrik oksit ve sitokin üretimini inhibe edebildiği, mitokondriyal disfonksiyonu önlediği AH ve Parkinson hastalığının patolojik belirteçlerinde azalmalara sebep olarak nöral apoptozu ve dolayısıyla norodejenerasyonu baskıladığı kaydedilmiştir (Spencer, Vafeiadou, Williams ve Vauzour, 2012) (Şekil 2.11). Bu nedenle, flavonoidler, nörodegeneratif hastalıklara karşı koyabilme özelliğine sahip, yeni bir ilaç grubu geliştirmeye yönelik çalışmalarda potansiyel moleküller olarak değerlendirilmektedir (Magalingam, Radhakrishnan ve Haleagrahara, 2015).



Şekil 2.11. Flavonoidlerin nörodegeneratif mekanizmalardaki rolleri (Hussain ve diğerleri, 2018)

Genistein adı verilen izoflavonun, mikroglial inflamatuvar reaksiyonları engelleyerek nörodegenerasyon sürecini ve ardından inflamasyonu azalttığı (Wang, Chen, Ma, Ye ve Lu, 2005), ALS'de nöroprotektif etki gösterdiği (Trieu ve Uckun, 1999), kortikal nöronları serbest radikal hasarına karşı koruduğu ve anti-oksidatif özellik gösterdiği saptanmıştır (Sonee, Sum, Wang ve Mukherjee, 2004). Genistein, LPS ile indüklenen nörotoksisiteye karşı dopaminerjik nöronları koruma potansiyeline sahiptir. Mikroglialda NO, TNF- α ve süperoksit üretimini engeller, böylece Parkinson hastalığında etkili olan dopaminerjik nöronları korur (Sonee ve diğerleri, 2004). Genisteinin, A β kaynaklı nörotoksisiteye karşı

savunma kaskadına aracılık eden östrojen reseptörleri agonisti olarak işlev gördüğü ve böylece, A β proteinlerinin agregasyonunu inhibe ederek nöronal hücre ölümünü bloke etmede pozitif bir potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir (Hardy ve Selkoe, 2002). Ayrıca, ROS'un mitokondriyal salınımını bloke etmek suretiyle mitokondriyal zar geçirgenliğinin değişmesini engeller, nöronlarda anti-oksidatif etkiye sebep olur (Ma ve diğerleri, 2010). Çalışmalar, genisteinin ACh kaynaklı nörotoksisitenin bloke edilmesinde de etkili olduğunu göstermiştir (Bang ve diğerleri, 2004).

İzoflavon sınıfına ait daidzein, (Jung ve diğerleri, 2000), nöronlarda NO ve ROS ile ilişkili oksidatif stresi inhibe ettiği, mikroglia aktivasyonunu ve pro-inflamatuar faktörlerin salınımını inhibe ettiği bildirilmiştir (Chinta, Ganesan, Reis-Rodrigues, Lithgow ve Andersen, 2013).

Flavon grubuna ait luteolin, anti-inflamatuar ve anti-oksidatif özellikleri ile bilinir (Harborne ve Williams, 2000). Aynı zamanda, fitoöstrojen benzeri aktiviteler sergiler (Dirscherl ve diğerleri, 2010). AH modeli farelerin, bilişsel işlev bozukluğundan luteolin ile korunduğu bildirilmiştir (Fu ve diğerleri, 2014). Ayrıca, luteolinin, mikroglia aktivasyonunu inhibe ederek LPS'nin neden olduğu dopaminerjik nöronal dejenerasyonu engelleyebildiği bilinmektedir (Chen ve diğerleri, 2008).

Apigenin, flavon grubu bir flavonoiddir. Anti-inflamatuar, anti-apoptotik, anti-oksidatif, antiviral ve anti-mutajenik gibi çoklu farmakolojik etkiler sergilediği bildirilmiştir (Yang, Landau, Huang ve Newmark, 2001). Apigeninin, murin kortikal nöronlarda glutamat ile uyarılan Ca²⁺ sinyalini azaltabildiği ve nöronları inflammatuar strese karşı koruyarak apoptotik hücre ölümünü sınırladığı bildirilmiştir gösterilmiştir (Balez ve diğerleri, 2016). Ayrıca, pro-inflamatuar sitokinlerin aktivasyonunu ve NO üretimini inhibe ederek, AH nöronlarını inflammatuar kaynaklı stresten koruyabilir (Zhang, Wang, Gurley ve Zhou, 2014). Apigeninin AChE aktivitesini azalttığı da kanıtlanmıştır (Anusha, Sumathi ve Joseph, 2017). Parkinson modeli farelerde apigenin tedavisinin, mikroglial aktivasyonun ve nöroinflamasyonu azaltarak dopaminerjik nöronal kayıplarının önüne geçtiği gösterilmiştir (Patil ve diğerleri, 2014).

Flavon grubuna ait olan akasetin, nöropsikiyatrik hastalıklara karşı potansiyel terapötik etkinliğe sahip olan *Clerodendrum inerme* (L.) Gaertn (CI)'den izole edilir (Chen ve

diğerleri, 2012). Akasetinin NO, IL-1 β ve TNF- α salınımını, inhibe edebildiği gösterilmiştir. Ayrıca, IL-1 β ve TNF- α ekspresyonunu düzenleyen ve nükleer faktör- κ B (NF- κ B) olarak bilinen transkripsiyon faktörün aktivasyonunu inhibe edebildiği belirtilmiştir (Hanisch, 2002). Merkezi sinir sisteminde glutamat artışı ile gelişen hücre içi Ca²⁺ ve serbest radikal stümülasyonu, mitokondriyal disfonksiyonun gelişmesi ve nihayetinde nöronal hasar, akasetinin glutamat salınımını inhibe etme özelliği ile baskılanabilmektedir (Lin, Huang, Wu, Lu ve Wang, 2014). Çalışmalar, akasetinin dopaminerjik nörokoruyucu özelliğinin olduğunu da vurgulamıştır (Kim ve diğerleri, 2012).

Hesperetin, turunçgil meyvelerinde bulunan bir flavonondur (Garg, Garg, Zaneveld ve Singla, 2001). Anti-inflamatuar ve anti-oksidatif ajan olarak nöroprotektif etkiler gösterir (Parhiz, Roohbakhsh, Soltani, Rezaee ve Iransahi, 2015). Nöronlarda A β depozisyonunu takiben oluşan otofajik nöronal hasar, hesperetin ile önlenebilmiştir (Cho, 2006). Hesperetinin, nöronlarda oksidatif hasara neden olabilecek lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği de gösterilmiştir (Cho, 2006; Huang, Tsai, Lin, Wu ve Yen, 2012).

Bir flavanon olan naringinin, Parkinson hastalarında artış gösterdiği bilinen glial fibrillar asidik proteini (GFAP)'nin ekspresyonunu azaltarak mikroglial aktivasyonu önlediği belirtilmiştir (Vinayagam ve Sadiq, 2015). Naringinin, inflamatuvar reaksiyonları ve oksidatif stresi modüle ettiği ve böylece nörodejenerasyona karşı nöroprotektif etki gösterdiği kanıtlanmıştır (Gopinath ve Sudhandiran, 2012).

Epigallokateşin gallat, flavonoidlerin flavanol grubuna aittir. Antioksidan aktivite sayesinde, serbest radikallerden kaynaklanan nörotoksisiteyi ve nöron hasarını azaltma kabiliyetine sahiptir (Lin, Chyi, Wu, Hwang ve Ho, 1998). Nöronlarda A β ile indüklenen kaspaz aktivitesini engellediği ve apoptozu önlediği bildirilmiştir (Choi ve diğerleri, 2001). Kan-beyin bariyerini geçebildiği ve beyin fonksiyonları ile ilgili gen ve protein ekspresyonlarına doğrudan etki edebildiği de belirlenmiştir (Suganuma ve diğerleri, 1998).

Yaban mersini, çay, kakao ve üzümde bulunan bitki kaynaklı bir flavanol olan epikateşin (Van Praag ve diğerleri, 2007), kan-beyin bariyerini geçebilme ve özellikle hipokampüste kardiyovasküler fonksiyonu ve kortikal kan akışını geliştirme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle, nörojenezi kolaylaştırabilir (Van Praag ve diğerleri, 2007). Epikateşinin NO ve ROS üretimini engelleyen ve aynı zamanda mitokondriyal aktivitedeki azalmayı gideren bir

ajan olduğu ve dopaminerjik n6ronları orta derecede koruduğu bildirilmiştir (Guo ve diğerleri, 2007).

Kuersetin, flavonoidlerin flavonol sınıfına aittir (Chen, Zhou ve Ji, 2010). Bilişsel gelişim ve anti-anksiyete 6zelliklerini i7eren etkiler g6sterir (Williams, Spencer ve Rice-Evans, 2004). Hafıza bozukluğunu ve n6ronal h6cre 6l6m6n6 iyileştirerek n6roprotektif etki g6sterir (Pu ve diğerleri, 2007). Aβ agregasyonunu azaltır (Sabogal-Guáqueta ve diğerleri, 2015).

Kamferol, bir fito6strojendir ve en yaygın flavonoidlerinden biridir (Bhathena ve Velasquez, 2002; Somerset ve Johannot, 2008). Potansiyel anti-inflamatuar ve anti-oksidatif etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Zuk ve diğerleri, 2011). Nekroza ve d apoptoza neden olan hasarlara karşı n6roprotektif etkilere sahiptir (Schroeter, Williams, Matin, Iversen ve Rice-Evans, 2000; Schroeter, Spencer, JRice-Evans ve Williams, 2001). Oksidatif strese bağlı ROS y6kselişini engeller (Ishige, Schubert ve Sagara, 2001). Kamferol6n ROS oluşumunu destekleyen ve n6ronal h6cre 6l6m6ne neden olan monoamin oksidaz-A'yı inhibe edici 6zelliğe sahip olması dikkat 7ekicidir (Sloley ve diğerleri, 2000).

Siyanidin-3-glukozit, kızılcık, yabanmersini, b6đ6rtlen, ahududu gibi kırmızı meyvelerde bulunan bir antosiyanindir (Doughari, 2012). N6ronal h6cre 6l6m6ne karşı n6roprotektif etki g6sterir (Bhuiyan, Kim, Kim ve Cho, 2011). Siyanidin-3-glukozit, Aβ 1-42 peptit seviyesini n6tralize edebilir ve H₂O₂ kaynaklı n6rotoksisiteyi inhibe edebilir (Tarozzi ve diğerleri, 2007; Shin, Park ve Kim, 2006). Kan-beyin bariyerini ge7ebilir ve n6ronlardaki yaşa bağlı deformasyonları giderebilir (Shin ve diğerleri, 2006). Siyanidin-3-glukozitin oligomer kaynaklı n6ronal destabilizasyon ve lipit peroksidasyonunu baskılayabildiği bildirilmiştir (Thummayot, Tocharus, Suksamrarn ve Tocharus, 2016).

Pelargonidin, bir antosiyanin t6revi flavonoiddir (Sohanaki, Baluchnejadmojarad, Nikbakht ve Roghani, 2016). Kan-beyin bariyerini ge7ebilir (Carkeet, Clevidence ve Novotny, 2008; Spencer, 2008). Hipokampal b6lgede kan akışını hızlandırıcı ve vazodilatat6r 6zellikleri sayesinde hafıza fonksiyonunu arttırarak n6rojenezi uyarabilir (Fader, Johnson ve Dohanich, 1999). Pelargonidin, serbest radikallerin oluşumunu inhibe ederek ve antioksidan savunma sistemini g67lendirerek, n6ronal kaybı ve hasarı en aza indirir (Rahman, Ichiyanagi, Komiyama, Sato ve Konishi, 2008). Ayrıca, anti-inflamatuar etkinliği nedeniyle

Parkinson hastalığının gelişimini de baskılamaktadır (Hämäläinen, Nieminen, Vuorela, Heinonen ve Moilanen, 2007).

2.5.2. Alkaloidler

Alkaloidler, memelilerde nadir olmasına rağmen, bakteriler, mantarlar, bitkiler ve hayvanlar da dahil olmak üzere çok çeşitli organizmalar tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir (Khatoun, 2017). Azot ve heterosiklik halka içeren, bazik karakterde ve çok az dozlarda dahi önemli derecede farmakodinamik aktiviteye sahip olan organik bileşiklerdir (Hesse, 2002: 24-26).

"Alkaloid" terimi ilk kez 1819'da Alman kimyager Carl FW Meissner tarafından kullanılmış ve Latince "alkali" ve Yunanca "gibi" kelimelerinden türetilmiştir (Hesse, 2002: 1-3). Bitki türlerinin yaklaşık % 20'sinde bulunan sekonder metabolitler olarak alkaloidlerin, otoburlara ve patojenlere karşı savunma rolü üstlendiği ifade edilmektedir. Etkili biyolojik aktiviteleri nedeniyle, alkaloidlerin ilaç, uyarıcı, uyuşturucu ve zehir olarak kullanıldığı bilinmektedir (Ziegler ve Facchini, 2008).

Alkaloidlerin etkileri

Arkeolojik ve tarihi kayıtlar, M.Ö. 2000 gibi erken dönemlerde alkaloid içeren bitkilerin ampirik ilaç kaynakları olarak kullanıldığını göstermektedir (Taşkiran, 2010: 3). Araştırmacılar ve gıda üreticileri için bitkilerdeki alkaloidlerin, anti-kanser, antihipertansif, anti-aritmik, anti-malariyal, anti-bakteriyel ve anti-AChE özellikleri ilgi çekici olmuştur (Verpoorte, 1998).

Bitkilerdeki alkaloid içeriği az olmasına rağmen, bazı alkaloid içeren bitkilerin veya ham özütlerin çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği bilinmektedir. 1806'dan beri, bitkilerden ve hayvanlardan ekstrakte edilen 6000'den fazla alkaloid türü vardır. Klinik uygulamada yaklaşık 100 çeşit alkaloid kullanılmış veya test edilmiştir. Pek çok alkaloid türü, tıbbi öneme sahiptir. Örneğin *Ranunculaceae* köksapında bulunan berberin, anti-bakteriyel ve anti-inflamatuar etkiye sahiptir. *Rauwolfia*'daki reserpin kan basıncını düşürebilir. *Lycoris*'te bulunan galantaminin polio sonrası sendromun tedavisinde etkinliği vardır. Haşhaş kabuğundaki morfin, bir çeşit analjeziktir. Kinine alkalın, değerli bir

antipiretik ilaçtır. Sefalotaksin ve vinblastin etkili kanser ilaçlarıdır. Tarımsal amaçlı pestisit yapımında bazı alkaloid çeşitlerinin kullanıldığı bilinmektedir (İnt-7). Atropin ve skopolamin alkaloidlerinin antikolinerjik aktivite gösterdiği ve parkinsizmin tedavisinde kullanılan ajanlardan olduğu bilinmektedir. Ayrıca, benztropin mezilat (kogentin), biperiden (akineton) ve prosiklidin (kemadrin)'in Parkinsonizmde faydalı olduğu belirlenmiştir (Sonsalla, 1997).

Bazı alkaloidlerin sinyal sisteminin bir parçası olan nörotransmitter özellikte olduğu bilinmektedir (Alves de Almeida ve diğerleri, 2017). Nörotransmitterler, amino asitlerden türetilir ve çoğu fizyolojik koşullar altında protonlanmış aminlerdir (Fattorusso ve Tagliatela-Scafati, 2008: 1-24). Birkaç alkaloidin, bu nörotransmitterlere yapısal benzerlikleri olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle alkaloidler, nörotransmitter analogları olarak düşünülebilir (Fattorusso ve Tagliatela-Scafati, 2008: 1-24). Bu yapısal nörotransmitter benzeri alkaloidler, nöroreseptörlere bağlayarak onları etkinleştirir veya etkisiz hale getirir. Buna ek olarak, Ca^{+2} , Na^{+} ve K^{+} gibi bazı iyon kanalları da önemli hedefleridir (Fattorusso ve Tagliatela-Scafati, 2008: 1-24). Nörokoruyucu etki gösteren alkaloidlerin, AChE ve BuChE inhibisyonu sağladığı, nAChR'nin modülasyonu ve anti-apoptotik AKT yolunun aktivasyonunu gerçekleştirerek apoptozu bloke ettiği belirlenmiştir (Fuentealba ve Saez, 2014).

Bitkilerden elde edilen alkaloid ekstraktların, nöroprotektif etkilerini bloke ettiği yönünde çalışmalar vardır. Blokaj sonrası nöronlarda alkaloid tedavisi ile Bcl / Bax'da önemli bir artış olduğu gösterilmiştir. Alkaloidler ayrıca, anti-iltihabik, anti-bakteriyel, anti-diyabetik, anti-ülser, antiviral, anti-inflamatuar, anti-aritmik, antioksidan, antidiyare, anti-mutajen, hipolipidemik, anti-tumoral ve nörokoruyucu etkiler gibi geniş bir yelpazede biyolojik aktiviteler de gösterirler (Yu ve diğerleri, 2005; Lau, Yao, Chen, Ko ve Huang, 2001; Han, Lin ve Huang, 2011; Kulkarni ve Dhir, 2010).

Fizostigmin, bir indol alkaloidi olarak ilk incelenmiş AChE-i'dir. Hem normal hem de AH'li kişilerde bilişsel fonksiyonu geliştirdiği *in vivo* olarak gösterilmiştir (Houghton ve Howes, 2005; Mukherjee, Kumar, Mal ve Houghton, 2007; Mehta, Adem ve Sabbagh, 2012). Fenserin ve tolserin gibi alkaloidler de kuvvetli AChE-i aktiviteye sahiptir (Loizzo, Tundis, Menichini ve Menichini, 2008).

Galantamin, AH tedavisi için büyük terapötik değere sahip önemli bir *Amaryllidaceae* alkaloididir. Bu bileşiğin % 80-100 oranında AChE-i etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Mukherjee ve diğerleri, 2007; Mehta ve diğerleri, 2012). Bu özelliği nedeniyle galantamin (Reminyl®), AH tedavisinde kullanılan bir ilaçtır.

Ungeremin ve iyorin *Amaryllidaceae* alkaloidlerindedir. Bu bileşikler, orta derecede AChE inhibisyonu gösterirler ve AChE inhibisyon etkinliğini geliştirmek amacıyla çeşitli sentetik türevlerin hazırlanması için bir model olarak kullanılırlar (Loizzo ve diğerleri, 2008).

Colchicum speciosum Steven (*Colchicaceae*), *Coptis* spp. (*Ranunculaceae*) ve *Corydalis* spp. (*Papaveraceae*)’den izole edilen alkaloidler de AChE-i etkiye sahiptir. Epiberberin, pseudoberberin ve pseudokoptisin bu gibi bileşiklere örnektir (Houghton, Ren ve Howes, 2006).

Özellikle bitkiler üzerinde yapılan araştırmalarla keşfedilen ve AChE-i aktivite gösteren bileşikler içinde günümüzde en önemlisi huperzin A’dır. Huperzin A, geleneksel Çin tıbbında “Qing Ceng Ta” adıyla bilinen ve yüzyıllardır şizofreni, unutkanlık ve hafıza kaybı tedavisinde kullanılan *Lycopodium serratum* (*Lycopodiaceae*) bitkisinden izole edilen bir potansiyel br AChE-i’dir (Tang ve Han, 1999; Tang, He ve Bai, 1999; Harel ve diğerleri, 1993; Saxena ve diğerleri, 1994).

Çalışmaya konu olan *Glaucium* bitkilerinde tespit edilen allokriptopin, papaverin, protopin, berberin ve bulbokapnin alkaloidlerinin de AChE inhibisyon özelliklerinin varlığı literatürde gösterilmiştir (Novak, Dolejš ve Slavik, 1972; Adsersen, Kjølbye, Dall ve Jäger, 2007; Mollataghi ve diğerleri, 2012; Park ve Eun, 1989; Kim ve diğerleri, 1999). *Glaucium* cinsine özgü olan ve diğer bitkisel kaynaklarda bulunmayan alkaloidlerden glausinin de AChE-i özelliklerinin varlığı literatürde gösterilmiştir (Doncheva ve diğerleri, 2014). Bu çalışmalar, anti-kolinesteraz aktivitesi olan bitki özlerinin ve ara bileşiklerin özgün AChE-i ilaçların sentezi için yararlanılabilir olduğunu kanıtlar.

Alkaloidlerin inflamatuvar yollar ile ilişkili olduğu da belirlenmiştir: *Sophora japonica* bitkisinden elde edilen oksimatin alkaloidinin mikroglial hücrelerde iNOS ve COX-2 mRNA ekspresyon seviyelerini anlamlı ölçüde azalttığı, ayrıca TNF- α , IL-1 β ve IL-6 protein seviyelerinde de azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir (Dong ve diğerleri,

2013). *Coptis japonica* bitkisinin palmatin, epiberberin ve koptisin alkaloidlerinin iNOS mRNA ekspresyon seviyelerini anlamlı ölçüde azalttığı ve anti-inflamatuar etki gösterdiği saptanmıştır (Jeon ve diğerleri, 2009). *Panax ginseng*'den elde edilen sinsenosidin, *Curcuma longa*'dan elde edilen bir pigment olan kurkuminin, *Camellia sinensis*'den elde edilen bir polifenol olan epigallokateşin gallatın, doğal bir polifenol olan resveratrolün, *Gastrodia elata*'dan elde edilen gastrodinin, *Zingiber officinale*'den elde edilen gingerolün, *Magnolia obovata*'dan elde edilen obovatolün anti-inflamatuar etki göstererek mikroglial nörotoksiteyi inhibe edici doğal alkaloidler olduğu kanıtlanmıştır (Choi, Koppula ve Suk, 2011). Berberin türevi alkaloidlerinin de anti-inflamatuar, anti oksidan ve anti-apoptotik özellikler gösterdiği çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Zou ve diğerleri, 2017; Amritpal, Sanjiv, Navpreet ve Jaswinder, 2010; Chen ve diğerleri, 2018).

Nörodejeneratif hastalıklar üzerinde etkili bitkisel sekonder metabolitler ve etki mekanizmaları Çizelge 2.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Nörodejeneratif hastalıklar üzerinde etkili bitkisel sekonder metabolitler ve etki mekanizmaları

Bileşik Adı	Bileşik Tipi	Etki Mekanizması	Kaynak
Genistein	İzoflavon	Anti-inflamatuar, anti-oksitatif, NO, TNF- α ve süperoksit salımının engellenmesi, anti-AChE	Wang, ve diğerleri, 2005; Sonee ve diğerleri, 2004; Hardy ve Selkoe, 2002; Bang ve diğerleri, 2004
Daidzein	İzoflavon	NO ve ROS ile ilişkili oksidatif stres inhibisyonu, pro-inflamatuar sitokin inhibisyonu	Jung ve diğerleri, 2000; Chinta, ve diğerleri, 2013
Luteolin	Flavon	Anti-inflamatuar ve anti-oksitatif, mikroglial aktivasyon inhibisyonu	Harborne ve Williams, 2000; Dirscherl ve diğerleri, 2010
Apigenin	Flavon	Anti-inflamatuar, anti-apoptotik, anti-oksitatif, Ca ²⁺ blokasyonu, anti-AChE	Yang ve diğerleri, 2001; Balez ve diğerleri, 2016; Anusha, ve diğerleri, 2017
Akasetin	Flavon	NO, IL-1 β ve TNF- α , NF- κ B, Ca ²⁺ , serbest radikal, glutamat salımını inhibe edici, dopaminerjik nörokoruyucu	Hanisch, 2002; Gonzalez-Scarano ve Baltuch, 1999; Lin, ve diğerleri, 2014; Kim ve diğerleri, 2012
Hesperetin	Flavon	Anti-inflamatuar, anti-oksitatif, A β hasar gidericisi, lipid peroksidasyonu inhibisyonu	Parhiz ve diğerleri, 2015; Cho, 2006; Huang ve diğerleri, 2012
Naringin	Flavanon	GFAP ekspresyonunu azaltıcı, mikroglial aktivasyonu önleyici, nöroprotektif	Vinayagam ve Sadiq, 2015; Gopinath ve Sudhandiran, 2012
Epigallokateşin gallat	Flavanol	Antioksidan, anti-apoptotik,	Lin ve diğerleri, 1998; Choi ve diğerleri, 2001
Epikateşin	Flavanol	NO ve ROS üretimini engelleyici, dopaminerjik nörokoruyucu	Van Praag ve diğerleri, 2007; Guo ve diğerleri, 2007
Kuersetin	Flavanol	Nöroprotektif, A β agregasyonunu azaltıcı	Pu ve diğerleri, 2007; Sabogal-Guáqueta ve diğerleri, 2015
Siyanidin-3-glukozit	Antosiyanin	Nöroprotektif, anti-oksitatif	Bhuiyan ve diğerleri, 2011; Tarozzi ve diğerleri, 2007; Shin ve diğerleri, 2006

Çizelge 2.2. (devam) Nörodejeneratif hastalıklar üzerinde etkili bitkisel sekonder metabolitler ve etki mekanizmaları

Pelargonidin, Kamferol	Flavonoid	Antioksidan, anti-inflamatuar	Rahman ve diğerleri, 2008; Hämäläinen ve diğerleri, 2007; Žuk ve diğerleri, 2011; Schroeter ve diğerleri, 2000; Schroeter ve diğerleri, 2001; Ishige ve diğerleri, 2001
Galantamin, fizostigmin, fenserin, tolserin, ungeremin, iyorin, epiberberin, pseudoberberin, pseudokoptisin, huperzin A, protopin, berberin, bulbokapnin, glausin, atropin, skopolamin	Alkaloid	Anti-kolinergic	Mehta ve diğerleri, 2012; Houghton ve Howes, 2005; Mukherjee ve diğerleri, 2007; Loizzo ve diğerleri, 2008; Sonsalla, 1997
Berberin, oksimatin, palmatin, epiberberin, koptisin, sinsenosid, kurkumin, epigallokateşin gallat, resveratrol, gastrodin, gingerol, obovatol	Alkaloid	Anti-inflamatuar	İnt-7; Dong ve diğerleri, 2013; Jeon ve diğerleri, 2009; Choi ve diğerleri, 2011

2.6. Nörodejeneratif Hastalıkların Araştırılmasında Kullanılan Model Hücre Hatları

2.6.1. PC12 hücre hattı

Sıçan böbrek üstü bezi hücrelerinden elde edilen PC12 hücreleri, hücre kültürü ortamına nöron büyüme faktörü (nerve growth factor-NGF) ilave edilmesiyle farklılaşarak, nörit benzeri farklılaştırılmış PC12 hücrelerine (fPC12) dönüşmektedir. PC12 hücrelerinin NGF'ye yanıt olarak katekolamin sentezlediği ve çok hızlı nöroblast / nöron fenotipine dönüştüğü gösterilmiştir (Levi, Eldridge ve Paterson, 1985; Greene ve Tishler, 1976). NGF'ye maruz bırakılan fPC12 hücrelerinin diğer bir özelliği ise, sükröz gradyanlarında bir AChE formunun ortaya çıkmasıdır (Rieger, Shelanski ve Greene, 1980). Birçok sinir hücresi ve glial popülasyonu içeren birincil kültürlerin aksine, fPC12 hücreleri homojen popülasyonlar oluşturur ve ekstrasellüler çevre üzerinde kolay bir manipülasyon ve kontrol sağlar (Pera ve diğerleri, 2013). fPC12 hücreleri, nöronal tamir, nöroprotektivite ve nörotoksisite mekanizmalarının araştırılmasında çok yaygın kullanılır. Aynı zamanda bu hücreler nöron ömrünü uzatma kapasitesi olan ajanları diğerlerinden ayırmak için avantaj sağlar (Bai ve diğerleri, 2002).

PC12 hücrelerinin, H₂O₂ gibi ROS'lara karşı apoptotik mekanizmaları aktifleştirici yanıt oluşturduğu bilinmektedir. H₂O₂, demir ve bakır gibi geçiş metalleri ile etkileşerek, hidroksil (OH) ve nitrik oksit (NO) gibi daha zararlı radikaller oluşturur (Willcox ve diğerleri, 2004).

H₂O₂ molekülü, diğer reaktif oksijen türlerine oranla oldukça kararlı ve yüksüzdür. Hücre kültürü çalışmalarında, ROS kaynağı olan H₂O₂'nin, hücre ölümünü tetiklediği, mitokondri ve sitoplazmada Bax, p53, Kaspaz 3, 9 seviyesini arttırırken, Bcl-2 seviyesinde azalmaya sebep olduğu, hücre ölüm mekanizmalarını aktifleştirdiği gösterilmiştir (Feng ve diğerleri, 2013).

Nörodejeneratif hastalıklara sahip kişilerin santral sinir sistemindeki makromoleküllerde artmış oksidatif hasar ile ilgili bulgular vardır. H₂O₂ ile muamele edilmiş PC12 hücrelerinde, hücre içi ROS miktarındaki artışa bağlı olarak, sitokrom-c salınımında, Kaspaz 9, Kaspaz 3 aktivasyonunda ve Bax/Bcl-2 oranında artış; mitokondriyal membran potansiyelinde azalma olduğu gösterilmiştir (Huang ve diğerleri, 2015). ROS inaktivasyonuna sebep olan çeşitli antioksidan ajanların ise, hücre içi ROS miktarında ve proapoptotik proteinlerin seviyelerinde azalmaya sebep olduğu belirtilmiştir (Huang, Lin, Su ve Ye, 2015). Nörodejeneratif hastalıklarda, hücre içi ROS miktarında artış olduğu ve bu artışın tau hiperfosforilasyonu, lipit peroksidasyonu, hücre içi Ca⁺² artışı, mitokondriyal disfonksiyon ve hücre ölümü ile orantılı olduğu bildirilmiştir (Tao ve diğerleri, 2015; Said ve diğerleri, 2000; Valencia ve diğerleri, 2012). H₂O₂'ye maruz kalan PC12 hücrelerinde hücre içi ROS miktarının flow sitometre ile tespit edildiği bir çalışmada, kontrole göre hücre içi ROS miktarının arttığı saptanmıştır. Bitkisel kaynaklı antioksidanların ise, hücre içi H₂O₂ kaynaklı hasarı önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Ao, Chu, Ji ve Wang, 2014).

Çalışmamız kapsamında apoptozu uyarıcı bir ajan olan H₂O₂ (farklı süre ve konsantrasyonları esas alınarak) fPC12 hücreleri üzerine uygulanmıştır. H₂O₂ uygulamasının ardından hücrelere *G. corniculatum* kloroform, metanol ve su ekstraktları tek tek uygulanarak ekstraktların *in vitro* ve hücreselel AChE-i etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca ekstraktların AChE, Bax, Kaspaz 3, Kaspaz 9 ve Bcl-2 mRNA ve protein seviyelerine etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Böylece *G. corniculatum* kloroform, metanol ve su ekstraktlarının AChE ve apoptoz artışını baskılayarak, nörodejenerasyon ve nöral apoptoz yaratıcı ajanlara karşı inhibitör etkisinin olup olmadığı ortaya konulmaya çalışılmıştır.

2.6.2. BV-2 hücre hattı

BV-2 hücreleri, neonatal ya da yetişkin fare beyin kültürlerinden izole edilen mikroglial hücrelerden türetilen primer mikroglial hücrelerdir ve çalışmalarda sıklıkla primer

mikroglialar yerine kullanılır. BV-2 hücrelerinde tetiklenen nöronal hasar sonrası, primer mikroglialara benzer şekilde, indirgenmiş nikotinamid-adenine dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enziminin ifade edilmesi sağlanır (Wu, Ré, Nagai, Ischiropoulos ve Przedborski, 2006; Yang ve diğerleri, 2007). Bu özellikleri nedeniyle BV-2 hücreleri, nöroimmün sistem çalışmalarında sıklıkla model olarak kullanılmaktadır (Petrova ve diğerleri, 1999). BV-2 hücrelerinin, inflamasyonu uyarıcı ajanlara karşı yanıt oluşturduğu bilinmektedir (Gordon, 2003; Dalton ve diğerleri, 1993; Ehrt ve diğerleri, 2001). Fare mikroglial BV-2 hücreleri ile yapılan çalışmalarda da inflamasyonun indüksiyonu ile IL-6, IL-1 β , TNF- α , COX-2 ve iNOS salınımının tetiklendiği ve IL-1 β , IL-6 ve TNF- α genlerinin mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (Jang ve diğerleri, 2013; Olajide ve diğerleri, 2013; Huang ve diğerleri, 2014; Gan ve diğerleri, 2015; Lee ve diğerleri, 2002; Huo, Rangarajan, Ling ve Dheen, 2011; Dong ve diğerleri, 2013).

Çalışmamız kapsamında, *G. corniculatum* kloroform, metanol ve su ekstraktları mikroglial BV-2 hücreleri üzerine tek tek uygulanmıştır. Bitki ekstresi uygulamasının ardından hücrelere inflamasyonu uyarıcı ajan olan LPS (farklı süre ve konsantrasyonları esas alınarak) uygulanarak ekstraktların IL-6 ve TNF- α pro-inflamatuar sitokinleri üzerine etkileri belirlenmiştir. Böylece, *G. corniculatum* kloroform, metanol ve su ekstraktlarının inflamatuvar sitokinlerin oluşumunun önüne geçerek, anti-inflamatuar etkisinin olup olmadığı ortaya konulmaya çalışılmıştır.

2.7. *Glaucium corniculatum* (L.) Rudolph Türünün Genel Özellikleri

Glaucium corniculatum türü, *Papaveraceae* familyası üyesidir. 30 cins ve 600 civarında tür içeren *Papaveraceae* (haşhaşgiller) familyası, Türkiye’de 5 cins ve yaklaşık 102 tür ile temsil edilir (Kılıç, Yıldız ve Kılıç, 2018). Familya üyelerinin tıbbi ve aromatik özellikler sergilediği ve anti-AChE, anti-kanser, antioksidan, anti-inflamatuar, anti-toksik etkiler gösteren biyoteknolojik öneme sahip terapötik sekonder metabolitler sentezlediği bilinmektedir (Yu, Gao, Zhu, Cao, Zhang ve diğerleri, 2014; Orhan ve diğerleri, 2004; Kim, Hwang, Jang, Park, Markelonis ve diğerleri, 1999; Sourabie, Nikiema ve Nacoulma 2014). *Papaveraceae* familyası üyesi olan *G. corniculatum* da bu sekonder metabolitleri içerme potansiyeli sebebiyle önemlidir.

Türünün taksonomisi şu şekildedir:

Alem: *Plantae*

Bölüm: *Magnoliophyta*

Sınıf: *Magnoliopsida*

Takım: *Papaverales*

Aile: *Papaveraceae*

Cins: *Glaucium*

Tür: *Glaucium corniculatum*

Tek veya iki yıllık otsu bitki olup, 40 cm'ye kadar dik yükselici gövdeye sahiptir. Yapraklar villoz, pinnatifid, segmentler ise darca oblong, dentattır. Çiçekler 2,5-5 cm çapındadır. Sepaller 1-2,5 cm uzunluğunda, skabroz hirsut tüylüdür. Petaller 1,5-2,5 (ya da 2,8) cm boyunda, sarı, turuncu veya kırmızı renklindedir. Meyve, tüylü, 10-20 (-25) cm uzunluğunda, üst yaprakтан kısa olan bir sap üzerinde bulunur.

Çiçeklenme: 5-7. aylar

Yetiştığı yükseklik: 0-2000 m, bozkırlar, tarla kenarları

Türkiye'de yayılışı gösterdiği yerler: Kastamonu, Ankara, Çorum, Kayseri, Konya, Malatya, Nevşehir ve Van

Dünyada yayılış gösterdiği yerler: Akdeniz, Bulgaristan, Romanya, Kafkasya, Kuzey Irak, İran (Davis, Cullen, Coode ve Hedge, 1965).

Toprakta az miktarda bulunduğu bitki büyümesi için elverişli olan jipsin, fazla bulunması durumunda fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle bitki hayatı için bir stres faktörü olduğunu belirtilmiştir (Meyer, 1986; Escudero, 1999; Escudero, Iriondo, Olano, Rubio ve Somolinos, 2000). Bitkiler çevresel streslere yanıt olarak flavin, terpenoid ve alkaloid gibi koruyucu sekonder metabolitleri sentezler (Binder, Peebles, Shanks ve San, 2009). Çalışmada kullanılacak olan bitki türünün jipsli topraklardan toplanma nedeni de sekonder metabolit içeriği bakımından zengin olmasının istenmesidir.

2.7.1. *G. corniculatum* türünün sekonder metabolitleri

G. corniculatum içerik analizlerinin yapıldığı sınırlı sayıda çalışmada, bu türün alkaloid içerik bakımından zengin olduğu bildirilmiştir. *G. corniculatum*'da en yaygın bulunan alkaloidlerin bulbokapnin, disentrin, protopin, allokriptopin, koridin, dehidrokoridin, glausin, glaufidin, predisentrin, taliporpin olduğu bildirilmiştir (Shafiee ve diğerleri, 1985; Doncheva ve diğerleri, 2014; Novak ve diğerleri, 1972; Phillipson, Gray, Askari ve Khalil, 1981; Kintsurashvili ve Vachnadze, 2000). Tetradekanoik asit, heksadekanoik asit, oktadekatrienoik asit, oktadekadienoik asit, oktadekenoik asit ve oktadekanoik asit *G. corniculatum*'da tespit edilen yağ asitleridir (Marin, Sajdl, Kapor ve Tatić, 1989). Ayrıca *G. corniculatum*'da luteolin, rutin, kuersetin ve isorhamnetin flavonoidlerinin varlığı da tespit edilmiştir (Koçancı, Hamamcıoğlu ve Aslim, 2017; Saleh, Maksoud, El-hadidi ve Amer, 1987).

Alkaloidlerin, yağ asitlerinin ve flavonoidlerin anti-AChE, anti-inflamatuvar, anti-apoptotik, antioksidan, serbest radikal süpürücü, anti-fibrotik, kanser önleyici, nöroprotektif, anti-sıtma, anti-bakteriyel, anti-virüs, anti-fungus, anti-parazit, anestezik, antitrombotik, anti-iskemik, nörotransmitter aktiviteler gibi çeşitli önemli farmakolojik aktiviteler sergilediğine dair bulgular mevcuttur (Farooqui ve Farooqui, 2016; Cook ve Samman, 1996; Girdhar ve diğerleri, 2015).

2.7.2. *G. corniculatum* türünün biyolojik aktivitesi ve nörolojik hastalıklardaki etkinliği

Glaucium sekonder metabolitlerinin, anti-mikrobik, anti-bakteriyel, anti-inflamatuvar, anti-tümöral ve analjezik etkinliğe sahip olduğuna ve yaşla ilişkili beyin bozukluklarını tedavi etme potansiyeline deyin en çalışmalar vardır (Orhan ve diğerleri, 2004; Hakemi-Vala ve diğerleri 2017; Soureshjan ve Heidari, 2014). *G. corniculatum*, geleneksel şifacılar tarafından hafıza artırıcı olarak kullanılmaktadır (Ahmed ve diğerleri, 2013). *G. corniculatum* üzerinde yapılan aktivite çalışmalarında, bu türlerin AH'li hastalarda kontrol gruplarına göre arttığı belirlenen ve nöral ölüm ile ilişkili olan AChE üzerinde belirgin bir şekilde inhibitör etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Orhan ve diğerleri, 2004). Bu bitki türünün, AChE inhibisyonu ile ilgili bu zamana kadar yapılan çalışmaları, *in vitro* ile sınırlı kalmış, AChE, nöral hücre ölümü ve inflamasyon mekanizmaları üzerinde etkisini ileri düzey moleküler çalışmalar ile ortaya koyan bir literatüre rastlanmamıştır.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan bitki ve temini

Çalışmada kullanılan *G. corniculatum* (L.) RUD. subsp. *refractum* (NAB.) CULLEN Gazi Üniversitesi Herbaryum materyali olup, Prof. Dr. Zeki AYTAÇ tarafından 27.07.2015 tarihinde Beypazarı, Ankara Yolu 10. km.'sinden (jipsli topraklardan) toplanmış ve teşhis edilmiştir. Toplanan bitkiye ait arazi fotoğrafları Resim 3.1 ve 3.2'de verilmiştir. Herbaryum numarası ZA10700'dür.



Resim 3.1. *G. corniculatum* gövde, yaprak ve çiçeği



Resim 3.2. *G. corniculatum* çiçeği ve çiçeği

3.1.2. Çalışmada kullanılan hücre hatları

PC12 hücre hattı

Çalışmada kullanılan PC12 hücreleri *Rattus norvegicus* feokromasitoma hücreleridir. PC12 hücre hatları Bilkent Üniversitesi Malzeme Bilimi ve Nanoteknoloji Enstitüsü (UNAM)'nden temin edilmiştir. PC12 hücreleri, böbrek üstü bezi hücrelerinden elde edilmektedir. Bu hücreler, hücre kültürü ortamına NGF ilave edilmesiyle nöronal hücrelere dönüşmektedirler. Nöronların hücresel biyolojisi ve AChE protein özellikleri ile ilgili çalışmalarda iyi tanımlanmış bir modeldir. Bu nedenle nörotoksisite, AChE inhibisyonu ve nöral apoptoz mekanizmalarının incelenmesinde PC12 hücre hattı tercih edilmiştir.

BV-2 hücre hattı

Çalışmada kullanılan fare (*Mus musculus*) mikrogial BV-2 hücreleri Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan alınmıştır. Bu çalışmada BV-2 hücre hattı inflamasyonun belirlenmesinde model hücre olarak kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Bitki ekstraktlarının hazırlanması

Bitki örneklerinin toprak üstü gövdeleri gölgede kurutulmuş ve toz haline getirilmiştir. Her çözücüde farklı kimyasal kompozisyonunun ve miktarlarının olabileceği göz önünde bulundurularak, 10 g toz halindeki bitki örnekleri, ayrı ayrı 150 mL kloroform, metanol ve su çözücülerini ile soxhlet cihazında (LabHeat) 60–100 °C arasında, 4 saat ekstre edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar, 0,22 µm'lik filtreden geçirilmiştir. Çözücüler 40 °C'de ve düşük basınçla dönen evaporatörde (Heidolph Laborota 4000) uzaklaştırılmıştır. Ekstrelerin verimleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Abdel-Aal, Haroon ve Mofeed, 2015).

% Ekstrakt: Ekstraktın gram cinsinden ağırlığı / Toz numunenin gram cinsinden ağırlığı × 100

3.2.2. Bitki ekstraktlarında bazı sekonder metabolitlerin ve biyoaktif bileşiklerin spektrofotometre, GC-MS ve HPLC ile tayini

Spektrofotometrik tayin

Üç farklı çözücü ile *G. corniculatum*'dan elde edilen ekstrelerde en yaygın bulunduğu düşünülen bazı sekonder metabolitler spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Toplam alkaloid miktar tayini

Bitki ekstralarında toplam alkaloid miktarları Ajanal, Gundkalle ve Nayak'ın (2012) çalışmalarında kullandıkları bromokrezol yeşili (BCG) (491207- Carlo Erba, İtalya) ile gerçekleştirilen reaksiyona dayalı bir spektrofotometrik yöntem temel alınarak belirlenmiştir. 1 mg bitki ekstraktı 1 mL hidroklorik asit (HCl)'de (pH 2,5) çözülmüş ve 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Üzerine 5 mL sodyum fosfat tamponu

(pH) 5 mL % 0,04'lük BCG ve 4 mL kloroform ilave edilmiştir. 10 saniye oda ısısında inkübasyonun ardından, dibe çöken kloroform cam tüplere alınmış ve bitki ekstresi içermeyen körve göre 470 nm'de okunmuştur. Bir alkaloid olan boldin (B3916-Sigma-Aldrich, ABD)'in 0,1-2 mg/mL'de hazırlanan solüsyonları ile standart eğrisi oluşturulmuştur. Bitki ekstraktlarındaki toplam alkaloid miktarları boldin standardına eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Boldin stardart eğrisi ve regresyon denklemi Şekil 3.1. (A)'de gösterilmiştir.

Toplam alkaloid veriminin % olarak oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Ajanal ve diğerleri, 2012).

Toplam Alkaloid (%): $A \times (E/K) \times 100$

A: Standarda göre ölçülen alkaloid miktarı (mg/mL)

E: Alkaloid içerik ekstresinin ağırlığı

K: Bitkinin toz materyal ağırlığı

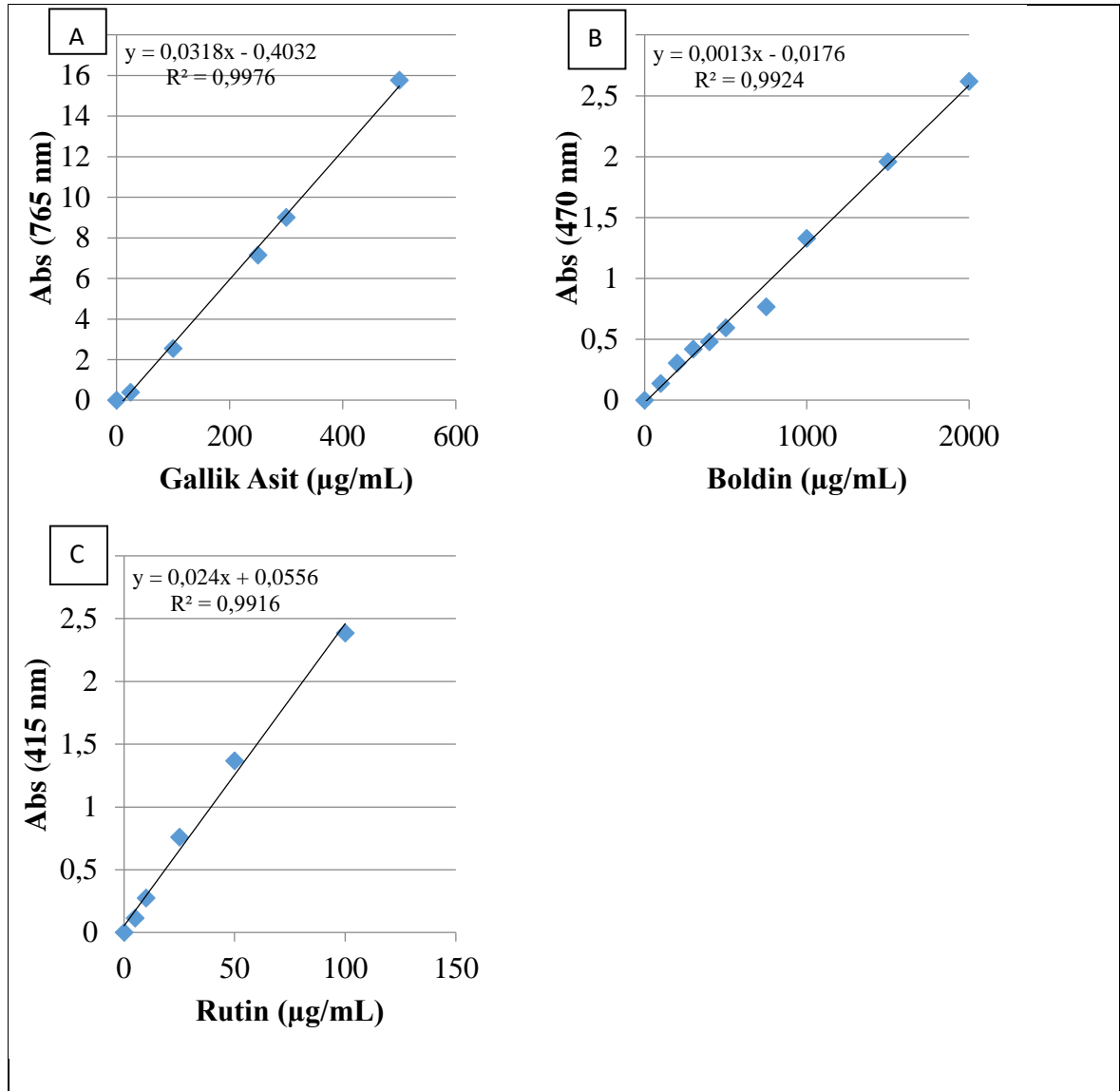
Toplam flavonoid miktar tayini

Bitki ekstraktlarının toplam flavonoid miktarları Lin ve Tang'ın (2007) çalışmalarında kullandıkları metot temel alınarak belirlenmiştir. Buna göre 0,3 mg/mL bitki ekstraktı içeren çözücüden 2 mL alınıp, üzerine 100 µL % 10'luk alüminyum klorür çözeltisinden ve 100 µL 1 M potasyum asetat (CH₃CO₂K) ilave edilmiştir. 2,8 mL distile su (dH₂O) ilave edilerek karıştırılmış ve 40 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak bitki ekstraktı içermeyen reaktif karışımı kullanılmıştır. Süre sonunda örnekler körve göre 415 nm'de okutulmuştur. Bir flavonoid olan rutin (R5143-Sigma-Aldrich, ABD) 5-100 µg/mL'de hazırlanan solüsyonları ile standart eğrisi oluşturulmuştur. Bitki ekstraktlarındaki toplam flavonoid miktarları rutine eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Rutin stardart eğrisi ve regresyon denklemi Şekil 3.1. (B)'de gösterilmiştir.

Toplam fenolik bileşik miktar tayini

Bitki ekstraktlarının toplam fenolik bileşik miktarı Singleton, Orthofer ve Lamuela-Raventós'un (1999) çalışmalarında kullandıkları metot temel alınarak, gallik aside eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Buna göre 0,3 mg/mL bitki ekstraktı içeren çözücüden 1 mL alınıp, üzerine 9 mL dH₂O, 1 mL Folin-Ciocalteu reaktifi,

10 mL % 7'lik sodyum karbonat (Na_2CO_3) ilave edilmiş ve 90 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır (Singleton ve diğerleri, 1999). Kontrol olarak bitki ekstraktı içermeyen reaktif karışımı kullanılmıştır. Süre sonunda 765 nm'de körve göre absorbans ölçülmüş ve 25-500 $\mu\text{g/mL}$ gallik asit (G7384- Sigma-Aldrich, ABD) çözeltilerinin absorbans değerlerinden elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak her numunenin içerdiği toplam fenolik bileşik miktarı, gallik asite eş değer olacak biçimde belirlenmiştir. Gallik asit stardart eğrisi ve regresyon denklemleri Şekil 3.1. (C)'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Standart eğrileri ve regresyon denklemleri A: Alkaloid (Boldin) B: Flavonoid (Rutin) C: Fenolik bileşik (Gallik Asit)

GC-MS ile tayin

Bitki ekstraktlarının bileşik içerik analizlerinin gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile tayini için, Ege Üniversitesi Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarında (FABAL) Thermo GC-Trace Ultra Ver: 2.0 Termo MS DSQ II (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, ABD) cihazı kullanılarak, hizmet alımı yapılmıştır.

Sıcaklık koşulları şöyledir: Başlangıç sıcaklığı 100 °C'dir. Dakikada 15 °C'lik bir artış hızı ile 100 °C'den 180 °C'ye çıkartılmıştır. Dakikada 5 °C'lik bir artış hızı ile 180 °C'den 300 °C'ye çıkartılmıştır. 10 dakika 300 °C'de bekletilmiştir. Enjektör sıcaklığı 250 °C'dir ve helyum, 0,8 mL/dakikalık bir akış hızında taşıyıcı gaz olarak kullanılmıştır. HP-5 MS kolonu (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) kullanılmıştır (Bozkurt, Coban, Kaya, Onur ve Unver-Somer, 2017). Kromatografik piklerin birlikte gösterildiği spektrumlar Xcalibur (2,07 sürümü, Thermo Fisher Scientific San Jose, CA, ABD) kullanılarak araştırılmıştır. Bileşikler, kütle spektral fragmentasyonunu, Wiley 7N kütüphane veri tabanının standart referans spektrumlarıyla karşılaştırarak tanımlanmıştır.

Her bir örneğe ait çalışma üç paralelli gerçekleştirilmiştir. Maddenin kolondan çıkış zamanını belirten Rt değeri ve piki oluşturan eğri ile taban çizgisi arasında kalan alanı tarif eden % alan, 3 paraleldeki değerlerin ortalamaları alınarak hesaplanmıştır (Wesołowska, Grzeszczuk, Wilas ve Kulpa, 2016).

HPLC ile tayin

Bitki ekstraktlarının bileşik içerik analizlerinin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile yapılmasında Agilent 1200 HPLC Systems Sistem (Agilent Corporation, MA, ABD) cihazı kullanılmıştır. Reversefaz kromatografik analiz, 25 °C'de bir C-18 ters faz kolonu (150 mm x 4,6 mm, partikül boyutu 5 µm, Agilent Zorbax Exclipse XDB-C18) kullanılarak izokratik koşullarda gerçekleştirilmiştir. Eşzamanlı izleme 350 ve 360 nm'de ve 1 mL/dakika akış hızında gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, integrasyon alan hesabı ile değerlendirilmiştir. Alanlar, standartların kalibrasyon eğrilerine göre µg/mL cinsinden belirlenmiştir (Oke-Altuntas, Aslim, Duman, Gulpinar ve Kartal, 2015).

3.2.3. PC12 hücrelerinin geliştirilmesi ve farklılaştırılması

PC12 hücrelerinin geliştirilmesi ve saklanması

PC12 hücrelerinin çoğaltılması, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (D5796-Sigma-Aldrich, ABD), % 10 ısıyla inaktive edilmiş horse serumu (04-004-1A-Biological Industries), % 10 ısıyla inaktive edilmiş fetal bovin serumu (F7524-Sigma-Aldrich, ABD), % 1 penisilin/streptomisin (P4333-Sigma-Aldrich, ABD) ve % 1 L-Glutamin (G7513-Sigma-Aldrich, ABD) kullanılarak hazırlanmış, 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilmiştir (Wu ve diğerleri, 2007). Hücrelerin geliştirilmesinde kullanılan 25 ve 75 cm²'lik kültür kapları 10 µg/mL olacak şekilde 1×fosfat tamponlu tuzlu su çözeltisi (PBS) içinde çözülerek hazırlanmış kollajen (A1048301-Invitrogen/GIBCO, ABD) ile kaplanmıştır. 10 dakikalık inkübasyonun ardından kollajen ile kaplı flasklara 1x10⁵ hücre/cm² yoğunluğunda hücre ekilmiştir. Hücreler 37°C'de % 5 karbondioksit (CO₂) içeren inkübatörde geliştirilmiştir. Hücre besi ortamı gün aşırı değiştirilerek hücre gelişimi takip edilmiştir. Hücreler, % 80-90 yoğunluğa ulaştıklarında sayılmıştır. Çalışma amacına göre belirli sayıda hücre mikropoplaklara aktararak geliştirilmiştir.

Hücreler, PC12 hücre besiyeri ve % 10 dimetil sülfoksit (DMSO) (K44917943 346-Millipore, ABD) ile hazırlanan saklama ortamında 1 gün -80 °C'de bekletildikten sonra, sıvı nitrojen tankına (Cryogenics) alınarak muhafaza edilmiştir.

PC12 hücrelerinin farklılaştırılması

NGF uygulanan PC12 hücrelerinin nöritler geliştirdiği (Greene ve Tishler, 1976) ve sempatik nöronlara benzer şekilde elektriksel özelliklerinde değişiklikler olduğu bildirilmiştir (Dichter, Tischler ve Greene, 1977; O'Laque ve Huttner, 1980). PC12 hücrelerinin nörit olarak farklılaştırılması, PC12 çoğaltma ortamına 100 ng/mL NGF (NC011- Millipore, ABD) eklenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Hücreler, NGF'li besiyeri ile 37 °C % 5 CO₂'li etüvde geliştirilmiştir. İki günde bir kültür kaplarındaki ortam, taze NGF içeren farklılaşma ortamı ile değiştirilmiştir. NGF uygulamasının 0., 2. ve 4. günlerinde hücre morfolojisinin ve farklılaşmasının kontrolü yapılmıştır.

PC12 hücrelerinin morfolojisinin ve farklılaşmasının kontrolü

PC12 hücrelerinin morfolojisinin ve farklılaşmasının kontrolü hem ışık mikroskobu (LEICA ICC50 HD) hem de floresan mikroskobu (Leica DMI 4000 B) kullanılarak sağlanmıştır. Kontrollerin sağlanması için yuvarlak lameller 24'lük kuyulara alınmış ve 1×PBS içinde çözünmüş 10 µg/mL Poli-D-Lizin (P7280-Sigma-Aldrich, ABD) ile kaplanmıştır. Lameller 37 °C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Kuyulardaki sıvı çekilerek lameller laminar flow içinde kurumaya bırakılmıştır. Ardından lameller 1×PBS içinde çözünmüş 10 µg/mL laminin (L2020-Sigma-Aldrich, ABD) ile kaplanmış ve 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Kuyulardaki sıvı çekilmiş ve lamellere PC12 hücrelerinin ekimi yapılmıştır.

Işık mikroskop incelemesi için, NGF içeren besi ortamı uygulamalarının 0., 2. ve 4. günlerinde hücreler % 3,7'lik paraformaldehit (PFA) ile fikse edilmiştir (Akeson ve Warren, 1986; Orłowska ve diğerleri, 2017). Preparat haline getirilen örnekler LAS V4.3.0 programında 40X büyütmede incelenmiştir.

Floresan mikroskop incelemesi için, NGF uygulamasının yapıldığı 0., 2. ve 4. günde fikse edilen hücreler, PBS içinde çözünmüş % 0,1'lik Triton X-100 ile 15 dakika oda ısısında permabilize edilmiştir. Lameller α -tubulin (A11126-Thermo Scientific, ABD) ve β -tubulin (MA1-118-Thermo Scientific, ABD) primer antikörlerinin 1:1 oranında karıştırılması ile hazırlanan kokteylin, 1×PBS'te 1:500 oranında dilüe hali ile oda ısısında 2 saat inkübe edilmiştir. Örnekler daha sonra 2 kez 1×PBS ile yıkandıktan sonra goat anti-mouse IgG floresan izotiyosiyonat (FITC) (112-095-003-Jackson ImmunoResearch) sekonder antikoru, 1×PBS ile 1:1000 oranında dilüe edilerek oda ısısında 2 saat hücreler üzerine uygulanmıştır. Örnekler daha sonra 2 kez 1×PBS ile yıkanmıştır. Çekirdek boyamasının sağlanabilmesi için, kesitlere Hoechst solüsyonu (Hoechst 33258, Molecular Probes, 10 mg/mL dH₂O ile çözünmüş şekilde) damlatılıp preparat haline getirilmiştir (Sierra-Fonseca, ce diğerleri, 2014). Preparatlar mavi eksitasyon filtresi: I3 ve yeşil eksitasyon filtresi: N2.1 vasıtasıyla 40X büyütmede incelenmiştir.

Ortalama 100 hücre ile yapılan analizlerde hücrelerin en az % 90'ının akson uzunlukları hücre gövdesinin en az iki katı olduğunda hücreler farklılaşmış sayılmıştır (Zhu ve diğerleri, 2013; Demirci ve diğerleri, 2013; Ciofani ve diğerleri, 2013).

3.2.4. BV-2 hücrelerinin geliştirilmesi ve morfolojisinin kontrolü

BV-2 hücrelerinin geliştirilmesi

DMEM, % 10 ısıyla inaktive edilmiş fetal bovin serumu, % 1 penisilin/streptomisin ve % 1 L-Glutamin kullanılarak hazırlanmış BV-2 çoğaltma ortamı 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Hücrelerin geliştirilmesinde kullanılan 25 ve 75 cm²'lik kültür kaplarına 1x10⁵ hücre/cm² yoğunluğunda hücre ekilmiştir. Hücreler 37°C'de % 5 CO₂ içeren inkübatörde geliştirilmiştir. Hücre besi ortamı gün aşırı değiştirilerek hücre gelişimi takip edilmiştir. Flasklardaki hücreler, % 80-90 yoğunluğa ulaştıklarında 37 °C'ye ısıtılmış tripsin/EDTA (25200-056-Invitrogen/GIBCO, ABD) ile kaldırılarak sayılmıştır. Çalışma amacına göre belirli sayıda hücre 96 ve 6 kuyulu mikropiplara aktararak geliştirilmiştir (Jung ve diğerleri, 2010).

Hücreler, BV-2 hücre besiyeri ve % 10 DMSO ile hazırlanan saklama ortamında 1 gün -80 °C'de bekletildikten sonra, sıvı nitrojen tankına (Cryogenics) alınarak muhafaza edilmiştir.

BV-2 hücrelerinin morfolojisinin kontrolü

Kültür koşullarında geliştirilen ve 24 saat süre ile 1 µg/mL LPS uygulanan BV-2 hücrelerinin morfolojisinin kontrolü ışık mikroskobu kullanılarak sağlanmıştır. Preparatlar, PC12 hücrelerinin morfolojisinin ve farklılaşmasının kontrolünde bahsedildiği gibi (Bkn. 3.2.3) hazırlanmıştır. Preparat haline getirilen örnekler LEICA ICC50 HD ışık mikroskobunda LAS V4.3.0 programında 10X büyütmede incelenmiştir.

3.2.5. Hücre canlılık testi ile sitotoksik etkinin belirlenmesi

H₂O₂'nin PC12 hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi

AChE ve apoptozun indüklenmesi ile nörodejeneratif hücre modelinin oluşturulmasında kullanılacak H₂O₂'nin PC12 hücrelerinde toksik etkisi test edilmiştir. Bu testte, yüksek oranda hücre ölümüne sebep olmayan (hücreyi apoptozdan çok nekroza götürmeyecek), fakat, apoptoz ve AChE indüksiyonunda etkin olabilecek konsantrasyon ve süre belirlenmeye çalışılmıştır. PC12 hücreleri 1×10⁴ hücre/kuyucuk olacak 96 kuyucuklu plağa ekilmiştir. Plaklar, 24 saat 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde bekletilmiştir. Süre sonunda

kuyulardaki hücreler 200 µL hücre kültürü besi yeri içinde çözünmüş 50, 100, 250, 500 ve 1000 µM H₂O₂ (1.07209-Merck) ile 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde 6, 12, 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. H₂O₂ uygulaması yapılmadan, normal hücre kültürü koşullarında büyütülen hücreler, kontrol olarak kullanılmıştır (Kasugai, Hasegawa ve Ogura, 1990; Wu, Shang, Sun, Liang ve Liu, 2007; Snitsarev, Andrej ve Rotella, 2013; Kim, Bae, Choi ve An, 2011).

Bitki ekstralarının PC12 hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi

G. corniculatum kloroform, metanol ve su ekstralarının PC12 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin olup olmadığının belirlenebilmesi için, PC12 hücreleri 1×10⁴ hücre/kuyucuk olacak 96 kuyucuklu plağa ekilmiştir. Plaklar, 24 saat 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde bekletilmiştir. Süre sonunda kuyulardaki hücreler, 100 µL hücre kültürü besi yeri içinde çözünmüş 100, 250, 500 ve 1000 µg/mL bitki ekstraktları ile 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde 4, 10 ve 24 saat muamele edilmiştir. Bitki ekstraktı uygulaması yapılmadan, normal hücre kültürü koşullarında büyütülen hücreler, kontrol olarak kullanılmıştır (Mandegary, Soodi, Sharififar ve Ahmadi, 2014).

H₂O₂'nin ve bitki ekstralarının birlikte PC12 hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi

H₂O₂'nin ardından *G. corniculatum* kloroform, metanol ve su ekstralarını uygulanmasının PC12 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin olup olmadığının belirlenebilmesi için, PC12 hücreleri 1×10⁴ hücre/kuyucuk olacak 96 kuyucuklu plağa ekilmiştir. Plaklar, 24 saat 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde bekletilmiştir. Süre sonunda kuyulardaki hücreler, 100 µL hücre kültürü besi yeri içinde çözünmüş 50 ve 100 µM H₂O₂ ile 24 saat 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde muamele edilmiştir. Ardından kuyulardaki besiyeri çelikip hücreler 100 µL hücre kültürü besi yeri içinde çözünmüş 100, 250, 500 ve 1000 µg/mL bitki ekstraktları ile 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde 4, 10 ve 24 saat muamele edilmiştir. H₂O₂ ve bitki ekstraktı uygulaması yapılmadan, normal hücre kültürü koşullarında büyütülen hücreler, kontrol olarak kullanılmıştır (Kasugai ve diğerleri, 1990).

LPS'nin BV-2 hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi

BV-2 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi olmayan fakat nöral inflamasyonun indüklenmesine sebep olan en etkin LPS konsantrasyon ve süresinin belirlenebilmesi için, BV-2 hücreleri 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak 96 kuyucuklu plağa ekilmiştir. Plaklar, 24 saat 37°C 'de % 5 CO_2 'li etüvde bekletilmiştir. Süre sonunda kuyulardaki hücreler, 100 μL hücre kültürü besi yeri içinde çözünmüş 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS ile 37°C 'de % 5 CO_2 'li etüvde 24 saat muamele edilmiştir. LPS uygulaması yapılmadan, normal hücre kültürü koşullarında büyütülen hücreler, kontrol olarak kullanılmıştır (Bozic ve diğerleri, 2015).

Bitki ekstralarının BV-2 hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi

G. corniculatum kloroform, metanol ve su ekstralarının BV-2 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin olup olmadığının belirlenebilmesi için, BV-2 hücreleri 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak 96 kuyucuklu plağa ekilmiştir. Plaklar, 24 saat 37°C 'de % 5 CO_2 'li etüvde bekletilmiştir. Süre sonunda kuyulardaki hücreler, 100 μL hücre kültürü besi yeri içinde çözünmüş 100, 250, 500 ve 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bitki ekstraktları ile 37°C 'de % 5 CO_2 'li etüvde 24 saat muamele edilmiştir. Bitki ekstraktı uygulaması yapılmadan, normal hücre kültürü koşullarında büyütülen hücreler, kontrol olarak kullanılmıştır (Park ve diğerleri 2011).

Bitki ekstralarının ve LPS'nin BV-2 hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi

G. corniculatum kloroform, metanol ve su ekstraları uygulanmasının ardından LPS'nin BV-2 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin olup olmadığının belirlenebilmesi için, BV-2 hücreleri 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak 96 kuyucuklu plağa ekilmiştir. Plaklar, 24 saat 37°C 'de % 5 CO_2 'li etüvde bekletilmiştir. Süre sonunda kuyulardaki hücreler, 100, 250, 500 ve 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bitki ekstraktları ile 37°C 'de % 5 CO_2 'li etüvde 24 saat muamele edilmiştir. Ardından kuyulardaki besiyeri çekilmiştir. Kuyulara 100 μL hücre kültürü besi yeri içinde çözünmüş 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS eklenmiş ve hücreler 37°C 'de % 5 CO_2 'li etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. Bitki ekstraktı ve LPS uygulaması yapılmadan, normal hücre kültürü koşullarında büyütülen hücreler, kontrol olarak kullanılmıştır (Park ve diğerleri, 2011).

Sitotoksik etki, ilk olarak Mosmann (1983) tarafından tarif edilen 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazoliumbromide (MTT) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntem, kimyasalların hücre kültürleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılan ve küçük hacimlerde sonuç verebilen kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir.

İnkübasyon sürelerinin ardından her kuyucuğa 20 µL MTT (5 mg/1 mL dH₂O) (M5655-Sigma-Aldrich, ABD) eklenmiştir. 96 kuyucuklu plak 3 saat 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde bekletilmiş, ardından kuyucuklardaki sıvı çekilerek tüm kuyucuklara 200 µL DMSO eklenmiştir. Plak, 30 dakika 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde bekletildikten sonra optik yoğunluk 570 nm'de mikropate okuyucuda (Epoch Take 3 Plate reader) okutulmuştur.

Hücre kültürü kontrol grubunda ölçülen absorbans değeri % 100 canlı olarak kabul edilmiş ve diğer hücre gruplarındaki yüzde canlılıklar da bu değerden hareketle aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Kim ve diğerleri, 2007).

Hücre canlılığı (%): $(\text{Ortalama örnek absorbansı} / \text{Ortalama kontrol absorbansı}) \times 100$.

3.2.6. Bitki ekstralarının *in vitro* ve hücreselel AChE aktivitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi

Bitki ekstralarının *in vitro* AChE inhibitör (AChE-i) etkisinin belirlenmesi

G. corniculatum kloroform, metanol ve su ekstralarının *in vitro* AChE-i özelliklerinin olup olmadığının belirlenebilmesi için, ekstraların AChE aktivitesini inhibe edici etkileri modifiye edilmiş spektrofotometrik Ellman yöntemi kullanılarak ölçülmüştür (Ellman, Courtney, Andres Jr ve Featherstone, 1961). Enzim kaynağı olarak elektrikli yılan balığı kaynaklı AChE (C2888- Sigma-Aldrich, ABD) kullanılırken, substrat olarak asetiltiyokolin iyodür (A-5751-Sigma-Aldrich), renklendirici madde olarak ise 5,5'-Ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit (DTNB) (D-8130- Sigma-Aldrich, ABD) kullanılmıştır. 96 kuyucuklu mikropakanın her birine 100 µL 0,1 mM fosfat tamponu (pH 7,0), 100, 250 ve 500 ve 1000 µg/mL olacak şekilde kloroform, metanol ve su çözücülerinde çözülmüş 100'er µL bitki ekstraları ve 20 µL AChE çözeltisi ilave edilip 25 °C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak bitki ekstraktı içermeyen çözücü kullanılmıştır.

7,5 mg NaHCO₃ ihtiva eden 5 mL 0,1 M fosfat tamponunu içinde 19,8 mg DTNB çözdürülmüştür. DTNB çözeltisi 1/8 oranında 0,1 M fosfat tamponunu (pH 8) ile dilüe edilmiştir. Dilüe DTNB çözeltisinden 50'şer µL kuyulara eklenmiştir. dH₂O ile hazırlanmış 21,7 mg/mL asetilkolin iyodür çözeltisi 1/40 oranında 0,1 mM fosfat tamponu (pH 8) ile dilüe edilmiştir. Dilüe asetilkolin iyodür çözeltisinden 50'şer µL kuyulara eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Mikroplaka, 25 °C'de, karanlıkta 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Asetilkolin iyodür hidrolizi DTNB'nin thiokolinlerin reaksiyonu sonucu oluşan, sarı renkli 5-thio-2-nitrobenzoat oluşumundan gözlenmiştir. AChE enzim aktivitesi, mikroplate okuyucuda (Epoch Take 3 Plate reader) 412 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleriyle belirlenmiştir. Çalışmada referans madde olarak AChE üzerinde inhibisyon etkisi kesin olarak belirlenmiş olan galantamin (G1660-Sigma-Aldrich, ABD) kullanılmıştır. % AChE inhibisyonu aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Ellman ve diğerleri, 1961).

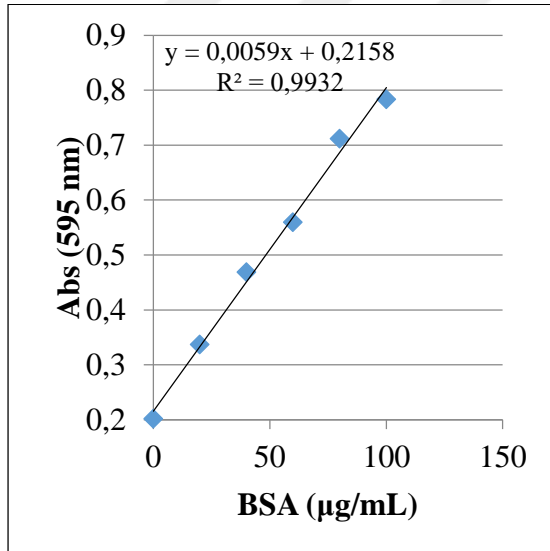
AChE inhibisyonu (%): $100 - \left[\frac{\text{Örnek çözeltilerinin absorbansı}}{\text{Kontrol çözeltilerinin absorbansı}} \times 100 \right]$

H₂O₂'nin hücresel AChE indüksiyonunun belirlenmesi

Bu çalışma kapsamında, fPC12 hücrelerinde en etkin AChE indüksiyonu sağlayacak H₂O₂ konsantrasyon ve süresi tespit edilmeye çalışılmıştır. fPC12 hücrelerinde AChE artışının sağlanıp nörodejeneratif hücre modelinin oluşturulması amaçlanmıştır.

6 kuyulu plaklar kollajen ile kaplandıktan sonra kuyulara 1×10^5 hücre/kuyu gelecek şekilde PC12 hücreleri ekilmiştir. Farklılaşmanın ardından fPC12 hücreleri 50 ve 100 µM H₂O₂ konsantrasyonları ile 6, 12, 24 ve 48 saat boyunca 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır (H₂O₂'in 200 µM ve üzerindeki konsantrasyonlarının, PC12 hücreleri üzerinde yüksek oranda sitotoksik etki göstermesi nedeni ile PC12 hücrelerine 50 ve 100 µM H₂O₂ uygulanmıştır). H₂O₂ uygulaması yapılmadan, normal hücre kültürü koşullarında büyütülen hücreler, kontrol olarak kullanılmıştır. Hücrelerdeki AChE aktivitesinin belirlenebilmesi için hücrelerden toplam protein izolasyonu yapılmış, daha sonra toplam protein miktarları belirlenmiştir.

Hücrelerden toplam protein izolasyonu için, uygulamaların ardından hücreler soğuk 1×PBS ile yıkanmıştır. Bütün PBS çekildikten sonra 1 mL soğuk PC12 çözme tamponu (1M Tris tamponu (10 mL) pH 7,2, 2 M sodyum klorür (NaCl), 1 M magnezyum klorür (MgCl₂), % 1 Triton X-100) direk hücrelerin üzerine uygulanmıştır. Hücreler, hücre kazıyıcı ile kazanmıştır. Kazınan hücreler, steril bir tüpe toplanmıştır. Bundan sonraki tüm aşamalar buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Tüpler, her 5 dakikada bir vortekslenerek 30 dakika +4 °C’de bekletilmiştir. Tüpler, 10000 rpm’de 20 dakika santrifüj yapılmıştır (Schwartz, Blundon ve Adler, 2007). Süpernatantlardaki protein miktarı, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki proteinlere bağlanarak, değişik renk şiddetinde mavi renkli çözeltiler ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilen Bradford (1976) yöntemine göre belirlenmiştir. Buna göre 20’şer µL süpernatant, 1 mL bradford çözeltisi (B6916- Sigma-Aldrich, ABD) ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından örneklerin 595 nm’de körve göre absorbans değerleri ölçülmüştür. 20-100 µg/mL standart bovine serum albumin (BSA) çözeltilerinin absorbans değerlerinden elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak her numunenin içerdiği toplam protein miktarı µg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.2) (Bradford, 1976).



Şekil 3.2. Protein (BSA) standart eğrisi ve regresyon denklemini

Uygulama gruplarındaki AChE aktivite, Ellman ve diğerleri (1961) tarafından geliştirilen, modifiye edilmiş spektrofotometrik yöntemle göre belirlenmiştir. 96 kuyucuklu plağın ilk sütununu oluşturan kuyucuklara 200'er µL PC12 çözme tamponu eklenmiş, bu sütunlar negatif kontrol olarak kullanılmıştır. İkinci sütuna ise 1 mg/mL AChE'den 200 µL eklenmiş,

bu sütunlar pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Diğer sütunlara ise uygulama gruplarından elde edilen toplam proteinden eşit miktarlarda ilave edilmiştir. Tüm kuyulara 0,1 mM fosfat tamponundan (pH 7) 100 µL eklenmiştir. Kuyulardaki toplam hacim, PC12 çözme tamponu ile eşitlenmiştir. 7,5 mg NaHCO₃ ihtiva eden 5 mL 0,1 M fosfat tamponunu içinde 19,8 mg DTNB çözdürülmüştür. DTNB çözeltisi 1/8 oranında 0,1 M fosfat tamponunu (pH 8) ile dilüe edilmiştir. Dilüe DTNB çözeltisinden 50'şer µL kuyulara eklenmiştir. dH₂O ile hazırlanmış 21,7 mg/mL asetilkolin iyodür çözeltisi 1/40 oranında 0,1 mM fosfat tamponu (pH 8) ile dilüe edilmiştir. Dilüe asetilkolin iyodür çözeltisinden 50'şer µL kuyulara eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Mikroplaka, 25 °C'de, karanlıkta 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Optik yoğunluklar mikroplate okuyucuda (Epoch Take 3 Plate reader) 412 nm dalga boyunda ölçülmüştür. % AChE enzim aktivitesi 1 mg/mL AChE içeren pozitif kontrolüne göre değerlendirilmiştir. Kotrole göre % AChE aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Ellman ve diğerleri, 1961).

Kotrole göre AChE aktivitesi (%): (Örnek çözeltilerinin absorbansı / Kontrol çözeltilerinin absorbansı) × 100

Bitki ekstralarının hüresel AChE indükleyici etkisinin belirlenmesi

Bu çalışma ile *G. corniculatum* ekstralarının fPC12 hücrelerinde AChE artışı yoluyla nörodejenerasyona sebep olup olmadıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. fPC12 hücreleri 24 saat 1000 µg/mL bitki ekstraları ile muamele edilmiş ve uygulama gruplarındaki AChE aktivitesi uygulama yapılmamış kontrol grubuna göre değerlendirilmiştir. Kontrol grubundaki AChE aktivitesi % 100 olarak kabul edilmiştir.

6 kuyulu plaklar kollajen ile kaplandıktan sonra kuyulara 1×10^5 hücre/kuyu gelecek şekilde PC12 hücreleri ekilmiştir. Farklılaşmanın ardından fPC12 hücreleri, 1000 µg/mL bitki ekstraları ile 24 saat boyunca 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır (Daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen bulgulara göre, 1000 µg/mL 24 saat bitki ekstraktı uygulaması, PC12 hücrelerinde belirgin bir sitotoksik etkisi olmayan, bunun yanında en etkin *in vitro* AChE inhibisyonuna sebep olan konsantrasyondur). Bitki ekstraktı uygulaması yapılmayan hücreler, kontrol olarak kullanılmıştır. Hücrelerdeki AChE aktivitesinin belirlenebilmesi için hücrelerden H₂O₂'nin hüresel AChE indüksiyonunun belirlenmesi başlığı altında bahsedildiği gibi (Bkn. 3.2.6) toplam protein izolasyonu yapılmış, daha sonra

toplam protein miktarları belirlenmiştir. Uygulama gruplarındaki AChE seviyeleri Ellman yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Schwartz ve diğerleri, 2007).

Bitki ekstralarının hüresel AChE inhibitör etkilerinin belirlenmesi

G. corniculatum ekstralarının fPC12 hücrelerinde H₂O₂ kaynaklı AChE indüksiyonunu inhibe edici özelliklerinin var olup olmadığının belirlenmesi için, fPC12 hücreleri önce H₂O₂, daha sonra bitki ekstraları ile muamele edilmiştir. Bitki ekstresi uygulanan gruplardaki AChE aktivitesinin H₂O₂ uygulamasına bağlı AChE indüksiyonuna göre azalıp azalmadığı kontrol edilmiştir.

6 kuyulu plaklar kollajen ile kaplandıktan sonra kuyulara 1×10^5 hücre/kuyu gelecek şekilde PC12 hücreleri ekilmiştir. Farklılaşmanın ardından fPC12 hücreleri, 100 μ M H₂O₂ ile 24 saat boyunca 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır (En etkin AChE indüksiyon etki gösteren ve H₂O₂ konsantrasyonu ve süresi olması nedeniyle). Ardından H₂O₂'li besiyeri çekilerek hücreler, 1000 μ g/mL olacak şekilde 2 mL besiyeri içinde çözünmüş bitki ekstraları ile 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Uygulama gruplarında toplam protein izolasyonu yapılmış, daha sonra Ellman yöntemi kullanılarak AChE seviyeleri belirlenmiştir (Bkn. H₂O₂'nin hüresel AChE indüksiyonunun belirlenmesi, 3.2.6) (Schwartz ve diğerleri, 2007).

Bitki ekstralarının hüresel AChE indüksiyonunu engelleyici etkisinin belirlenmesi

G. corniculatum ekstralarının fPC12 hücrelerinde H₂O₂ kaynaklı AChE indüksiyonunu engelleyici, etkisinin olup olmadığının belirlenmesi için, fPC12 hücreleri önce bitki ekstraları, daha sonra H₂O₂ ile muamele edilmiştir. Bitki ekstresi uygulanan gruplardaki AChE aktivitesinin H₂O₂ uygulamasına bağlı AChE indüksiyonuna göre daha düşük olup olmadığı kontrol edilmiştir.

6 kuyulu plaklar kollajen ile kaplandıktan sonra kuyulara 1×10^5 hücre/kuyu gelecek şekilde PC12 hücreleri ekilmiştir. Farklılaşmanın ardından fPC12 hücreleri öncelikle 1000 μ g/mL olacak şekilde 2 mL besiyeri içinde çözünmüş bitki ekstraları ile 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ardından besiyeri çekilerek hücrelere 24 saat boyunca 100 μ M H₂O₂ uygulaması yapılarak 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde 24 saat boyunca

inkübe edilmiştir. H₂O₂ ve bitki ekstraktı uygulaması yapılmayan hücreler, kontrol olarak kullanılmıştır. Uygulama gruplarında toplam protein izolasyonu yapılmış, daha sonra Ellman yöntemi kullanılarak AChE seviyeleri H₂O₂'nin hücrel AChE indüksiyonunun belirlenmesi başlığı altında belirtildiği gibi belirlenmiştir (Bkn. 3.2.6) (Schwartz ve diğerleri, 2007).

3.2.7. Bitki ekstrelerinin gen düzeyinde etkilerinin belirlenmesi

G. corniculatum kloroform, metanol ve su ekstrelerinin fPC12 hücrelerinin H₂O₂ kaynaklı AChE, Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 mRNA ekspresyon seviyesinde oluşan indüksiyonu inhibe edici, Bcl-2 mRNA ekspresyon seviyesinde oluşan inhibisyonu ise indükleyici anti-apoptotik ve anti-AChE etkilerinin olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır.

6 kuyulu plaklar kollajen ile kaplandıktan sonra kuyulara 1×10^5 hücre/kuyu gelecek şekilde PC12 hücreleri ekilmiştir. NGF uygulamasının ardından fPC12 hücreleri, 100 µM H₂O₂ içeren NGF'li besiyerinde ile 24 saat boyunca 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda H₂O₂'li besiyeri çekilerek hücreler, 100, 500 ve 1000 µg/mL olacak şekilde 2 mL NGF'li besiyeri içinde çözünmüş bitki ekstraktları ile 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. H₂O₂ ve bitki ekstraktı uygulaması yapılmadan, normal NGF'li hücre kültürü koşullarında büyütülen hücreler, kontrol olarak kullanılmıştır. Uygulamalar sonrasında PC12 hücrelerde AChE, Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 ve Bcl-2 genlerinin mRNA ifade düzeylerinin belirlenebilmesi için hücrelerinden total mRNA izolasyonu yapılmıştır (Xu, Ji ve Xu, 2006).

Gen ifadesi analizinin temel materyali olan ve sadece ifade edilen DNA dizisini içeren cDNA (komplementer DNA) eldesi için mRNA'dan cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA'lar kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) çalışmasında kullanılmıştır. Genlere özgü primerler, primerlere ve ürünlere ait baz çifti (bç) sayıları, NCBI Genbank'dan alınan referans sekanslar (NCBI Ref. Sek.) Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. qRT-PCR için kullanılan primerler ve özellikleri

Gen İsmi	Primer Dizileri		bç	Ürün (bç)
NCBI Ref. Sek.	5'	3'		
AChE	F CGCAGCAATACGTGAGCCTGAA		22	110
NM_172009.1		R TGTGGCGCTGAGCAATTTGGG	21	
Bax	F CTGCAGAGGATGATTGCTGA		20	207
NM_017059		R GAGGAAGTCCAGTGTCCAGC	20	
Kaspaz 3	F TGGCCCTGAAATACGAAG		18	210
NM_012922		R GGCAGTAGTCGCCTCTGA	18	
Kaspaz 9	F GGATCTGGACTGCGTCTCATCAA		23	190
NM_031632		R CCGAGACCTTGAACACAGAGAA	23	
Bcl-2	F ATCGCTCTGTGGATGACTGAGTAC		24	134
NM_031632		R AGAGACAGCCAGGAGAAATCAAAC	24	
GAPDH	F CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA		24	118
NM_032080		R GGCATGGACTGTGGTCATGA	20	

Gen ifadelerinin analizi kantitatif qRT-PCR tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. QRT-PCR yönteminin gerçekleştirilmesi için izlenen işlem basamakları şöyledir:

RNA izolasyonu

Hücrelerden total RNA izolasyonu, RNeasy Mini Kit (74104-Qiagen, ABD) kullanılarak yapılmıştır. RNA izolasyon aşamaları aşağıdaki gibidir;

Pellet halindeki hücrelerin her birine, 350 µL Buffer RLT (Lizis tamponu) + 3,5 µL β-merkaptotanol karışımı ve 350 µL % 70 etanol eklenmiştir. Daha sonra 700 µL'ye kadar örnek, toplama tüpü içine yerleştirilmiş kolona aktarılmıştır. Kolon 8000×g'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne akan kısım uzaklaştırılmıştır. 700 µL Buffer RW1 kolona aktarılmıştır. Kolon 8000×g'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne akan kısım uzaklaştırılmıştır. 500 µL RPE (yıkama solüsyonu) kolona aktarılmıştır. Kolon 8000×g'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne akan kısım uzaklaştırılmıştır. 500 µL RPE kolona aktarılmıştır. Kolon 8000×g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon yeni bir

2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Membranın kuruması için maksimum hızda 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Kolon yeni bir 1,5 mL'lik toplama tüpüne yerleştirilmiştir. 30-50 µL RNaz içermeyen su kolona ilave edilmiştir. 8000×g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne akan RNA'lar Epoch Take 3 Plate cihazı kullanılarak 260 ve 280 nm'de okutulmuştur. RNA miktarı ölçülecek, 260/280 absorbans değerleri 2,0'nin üzerinde olan örneklerle çalışmaya devam edilmiştir. İzole edilen RNA'lar kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır (Li ve diğerleri, 2000; Xue ve diğerleri, 2014; Lu ve diğerleri, 2007; Tedeschi ve diğerleri, 2009).

RNA derişimlerinin kontrolü

İzole edilen RNA'ların kalite ve kantite açısından değerlendirilmesi, Epo Take3 ELISA Reader cihazında absorbanslarının ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir. RNA'nın saflığı yani herhangi bir kontaminasyon kaynağı içermediğini anlamak için 260 ve 280 nm'deki absorbanslarının oranına bakılmaktadır. Saf RNA'da 260/280 absorbans değeri 1,8 ile 2,1 arasında olmalıdır. 260/280 absorbans değerinin 1,8'in altında veya 2,1'in üzerinde olması kontaminasyonunu işaret etmektedir (Kelly, Schimenti, Patrick Ross ve van der Meulen, 2014). Bu nedenle 1,8-2,1 aralığında derişime sahip RNA örnekleri ile deneylere devam edilmiştir.

RNA örneklerinden cDNA sentezi (Reverse transcription (RT) reaksiyonu)

RNA örneklerinden cDNA sentezi, QuantiTect Rev. Transcription Kit (205311- Qiagen, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Genomik DNA eliminasyonu reaksiyonu için gDNA eliminasyon tamponu (7X) her 1 µg'lık RNA örneğine eklenmiştir. Son hacim 14 µL olacak şekilde RNaz içermeyen su ilave edilmiştir. Tüpler 42 °C'de 2 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra tüpler buz üzerine alınmıştır. Çizelge 3.2'ye göre, buz üzerinde reverse-transripsiyon karışımı hazırlanmıştır:

Çizelge 3.2. Revers-trankripsiyon reaksiyon içeriği

Madde	Miktar
Reverse transkriptaz	1 µL
Reaksiyon tamponu, 5x	4 µL
Primer karışımı	1 µL

Elde edilen (14 µL) tamamlayıcı RNA, revers-transripsiyon karışımı içeren her bir tüpe eklenmiştir. Karıştırılmış ve buz üzerinde bekletilmiştir. Tüpler 42 °C’de 15 dakika ve 95 °C’de 3 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyon sonucunda 20 µL cDNA sentezlenmiştir. Sentezlenen cDNA’ların absorbans değerleri Epoch Take 3 Plate cihazı kullanılarak 260 ve 280 nm’de ölçülüp saflık dereceleri ve miktarları belirlenmiştir. 260/280 absorbans değeri 1,7-2,0 arasında olan örneklerle çalışmaya devam edilmiştir. cDNA örnekleri daha verimli kullanılmak amacıyla % 20 olacak şekilde dH₂O ile dilüe edilmiştir. Elde edilen cDNA’lar, qRT-PCR için kullanılmaya kadar -80 °C’de saklanmıştır (Li ve diğerleri, 2000; Xue ve diğerleri, 2014; Lu ve diğerleri, 2007; Tedeschi ve diğerleri, 2009).

cDNA derişimlerinin kontrolü

İzole edilen RNA’lardan sentezlenen cDNA’ların kalite ve kantite açısından değerlendirilmesi Epo Take3 ELISA Reader cihazında derişimlerinin ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir.

DNA’nın saflığı yani herhangi bir kontaminasyon kaynağı içermediğini anlamak için 260 ve 280 nm’deki absorbanslarının oranına bakılmaktadır. Saf DNA’da 260/280 absorbans değeri 1,7 ile 2,0 arasında olmalıdır. 260/280 absorbans değerinin 1,7’nin altında veya 2,0’ın üzerinde olması kontaminasyonu işaret etmektedir (Nedel, Conde, Oliveira, Tarquinio ve Demarco, 2009). Bu nedenle 1,7-2,0 aralığında derişime sahip cDNA örnekleri ile deneylere devam edilmiştir.

QRT-PCR reaksiyonu

cDNA’lar kalıp olarak kullanılarak, spesifik primerler aracılığıyla PCR reaksiyon koşulları oluşturulmuştur. PCR reaksiyonu, Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR System cihazında yapılmıştır. Bu çalışma için, SYBR Green PCR Kit (SensiFAST SYBR® Low-ROX Kit) (BIO94005- Bioline, ABD) kullanılmıştır. Deneylerde tüm cDNA örnekleri ve standart örnekler aynı şartlarda ve aynı grup içerisinde üçer kez çalışılarak analizlerde bu üç ölçümün ortalaması kullanılmıştır. qRT-PCR koşulları Çizelge 3.3’te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. QRT-PCR koşulları

Madde	Miktar (µL)
SYBR Green karışımı	10,0
Forward primer (10 pmol/ µL)	0,8
Reverse primer (10 pmol/ µL)	0,8
cDNA	2,0
ddH ₂ O	6,4

20 µL qRT-PCR reaksiyonu aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. QRT-PCR programı

Döngü	Sıcaklık (°C)	Süre	Aşama
1	95	2 dakika	Polimeraz aktivasyonu
40	95	5 saniye	Denatürasyon
	65	30 saniye	Bağlanma/Uzama

Gen ekspresyonunun nicelleştirilmesi için, her bir gen transkripti için, floresan sinyalinin eşik üzerine çıkması için yani arka plan seviyesini aşması için gerekli döngülerin sayısı olarak tanımlanan döngü eşiği (Ct) belirlenmiştir (Wong ve Medrano, 2005).

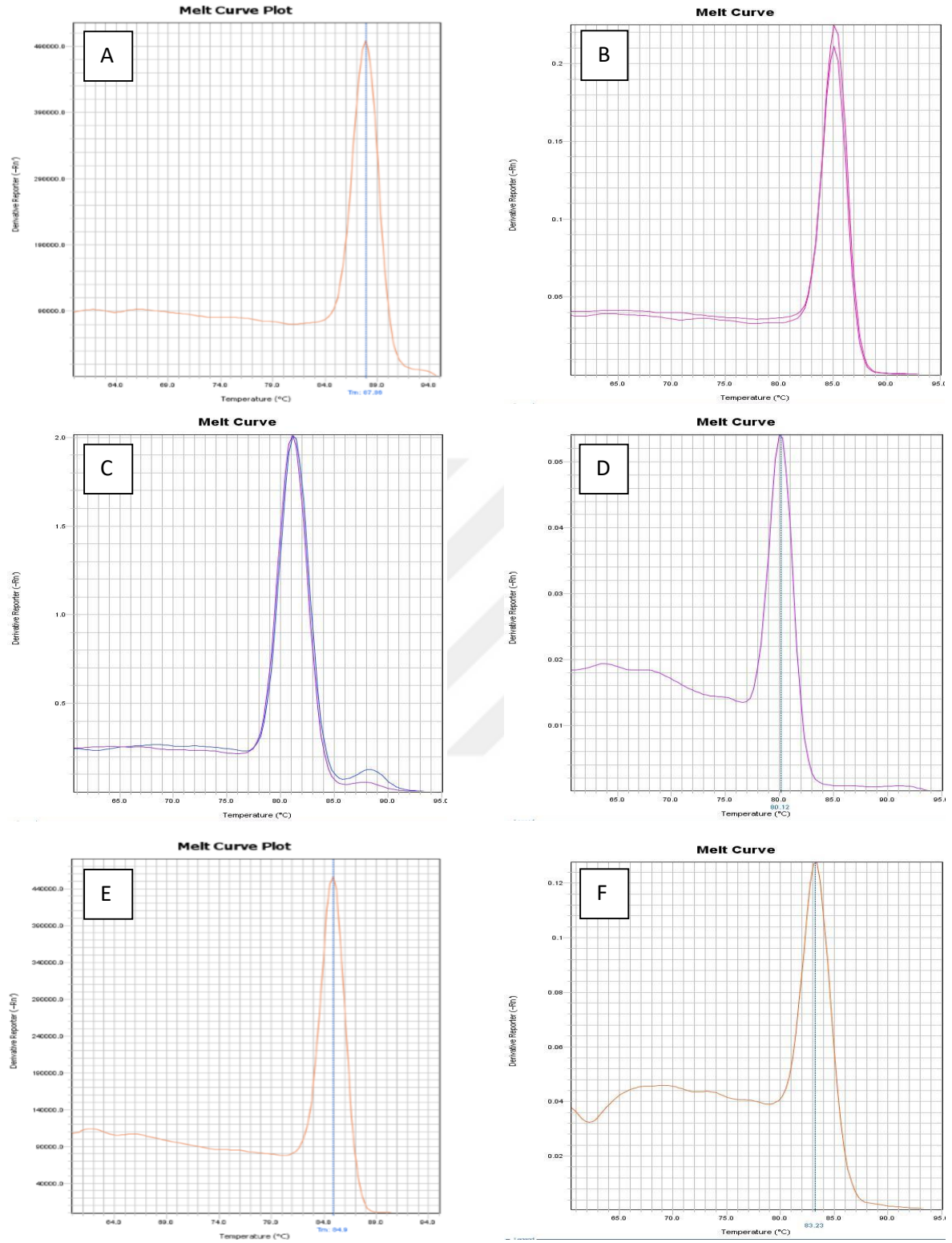
Floresans başlangıç sinyali ve eşik sinyali otomatik olarak PCR cihazı ile sayısal veri olarak belirlenmiştir. Transkript seviyeleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile hesaplanmıştır (Schmittgen ve Livak, 2008). Hesaplama, Microsoft Excel 2007'de gerçekleştirilmiştir. Normalizasyon amacıyla her hücrede aynı miktarda ifade edilen, zorunlu idare geni (housekeeping) GAPDH miktarı, PC12 hücrelerinde hedef genlerin ifade düzeyleri karşılaştırılarak incelenmiş ve hedef genin nispi ekspresyonu olarak tanımlanmıştır (Vandesompele ve diğerleri 2002; Pfaffl ve Hageleit, 2001):

$$\text{Nispi Ekspresyon} = 2^{-(\Delta Ct_{\text{örnek}} (\text{hedef-referans}) - \Delta Ct_{\text{kontrol}} (\text{hedef-referans}))};$$

$\Delta Ct_{\text{örnek}}$: Uygulama yapılmış örneklerde hedef genin Ct değerinin referans genin Ct değerine göre farkıdır (hedef Ct-referans Ct)

$\Delta Ct_{\text{kontrol}}$: Uygulama yapılmamış negatif kontrol örneklerinde hedef genin Ct değerinin referans genin Ct değerine göre farkıdır (hedef Ct-referans Ct)

Nispi ekspresyon değerlerinin ortalama ve standart sapması (SD) her bir uygulamanın üç tekrarından hesaplanmıştır. Kontrol grubu olarak uygulama yapılmamış fPC12 hücrelerinden izole edilen cDNA'lar kullanılmıştır. Kontrol grubundaki nispi ekspresyon değeri 1 olarak öngörölmüştür. $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerinin 1'den büyük olması gen ifadesinin arttığını, küçük olması ise gen ifadesinin azaldığını göstermiş, buna göre uygulamalarda gen ifadelerindeki artış ve azalışlar tespit edilmiştir. Primer dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin tespiti için melting curve (erime eğrisi) analizi yapılmıştır. İfadesi qRT-PCR yöntemiyle incelenen genlerin erime eğrileri Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan primerlerin erime sıcaklıkları; AChE için 88 °C, Bax için 85 °C, Kaspaz 3 için 81 °C, Kaspaz 9 için 80 °C, Bcl-2 için 84 °C ve GAPDH için 83 °C olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.3. Primerler ile hedef gen bölgelerinin erime eğrileri A: AChE B: Bax, C: Kaspaz 3, D: Kaspaz 9, E: Bcl-2, F: GAPDH

3.2.8. Bitki ekstralarının proteinler üzerinde etkilerinin western blot hibridizasyon ile belirlenmesi

G. corniculatum kloroform, metanol ve su ekstralarının fPC12 hücrelerinin H₂O₂ kaynaklı AChE, Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 protein seviyesinde oluşan indüksiyonu inhibe edici, Bcl-2 protein seviyesinde oluşan inhibisyonu ise indükleyici etkilerinin olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır.

Hücre uygulamaları 3.2.7’de (Bitki ekstralarının gen düzeyinde etkilerinin belirlenmesi) bahsedildiği gibi yapılmıştır. Hücrelerden toplam protein izolasyonu, H₂O₂’nin hücresel AChE indüksiyonunun belirlenmesi başlığında bahsedildiği gibi (Bkn. 3.2.6) yapılmıştır. Elde edilen proteinler denatüre edilmiş, % 4-12’lik Akrilamid bisakrilamid jelde yürütülmüş ve PVDF membrana transfer edilmiştir. Ardından nöral ölüm yollarında görevli olan AChE, Bax, Kaspaz 3, Kaspaz 9 ve Bcl-2 genlerinin protein ifadeleri uygun primer antikorlar ve sekonder antikorlar kullanılarak Western Blot hibridizasyon yöntemi ile belirlenmiştir. Normalizasyon amacıyla AChE, Bax, Kaspaz 3, Kaspaz 9 ve Bcl-2 hedef proteinlerin ifade düzeyleri her hücrede ifade edilen, zorunlu idare proteini (housekeeping) GAPDH ile karşılaştırılarak incelenmiş ve hedef proteinlerin düzeyleri uygulama yapılmamış kontrol gruplarına göre belirlenmiştir (Gong ve diğerleri, 2012).

Western blotlama, bir poliakrilamid jelinden bir nitroselüloz veya poliviniliden difluorid (PVDF) zarına elektroforezlenmiş protein bantlarının aktarılması ve bunların antikor problemleri ile saptanması anlamına gelir. Jel, bir nitroselüloz veya PVDF membranı ile temas ettirilir ve elektriksel akım vasıtasıyla proteinler, jelden membrana göç ettirilir. Memrandaki proteinler uygun primer ve sekonder boyalar ile boyandıktan sonra protein ifade düzeyleri belirlenebilir. Protein ifade düzeylerinin belirlenmesi için izlenen adımlar şöyledir.

Protein örneklerinin denatürasyonu

Protein örnekleri her kuyu başına 30 µg olacak biçimde % 5 β-mercaptoethanol içeren 1×yükleme tamponu (Laemmli tamponu) (1610737-Bio-Rad, ABD) ile karıştırılmış ve 90 °C’de 10 dakika bekletilerek denatüre edilmiştir.

Örneklerin jel kuyucuklarına yüklenmesi

Çalışmada kullanılan % 10'luk hazır bis-tris jel (Mini-PROTEAN TGX Gels, 10 gels/box, 12-well, 20 microliters, 10% resolving gel) (4561033- Bio-Rad, ABD), dikey elektroforez tankına yerleştirilerek sabitlenmiştir. Tankın içi 1×Tris/Glycine/SDS (1610732- Bio-Rad, ABD) yürütme tamponu ile doldurulduktan sonra protein örnekleri ve marker olarak kullanılan PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-170 kDa) (26616- Thermo Scientific, ABD), jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. Yürütme işlemi 150 voltda 35 dakikada (Mini Trans-Blot®Cell-Bio-Rad, ABD) gerçekleştirilmiştir.

Membrana Transfer

SDS jeldeki proteinlerin PVDF membrana transferi için Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kit, Mini, PVDF, for 40 Blots kit (1704272-Bio-Rad, ABD) kullanılmıştır. Trans-Blot Turbo Transfer System jel transfer cihazı kullanılarak proteinler jelden PVDF membrana aktarılmıştır.

Bloklama

Transfer işleminden sonra PVDF membran % 2'lik süt tozu ve % 0,1'lik tween-20 içeren 1×Tris-tamponlu tuzlu su (TBS) (1706435- Bio-Rad, ABD) çözeltisi içinde (bloklama solüsyonu) 30 dakika çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Membran 10 mL 3 kez 5'er dakika (3×5) % 0,1'lik tween-20 içeren 1×TBS ile yıkanmıştır.

Hibridizasyon

Primer antikorlar üretici firma talimatlarına göre 10 mL bloklama solüsyonunda dilue edilmiştir. Bloklanan PVDF membran, primer antikor içeren bloklama solüsyonunda oda ısısında 2 saat inkübe edilmiştir. Membran 10 mL 3 kez 5'er dakika (3×5) % 0,1'lik tween-20 içeren 1×TBS ile yıkanmıştır. Sekonder antikor, üretici firma talimatlarına göre 10 mL bloklama solüsyonunda dilue edilmiştir. PVDF membran, sekonder antikor içeren bloklama solüsyonunda oda ısısında 1 saat inkübe edilmiştir. Membran 20 mL steril dH₂O ile 2 dakika süreyle yıkanmıştır. Kullanılan antikor, dilüsyon oranları ve moleküler ağırlıkları Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Kromojenik boya ile muamele

Yıkamadan sonra membran 10 mL AP konjuge substrat kit (1706432-Bio-Rad, ABD) içinde membran üzerinde bantlar belirene kadar (yaklaşık olarak 60 dakika) çalkalayıcıda inkübe edilmiştir (Mahmood ve Yang, 2011). Membran üzerinde oluşan bantlar jel görüntüleme sisteminde (ChemiDoc™ XRS+ System-Bio-Rad, ABD) tespit edilmiştir. BIORAD ImageLab 5.21 programı kullanılarak bantların yoğunluğu belirlenmiştir.

Çizelge 3.5. Western blot hibridizasyon için kullanılan antikorlar, dilüsyon oranları ve moleküler ağırlıkları

Antikor Adı	Katalog Numarası	Üretici Firma	Dilüsyon Oranı	Molekül ağırlığı (kDa)
Anti-ACHE Acetylcholinesterase Picoband antibody	PB9417	Boster	1/1000	68
Anti-Caspase-3 antibody	ENT0656	Elabscience Biotechnology Inc.	1/500	37
Anti-Caspase-9 antibody	A00080	Boster	1/500	35-37
Anti-Bax Picoband antibody	A00183	Boster	1/1000	21
Bcl-2 Monoclonal antibody	E-AB- 22004	Elabscience Biotechnology Inc	1/1000	26
GAPDH antibody	10494-1AP	Proteintech	1/2000	36
Goat anti-rabbit IgG (H+L), AP conjugate secondary antibody	SA00002-2	Proteintech	1/1000	

3.2.9. İnflamasyonun ELISA ile belirlenmesi

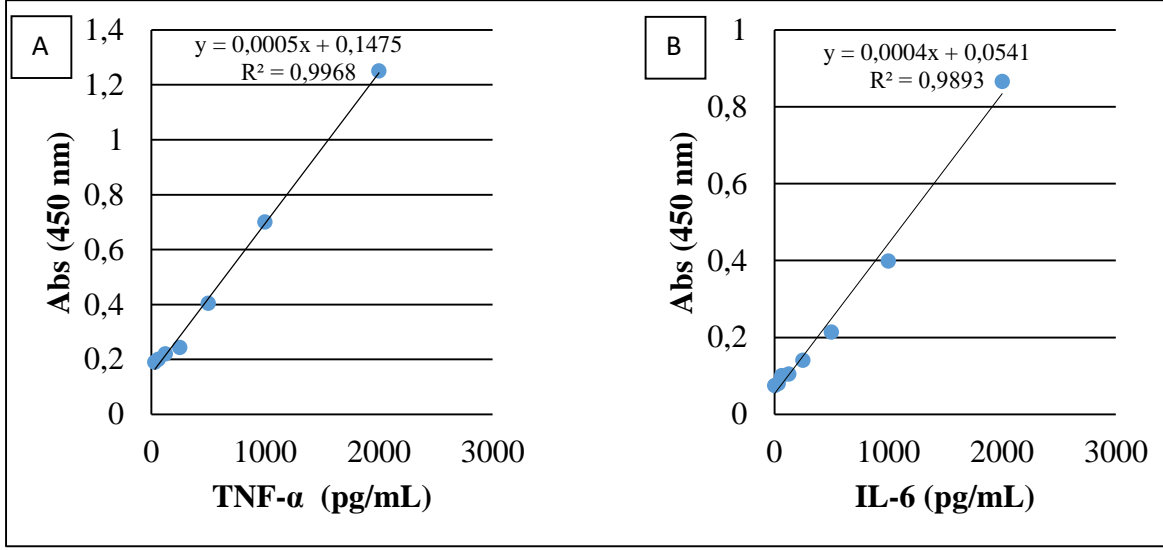
LPS'nin TNF- α indüksiyon etkisinin ELISA ile belirlenmesi

BV-2 hücrelerinde kontrole göre TNF- α indüksiyonuna sebep olan en etkin LPS konsantrasyon ve süresinin belirlenmesi amacıyla 6'lık kuyulardan oluşan plak içinde 1×10^5 hücre/kuyucuk yoğunluktaki BV-2 hücreler, 1 mL hücre kültürü besi yeri içinde çözülmüş 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5,10, 30 $\mu\text{g/mL}$ LPS (L2882- Sigma-Aldrich, ABD) ile 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde 24 saat muamele edilmiştir. LPS uygulaması yapılmadan, normal hücre kültürü

koşullarında büyütülen hücreler, negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Hücre üst sıvıları temiz bir tüpe alınarak sitokin seviyeleri ölçülene kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Dondurulmuş hücre üst sıvıları oda ısısında çözündürüldükten sonra sitokin seviyeleri, TNF-alpha Platinum (BMS607/3, eBioscience, ABD) ELISA kiti ile mikropilaka okuyucuda (Epoch Take 3 Plate reader) 450 nm'de okutularak belirlenmiştir (Morgan, Kim ve Liu, 2008). Örneklerdeki sitokin seviyeleri, kitin içinden çıkan standartların oluşturduğu eğri grafiğine göre hesaplanmıştır (Şekil 3.3 (A)).

Bitki ekstraktlarının TNF- α ve IL-6 seviyesine etkilerinin ELISA ile belirlenmesi

G. corniculatum kloroform, metanol ve su ekstraktlarının BV-2 hücrelerinde LPS kaynaklı TNF- α ve IL-6 sitokin artışını engelleyici anti-inflamatuar etkilerinin olup olmadığının belirlenebilmesi için, 6'lık kuyulardan oluşan plak içinde 1×10^5 hücre/kuyucuk yoğunluktaki BV-2 hücreler, 1 mL hücre kültürü besi yeri içinde çözünmüş 100-1000 $\mu\text{g/mL}$ bitki ekstraktları ile 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde 24 saat muamele edilmiştir. Ardından kuyulara 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS ilave edilerek plaka 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde 24 saat muamele edilmiştir. Bitki ekstraktı ve LPS uygulaması yapılmadan, normal hücre kültürü koşullarında büyütülen hücreler, negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Sadece LPS uygulaması yapılmış hücre grupları pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Hücre üst sıvıları temiz bir tüpe alınarak inflammatuar protein seviyelerinin belirlenebilmesi için -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Dondurulmuş hücre üst sıvıları oda ısısında çözündürüldükten sonra sitokin seviyeleri TNF-alpha Platinum (BMS607/3, eBioscience, ABD) ve Mouse IL-6 Platinum (BMS603/2-eBioscience, ABD) ELISA kitler ile mikropilaka okuyucuda (Epoch Take 3 Plate reader) 450 nm'de okutularak belirlenmiştir. Örneklerdeki sitokin seviyeleri, kitlerin içinden çıkan standartların oluşturduğu eğri grafiğine göre hesaplanmıştır (Şekil 3.3 (B)) (Morgan ve diğerleri, 2008).



Şekil 3.4. A: TNF- α standart eğrisi ve regresyon denklemi B: IL-6 standart eğrisi ve regresyon denklemi

3.3. İstatistiksel Analizlerin Yapılması ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Çalışma sonuçları SPSS 16.0 programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Tüm deneylerde uygulama gruplarının kontrol grubu ile arasındaki farklılık ve indüktör ile bitki ekstresi uygulamaları yapılan gruplar arasındaki farklılık, t-testi ile (Excel 2007) analiz edilmiştir. Ortalamalar arasındaki farklar, Tek Yönlü Anova Post Hoc Tukey HSD testi ile belirlenmiştir. Ekstrelerdeki bileşik miktarları ile AChE ve apoptoz baskılayıcı ve anti-inflamatuar etki arasında ilişki olup olmadığı Pearson korelasyonuna göre belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık % 95 önem düzeyinde, $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir. Tüm analizler tekrarlı ve paralelli (MTT (n:6), *in vitro* ve hüresel AChE aktivitesi ve TNF- α ve IL-6 aktivitesi (n:5), qRT-PCR (n:3)) olarak çalışılmış ve sonuçlar, ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verilmiştir.



4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Ekstre Verimine Ait Bulgular

Çalışmamızda 10 g kuru *G. corniculatum* bitkisinden kloroform, metanol ve su çözümleri ile elde edilen ekstre verimleri (g) ve buna göre bitkide elde edilen yüzde ekstre verimi belirlenmiştir. Ekstraksiyon veriminin metanol (% 49,0) > su (% 39,2) > kloroform (% 13,9) şeklinde olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *G. corniculatum* bitkisinden üç farklı çözücü ile elde edilen ekstre miktarı ve verimi

Çözücü	g ekstre/10 g kuru bitki	% Ekstre verimi
Kloroform	1,39	13,9
Metanol	4,90	49,0
Su	3,92	39,2

4.2. Ekstrelerdeki İçerik Analizine Ait Bulgular

4.2.1. Spektrofotometrik analiz

Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen 1 g ekstrede, toplam alkaloid, fenolik bileşik ve flavonoid miktarları spektrofotometrik yöntemle mg cinsinden belirlenmiştir.

Ekstrelerdeki majör sekonder metabolitin alkaloid olduğu, flavonoid ve fenolik bileşik miktarlarının ise alkaloide kıyasla çok düşük olduğu tespit edilmiştir. Ekstrelerdeki alkaloid miktarları metanol ($112 \pm 0,04$ mg/g ekstre) > kloroform ($109 \pm 0,04$ mg/g ekstre) > su ($93 \pm 0,03$ mg/g ekstre) şeklinde olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. *G. corniculatum* bitkisinden üç farklı çözücü ile elde edilen ekstrelerde toplam alkaloid, flavonoid ve fenolik bileşik miktarı (mg/g ekstre)

Çözücü	Alkaloid	Flavonoid	Fenolik bileşik
Kloroform	$109 \pm 0,04$	$0,95 \pm 0,02$	$1,45 \pm 0,02$
Metanol	$112 \pm 0,04$	$0,71 \pm 0,02$	$1,70 \pm 0,03$
Su	$93 \pm 0,03$	$1,55 \pm 0,03$	$1,65 \pm 0,05$

4.2.2. GC-MS ve HPLC analizi

Ekstrelerdeki biyoaktif bileşenlerin GC-MS ile tayinine ilişkin verilerde, her üç ekstrede de majör bileşiğin alkaloid olduğu saptanmıştır. Ekstrelerde yağ asidi, alkan hidrokarbon ve alkol gibi alkaloid harici bileşikler de tespit edilmiştir. Kloroform ekstresinde % 9,8 yağ asidi, % 80,5 alkaloid tespit edilmiş; majör yağ asidi linoleik asit (% 3,7), majör alkaloid ise allokriptopin (% 35,7) olarak belirlenmiştir. Metanol ekstresinde % 15,8 yağ asidi, % 4,4 alkan hidrokarbon ve % 79,8 alkaloid belirlenmiştir. İçerikteki majör yağ asidi 2-Monopalmitin (% 9,4), majör alkaloid ise allokriptopindir (% 51,6). Su ekstresinde % 4,8 alkol, % 7,5 yağ asidi ve % 87,7 alkaloid saptanmıştır. Su ekstresindeki tek yağ asidi oleamid, tek alkol ise bütül hidroksi toluendir. Majör bileşik ise allokriptopindir (% 48,4) (Çizelge 4.3).

Ekstrelerdeki biyoaktif bileşenlerin HPLC ile tayinine ilişkin verilerde, rutin ve kuersetin flavonoidlerinin her üç ekstrede, luteolin flavonoidinin ise kloroform ve su ekstresinde bulunduğu belirlenmiştir. Rutinin her üç ekstrede de majör flavonoid olduğu ve en yüksek metanol ekstresinde bulunduğu belirlenmiştir. HPLC ile yapılan flavonoid analizlerine ait verilerin bir kısmı daha önce yapılan Kocanci ve diğerleri (2017)'nin çalışmasından alınmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. *G. corniculatum* total kloroform, methanol ve su ekstrlerinde biyoaktif bileşik analizi

Bileşik	Sinonim	Analiz Tipi	Ekstrelerdeki Bileşik Miktarları		
			Kloroform	Metanol	Su
Alkaloid (%)					
• 6H-Dibenzo[a,g]quinolizine, 5,8,13,13a-tetrahydro-2,3,9,10-tetramethoxy-, (n̄)-	Tetrahydropalmitine	GC-MS	18,7	13,0	13,1
• Tetrahydroberberine N-oxide	4H-Berberine N-oxide		26,1	15,2	26,2
• [1,3]Benzodioxolo[5,6-e][2]benzazecin-14(6H)-one, 5,7,8,15-tetrahydro-3,4-dimethoxy-6-methyl	Allocriptopine		35,7	51,6	48,4

Çizelge 4.3. (devam) *G. corniculatum* total kloroform, metanol ve su ekstralarında biyoaktif bileşik analizi

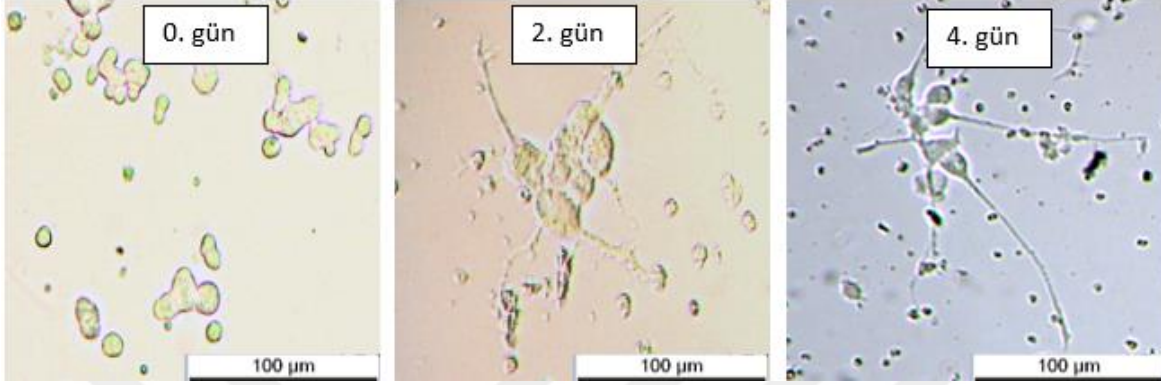
Yağ asidi (%)		GC-MS		
• n-Hexadecanoic acid	Palmitic acid	1,8	-	-
• 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	Linoleic acid	3,7	2,0	-
• Linoleic acid ethyl ester	Ethyl linoleate	1,9	-	-
• Hexadecanoic acid, 1-(hydroxymethyl)-1,2-ethanediyl ester	1,2-Dipalmitin	2,4	-	-
• Hexadecanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester (CAS)	1-Monopalmitin	-	1,6	-
• 8,11-Octadecadienoic acid, methyl ester		-	2,8	-
• Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester	2-Monopalmitin		9,4	
• 9-Octadecenamide, (Z)-	Oleamide	-	-	7,5
Alkan hidrokarbon (%)		GC-MS		
• 1H-Indene, 1-hexadecyl-2,3-dihydro- (CAS)	1-n-Hexadecylindan	-	4,4	-
Alkol (%)		GC-MS		
• Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl- (CAS))	Butylated hydroxytoluene	-	-	4,8
Flavonoid (µg/mL)		HPLC		
• Rutin		34	45 ^a	41 ^a
• Quercetin		3	12 ^a	10 ^a
• Luteolin		6	-	0,2 ^a

^a Kocanci, Hamamcioglu ve Aslim, 2017.

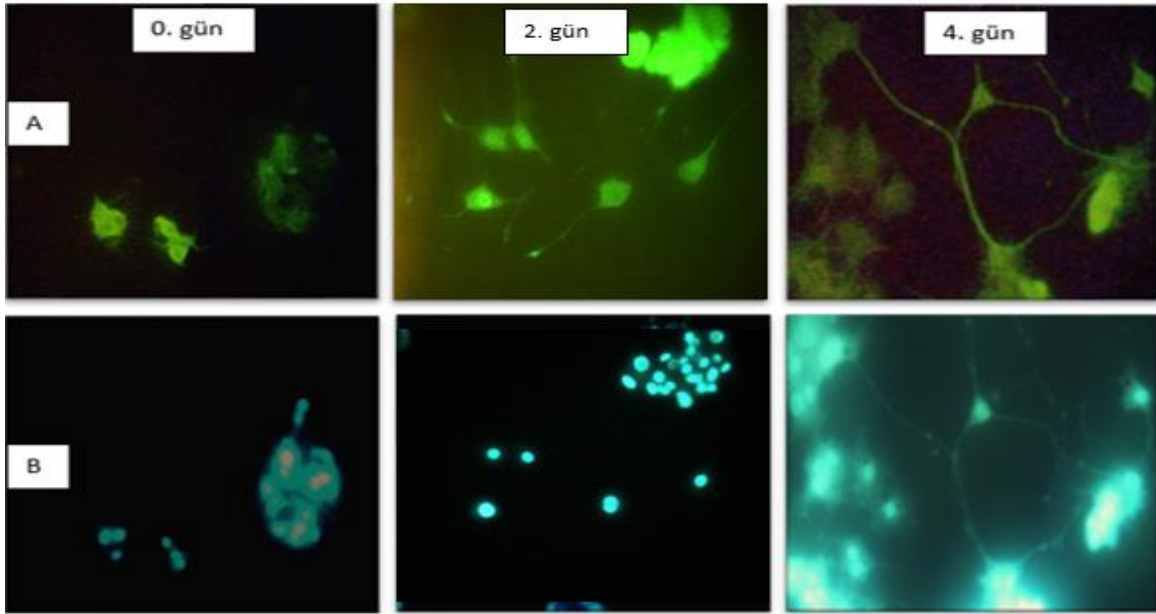
4.3. PC12 Hücrelerinin Farklılaşma Kontrolü

PC12 hücrelerinin NGF varlığında nörit boyu değişimleri ışık mikroskobu (Resim 4.1) ve floresan mikroskobunda (Resim 4.2) incelenmiştir. Floresan mikroskobu incelemelerinde hoechst boyaması ile hücre çekirdekleri mavi renkte, fluoresan izotiyosiyonat (FITC) boyaması ile hücre gövdeleri yeşil renkte işaretlenmiştir. Akson uzunlukları hücre gövdesinin en az iki katı olduğunda hücreler farklılaşmış sayılmıştır. Ortalama 100 hücrede yapılan nörit boyu analizlerine göre, PC12 hücrelerinin nörit uzunluklarının farklılaşma sürelerine paralel olarak artışı istatistiksel yönden anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). 2. günde

farklılaşmanın % 78, 4. günde ise % 100 olarak tespit edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda 4. günde farklılaşmanın gerçekleştiği görülmüştür. Tüm deneysel çalışmalarda 100 ng/mL NGF ile 4 gün farklılaştırmış PC12 hücreleri kullanılmıştır.



Resim 4.1. NGF ile uyarılmış PC12 hücrelerinde nörit farklılaşmasının ışık mikroskop görüntüleri (40X büyütme)



Resim 4.2. NGF ile uyarılmış PC12 hücrelerinde nörit farklılaşmasının floresan mikroskop görüntüleri (A: Fluoresan izotiyosiyonat (FITC), hücre gövdesi boyaması; B: HOECHST, hücre çekirdeği boyaması, 40X büyütme)

4.4. Farklı H₂O₂ Konsantrasyonlarının PC12 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Bu deneyde, PC12 hücreleri üzerinde yüksek sitotoksik etki göstermeyecek, ancak, oksidatif strese bağlı nörodejenerasyon belirleçlerinde artışa sebep olacak etkin H₂O₂ konsantrasyonları ve uygulama süreleri belirlenmeye çalışılmıştır. H₂O₂'nin 50, 100, 250,

500 ve 1000 μM konsantrasyonları 6, 12, 24 ve 48 saat süre ile PC12 hücrelerine uygulanmış ve H_2O_2 'nin hücre canlılığı üzerine sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile belirlenmiştir.

Hücre sağkalımındaki azalmaların H_2O_2 konsantrasyon ve süresi ile doğru orantılı şekilde PC12 hücre sağkalımında azalma olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen sitotoksik etki sonuçlarına göre, tüm uygulamaların PC12 hücre canlılığında kontrole göre 0,05 düzeyinde anlamlı bir azalmaya sebep olduğu saptanmıştır ($*p<0,05$). 200 μM ve üzerinde H_2O_2 uygulanan tüm sürelerde PC12 hücrelerinde % 50'den fazla ölüm gerçekleştiği gözlenmiştir. Aynı şekilde, 48 saatlik H_2O_2 uygulamalarında yüksek oranda ölüm (% 50'nin üzerinde) belirlenmiştir (50 μM konsantrasyon uygulaması hariç) (Çizelge 4.4). 100 μM H_2O_2 'nin 48 saatlik uygulaması hariç 50 ve 100 μM konsantrasyonlarının ise % 30-40 oranında PC12 hücre ölümüne sebep olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle AChE indüksiyonunda en etkin konsantrasyonun belirlenebilmesi için bundan sonraki çalışmalara yüksek ölümün gözlenmediği 50 ve 100 μM H_2O_2 konsantrasyonlarının 24 saatlik uygulamaları ile devam edilmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyon ve sürelerde H_2O_2 uygulanmış PC12 hücrelerinin kontrole göre yüzde hücre canlılıkları

Uygulamalar	% Hücre Canlılığı*			
	6 saat	12 saat	24 saat	48 saat
Kontrol ^a	100±2	100±2	100±4	100±3
H_2O_2 (μM) ^b				
50	70±3	65±5	63±5	53±2
100	65±1	63±5	60±3	33±4
200	41±2	38±3	33±4	25±2
500	39±1	35±3	30±2	20±0
1000	36±2	33±3	20±4	15±5

^a Herhangi bir uygulama yapılmamış PC12 hücreleri.

^b Farklı konsantrasyonlarda H_2O_2 uygulanmış PC12 hücreleri. Sonuçlar, ortalama±SD olarak verilmiştir, (*: $p<0,05$), (n:6).

4.5. Bitki Ekstrelerinin PC12 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Bu çalışmada, *G. corniculatum* bitkisinin kloroform, metanol ve su ekstralarının 100, 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonları 4, 10 ve 24 saat süre ile PC12 hücrelerine uygulanmış ekstraların, hücreler üzerindeki toksisitesi ve toksik olmayan etkin konsantrasyonları MTT yöntemi ile tespit edilmeye çalışılmıştır.

Uygulanan üç ekstraktın artan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir. Ekstraktların hücre ölümüne ilişkin sonuçlarının kısmen birbirine benzerlik gösterdiği, ancak, su ekstresinin sebep olduğu hücre ölümünün diğer ekstralere göre daha fazla olduğu dikkati çekmiştir. Hücrelerde % 50 canlılık kaybına sebep olan ekstre konsantrasyonları (IC50) kloroform ekstresinde 1616, metanol ekstresinde 1196 ve su ekstresinde 1103 µg/mL olarak belirlenmiştir.

100 µg/mL'lik kloroform ekstresinin 4 ve 10 saatlik uygulamalarının PC12 hücre canlılığında sebep olduğu etkinin, kontrol grubuna göre farklılık göstermediği saptanmıştır ($p>0,05$). Öte yandan, 100 µg/mL konsantrasyonun 24 saatlik uygulamasının PC12 hücre canlılığında sebep olduğu azalmanın kontrol grubuna göre farklı olduğu belirlenmiştir ($*p<0,05$). Metanol ve su ekstresinin ise tüm konsantrasyon ve sürelerde PC12 hücre canlılığında sebep olduğu azalma kontrole göre anlamlı bulunmuştur ($*p<0,05$). Ayrıca, 250 ve 500 µg/mL konsantrasyon grupları arasında anlamlı bir farkın olmadığı ($p>0,05$), 100, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyon grupları arasında ise anlamlı bir farkın olduğu belirlenmiştir ($*p<0,05$). Tüm ekstralarda 1000 µg/mL'lik konsantrasyonun 24 saatlik uygulaması, hücre canlılığını en fazla azaltan uygulama olmuştur: 1000 µg/mL 24 saatte kloroform, metanol ve su ekstralarının PC12 hücre canlılık oranları sırasıyla % 68 ± 3 , 56 ± 8 ve 57 ± 4 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Bu sonuçlara göre, bitki ekstralarının uygulanan en yüksek konsantrasyon ve sürede dahi hücre canlılığını % 50'nin üzerinde azaltmadığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde (saat) *G. corniculatum* ekstralarının PC12 hücre canlılığına etkileri

Uygulamalar	Konsantrasyonlar ($\mu\text{g/mL}$)	% Hücre Canlılığı			IC50 ($\mu\text{g/mL}$)
		4 saat	10 saat	24 saat	
Kontrol ^a		100 \pm 5	100 \pm 3	100 \pm 6	
Kloroform	100	98 \pm 5	95 \pm 7	94 \pm 3*	1616
	250	90 \pm 5*	88 \pm 5*	85 \pm 2*	
	500	88 \pm 4*	85 \pm 4*	78 \pm 5*	
	1000	82 \pm 6*	75 \pm 2*	68 \pm 3*	
Metanol	100	94 \pm 9*	94 \pm 4*	93 \pm 3*	1196
	250	93 \pm 4*	87 \pm 6*	86 \pm 0*	
	500	89 \pm 3*	83 \pm 11*	83 \pm 4*	
	1000	72 \pm 7*	62 \pm 6*	56 \pm 8*	
Su	100	90 \pm 8*	90 \pm 10*	89 \pm 3*	1103
	250	82 \pm 6*	77 \pm 3*	77 \pm 2*	
	500	82 \pm 4*	70 \pm 2*	63 \pm 8*	
	1000	68 \pm 4*	64 \pm 4*	57 \pm 4*	

^a Herhangi bir uygulama yapılmamış PC12 hücreleri. Sonuçlar, ortalama \pm SD olarak verilmiştir (*: $p<0,05$), (n:6).

4.6. H₂O₂'nin ve Bitki Ekstrelerinin Birlikte PC12 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Bu deneyde, H₂O₂ ile birlikte uygulanan *G. corniculatum* kloroform, metanol ve su ekstralarının PC12 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin olup olmadığı ortaya konulmaya çalışılmıştır. 100 μM H₂O₂'nin 10 ve 24 saat süre ile muamelesinin ardından, PC12 hücreleri 10 ve 24 saat 100, 250, 500 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ *G. corniculatum* ekstraları ile inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı, MTT yöntemi ile belirlenmiş, sonuçlar Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

100 μM H₂O₂ ile muamele edilen PC12 hücrelerinde hücre canlılığı 10 saatte % 65 \pm 6; 24 saatte % 62 \pm 3 olarak belirlenmiştir. H₂O₂'nin 10 ve 24 saatlerde sebep olduğu hücre

canlılığındaki azalma arasında istatistiksel olarak fark olmadığı ($p>0,05$), fakat, her iki sürede de kontrole göre farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($*p<0,05$).

10 saatlik ekstre uygulamalarında, H_2O_2 'nin ardından uygulanan kloroform ekstresinin tüm konsantrasyonlarının, metanol ve su ekstrlerinin ise 100, 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarının uygulandığı hücre gruplarında sağkalımın, yalnızca H_2O_2 uygulanan gruba göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($\#p<0,05$). H_2O_2 'nin ardından uygulanan 10 saatlik uygulamalarında ise 1000 $\mu\text{g/mL}$ dışındaki tüm konsantrasyonların istatistiksel olarak anlamlı şekilde H_2O_2 hasarını giderici etkisinin olduğu belirlenmiştir ($\#p<0,05$).

24 saatlik ekstre uygulamalarda, H_2O_2 'nin ardından 100 ve 250 $\mu\text{g/mL}$ 'lik kloroform ve su ekstrlerinin uygulandığı hücre gruplarında sağkalımın, yalnızca H_2O_2 uygulanan gruba göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($\#p<0,05$). H_2O_2 'nin ardından uygulanan metanol ekstresinin 24 saatlik uygulamasında ise, 1000 $\mu\text{g/mL}$ dışındaki tüm konsantrasyonların istatistiksel olarak anlamlı şekilde H_2O_2 hasarını giderici etkisinin olduğu bulunmuştur ($\#p<0,05$). Bu sonuçlar, tüm ekstrlerinin 100 ve 250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarının PC12 hücre canlılığı üzerinde H_2O_2 'nin sebep olduğu hasarı giderici etkisinin olduğunun göstergesidir. 10 ve 24 saatlik ekstre uygulamalarında 100 ve 250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarının sebep olduğu hücre ölümü arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yok iken ($p>0,05$), 500 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonları arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$).

Sonuçlar, kloroform ekstresi için 100-500 $\mu\text{g/mL}$, metanol ve su ekstresi için ise 100 ve 250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarının, PC12 hücreleri üzerinde H_2O_2 kaynaklı hücre ölümünü baskıladığını göstermektedir. H_2O_2 ile birlikte yüksek konsantrasyonlarda uygulanan bitki ekstrlerinin ise, H_2O_2 kaynaklı hücre ölümünü baskılayıcı etki göstermediği tespit edilmiştir.

H_2O_2 ile birlikte uygulanan bitki ekstrlerinin, uygulanan en yüksek konsantrasyon ve sürede bile hücre canlılığını %50'nin üzerinde azaltmadığı kanıtlanmıştır. Bu sonuçlara göre, bundan sonraki çalışmalarda oluşturulacak nörodejeneratif PC12 hücre modelinde bitki ekstrlerinin 100-1000 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişen konsantrasyonlarının denenmesi kararlaştırılmıştır.

Çizelge 4.6. H₂O₂ ve *G. corniculatum* ekstraktlarının PC12 hücre canlılığı üzerine konsantrasyon ve süreye bağlı etkileri

Uygulamalar	% Hücre Canlılığı		
	10 saat	24 saat	
Kontrol ^a	100±4	100±6	
H ₂ O ₂ (100 µM) ^b	65±6*	62±3*	
H ₂ O ₂ ve kloroform ekstresi ^c	Konsantrasyonlar (µg/mL)		
	100	85±8 [#]	82±5 [#]
	250	82±2 [#]	80±8 [#]
	500	78±5 [#]	54±3
	1000	71±3 [#]	53±3
H ₂ O ₂ ve metanol ekstresi ^c	100	92±6 [#]	90±4 [#]
	250	86±2 [#]	84±3 [#]
	500	75±2 [#]	66±3 [#]
	1000	61±6	51±6
	H ₂ O ₂ ve su ekstresi ^c	100	85±6 [#]
250		75±7 [#]	71±6 [#]
500		75±5 [#]	61±6
1000		57±5	56±2

^a Herhangi bir uygulama yapılmamış PC12 hücreleri.

^b 10 ve 24 saat süre ile 100 µM H₂O₂ uygulanmış PC12 hücreleri.

^c 10 ve 24 saat süre ile 100 µM H₂O₂ uygulamasının ardından bitki ekstraktları uygulanmış PC12 hücreleri. Sonuçlar, ortalama±SD olarak verilmiştir (*: Kontrolle göre $p<0,05$) ([#]: H₂O₂ grubuna göre $p<0,05$) (n:6).

4.7. Bitki ekstraktlarının *In Vitro* Asetilkolinesteraz (AChE) İnhibitör Etkisi

G. corniculatum kloroform, metanol ve su ekstraktlarının 100, 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarının AChE-i etkileri Ellman metoduna göre incelenmiştir. Çalışmada, pozitif kontrol olarak Amerikan İlaç Dairesi (FDA) onaylı AChE-i olan galantamin kullanılmış, ekstraktların galantamin ile mukayeseli olarak AChE-i etkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Sonuçlar, Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Uygulanan tüm ekstre konsantrasyonları, nöral ölüm etkenlerinden olan AChE üzerinde inhibitör etki göstermiştir. Tüm ekstraktların artan konsantrasyona göre AChE’yi inhibe ettiği belirlenmişken, maksimum AChE inhibisyonu metanol ekstresinin 1000 µg/mL’lik

konsantrasyonunda tespit edilmiştir (% 90). Bunu % 89 ile su ekstresi ve % 72 ile kloroform ekstresi izlemiştir. 100, 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda metanol ekstresinin kloroform ve su ekstresine göre daha etkin bir AChE-i özellik gösterdiği belirlenmiştir. 1000 µg/mL konsantrasyonda ise metanol ve su ekstresinin birbirine yakın etki gösterdiği ve her iki ekstrenin de kloroforma kıyasla daha yüksek AChE inhibisyonu gösterdiği belirlenmiştir. Metanol ve su ekstrelerinin 1000 µg/mL konsantrasyonda pozitif kontrol olarak kullanılan ve FDA tarafından onaylı AChE-i olan galantamine yakın bir AChE-i etkisinin varlığı dikkati çekmiştir.

100, 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonda ekstrelerin AChE-i etkileri istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmuştur ($p < 0,05$). 100, 250 ve 500 µg/mL'de en iyi etkiyi metanol ekstresi göstermiştir. 1000 µg/mL konsantrasyonda, metanol ve su ekstrelerinin AChE-i aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemişken ($p > 0,05$), her iki ekstrenin kloroform ekstresine göre daha etkin olduğu istatistiksel olarak doğrulanmıştır.

Ekstrelerdeki *in vitro* AChE-i özelliğın, alkaloid miktarları ile doğrusal ilişki gösterdiği korelasyon analizi ile belirlenmiştir ($r=0,3$). Yine korelasyon analizine ait veriler, ekstrelerin allokriptopin, rutin ve kuersetin miktarları ile *in vitro* AChE-i özellikleri arasında pozitif yönde bir ilişkinin olduğunu göstermiştir ($r=0,9$).

Çizelge 4.7. *G. corniculatum* ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarda *in vitro* % AChE inhibisyonları

Uygulamalar	% AChE İnhibisyonu			
	100 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL
Kloroform ekstresi	23±1	47±2	54±1	72±1
Metanol ekstresi	59±0	72±0	77±1	90±0
Su ekstresi	52±1	60±1	68±1	89±0
Galantamin ^a	88±0	88±0	92±0	93±0

^a Pozitif kontrol; Bitkisel AChE inhibitörü galantamin. Sonuçlar, ortalama±SD olarak verilmiştir (n:5).

4.8. Hücresel AChE'nin H₂O₂ ile İndüksiyonu

Bu deneyde oluşturulacak fPC12 hücre modelinde; AChE seviyesini indükleyici en etkin H₂O₂ konsantrasyon ve süresi belirlenmeye çalışılmıştır. fPC12 hücrelerine 50 ve 100 µM H₂O₂ 6, 12, 24 ve 48 saat uygulanmış ve hücrelerdeki AChE aktivitesi, H₂O₂ uygulaması

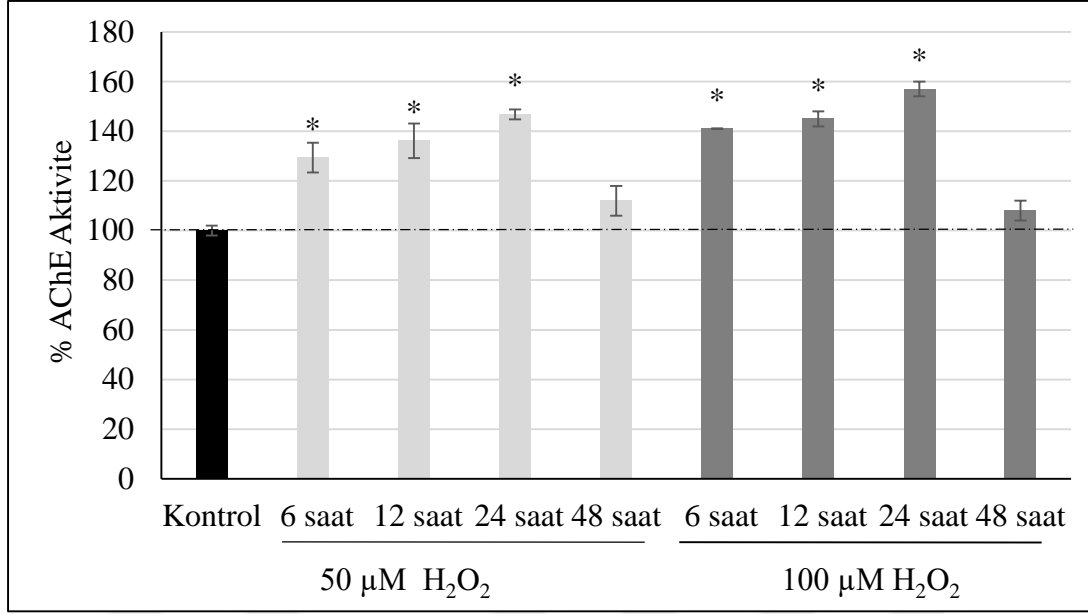
yapılmamış hücre grubuna (kontrol) göre değerlendirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

H₂O₂'nin 50 ve 100 µM'lık konsantrasyonlarının hücresel AChE indüksiyon etkisinde önemli bir fark gözlenmemiş olmakla birlikte, 100 µM H₂O₂ uygulamasının AChE'yi daha iyi indüklediği ve bu indüksiyonun artan uygulama süresi ile orantılı olduğu belirlenmiştir (48 saat inkübasyon süresi denenen hücrelerin sonuçları hariç). fPC12 hücrelerine 48 saat H₂O₂ uygulamasında AChE indüksiyonunda diğer inkübasyon sürelerine göre (6, 12, 24 saat) azalma saptanmıştır. Bu durumun, uzun süre H₂O₂ inkübasyonuna bağlı hücre ölümünden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Hem 50 hem de 100 µM H₂O₂ uygulamaları için fPC12 hücrelerinde kontrole göre AChE artışının en yüksek olduğu uygulama süresi 24 saat olarak belirlenmiş olup, sırasıyla % 147±2 ve 157±3 AChE aktivitesi tespit edilmiştir.

100 µM'lık H₂O₂'nin 6, 12 ve 24 saatlik uygulamaları değerlendirildiğinde 24 saatlik uygulamanın 6 ve 12 saatlik uygulamaya göre farkının yapılan tek yönlü varyans analizi ile 0,01 düzeyinde anlamlı olduğu belirlenmiştir. Kontrole göre en yüksek AChE indüksiyonunun, 100 µM H₂O₂ ile 24 saat uygulaması tarafından sağlandığı istatistiksel olarak da doğrulanmıştır. 6, 12 ve 24 saatlik uygulamalarda, süre artışı ile doğru orantılı olarak, AChE seviyesinde kontrole göre artış, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (* $p < 0,05$). Her iki konsantrasyonda da 48 saatlik uygulamaların ise, kontrole göre AChE aktivitesinde belirgin bir farklılığa sebep olmadığı belirlenmiştir ($p > 0,05$).

Yapılan tüm denemelerde en yüksek AChE indüksiyonu 24 saat 100 µM'lık H₂O₂'nin uygulandığı fPC12 hücrelerinde belirlendiğinden, bundan sonraki çalışmalara bu konsantrasyon ve süre H₂O₂ ile devam edilmiştir.



Şekil 4.1. 6, 12, 24 ve 48 saat 50 ve 100 µM H₂O₂ uygulanmış fPC12 hücrelerinde kontrole göre % AChE aktivitesi (*: Kontrole göre $p < 0,05$)

4.9. Bitki Ekstraktlarının fPC12 Hücresel AChE Seviyesine Etkisi

Bu çalışmada, bitki ekstraktlarının fPC12 hücrelerinin AChE aktivitesi üzerinde sırasıyla tek başlarına, H₂O₂'nin ardından ve H₂O₂'nin öncesinde fPC12 hücrelerine uygulanmış ve etkilerin hücresel AChE aktivitesi üzerine etkileri test edilmiştir. Bitki ekstraktlarının tek başlarına fPC12 hücrelerine uygulanması ile hücresel AChE indükleyici etkilerinin olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Ekstrelerin H₂O₂'nin ardından uygulaması ile H₂O₂'ye bağlı hücresel AChE indüksiyonunu inhibe edici etkilerinin; H₂O₂'nin öncesinde uygulaması ile H₂O₂'ye bağlı hücresel AChE indüksiyonunu engelleyici etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

4.9.1. Bitki ekstraktlarının hücresel AChE indükleyici etkisi

Bitki ekstraktlarının fPC12 hücrelerinde AChE indüksiyonu yoluyla nörodejeneratif etkilerinin olup olmadığının gösterilebilmesi için, 24 saat 1000 µg/mL bitki ekstraktları ile muamele edilen hücrelerin AChE aktivitesi uygulama yapılmamış kontrol grubuna göre değerlendirilmiş, sonuçlar Şekil 4.2'de gösterilmiştir. *G. corniculatum* ekstresi uygulanan gruplarda kontrole göre AChE aktivitesinin indüklenmediği tespit edilmiştir. Tüm ekstre uygulamalarında AChE aktivitesinin kontrole göre azaldığı saptanmıştır. Yapılan tek yönlü varyans analizinde kloroform ve su ekstresi uygulanan gruplar arasında % AChE aktivitesi

bakımından anlamlı bir fark olmadığı ($p>0,05$), fakat metanol ekstresinin H_2O_2 grubuna göre AChE aktivitesinin azaltılmasında, kloroform ve su ekstresine göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir ($p<0,01$). Bu etki aynı zamanda, ekstrelerin PC12 hücre canlılığında sebep olduğu azalma ile ilişkilidir. Her üç ekstrenin de hücresel AChE artışına sebep olmaması, *G. corniculatum* ekstrelerinin AChE indüksiyonuna bağlı nöral ölüme yol açmayacak güvenli bitkisel bir ajan olabileceğini göstermiştir.

4.9.2. Bitki ekstraktlarının hücresel AChE inhibitör etkisi

Bitki ekstrelerinin fPC12 hücrelerinde H_2O_2 kaynaklı AChE indüksiyonunu inhibe edici etkilerinin belirlenmesi için, fPC12 hücreleri 24 saat $100 \mu M H_2O_2$ uygulanmasının ardından (AChE indüksiyonunda en etkin H_2O_2 uygulanmasının $100 \mu M$ 24 saat olması sebebi ile), 24 saat boyunca $1000 \mu g/mL$ kloroform, metanol ve su ekstresi ile (*in vitro* AChE inhibisyonunda en etkin ekstre uygulamasının $1000 \mu g/mL$ 24 saat olarak belirlenmiş olması sebebi ile) muamele edilmiştir. Hücrelerdeki AChE aktivitesi H_2O_2 ve bitki ekstresi uygulaması yapılmamış kontrol grubuna göre değerlendirilmiştir. Ekstrelerin fPC12 hücrelerinde H_2O_2 kaynaklı AChE indüksiyonunu giderici etkileri incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

H_2O_2 ile uyarılmış fPC12 hücrelerinde AChE aktivite düzeyleri kontrol grubuna göre yaklaşık % 50 artış göstermiştir (153 ± 2). İstatistiksel değerlendirmeler, bu artışın 0,01 düzeyinde anlamlı olduğunu kanıtlamıştır ($*p<0,01$).

H_2O_2 ’nin ardından bitki ekstresi uygulamalarında, tüm bitki ekstrelerinin oksidatif hasara bağlı AChE indüksiyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Bu sonuç, *G. corniculatum* ekstrelerinin hücresel AChE inhibitör etkisinin olduğunu kanıtlamıştır. En etkin inhibitör etki metanol ekstraktında belirlenmişken, bunu sırasıyla su ve kloroform ekstresi izlemiştir. Tüm ekstrelerin fPC12 hücrelerinin AChE aktivitesinde sebep olduğu azalma, yalnızca H_2O_2 uygulanan gruba göre istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($\#p<0,01$). Yapılan tek yönlü varyans analizi de AChE inhibisyonu bakımından ekstrele göre etkinliğin metanol > su > kloroform şeklinde olduğunu doğrulamıştır.

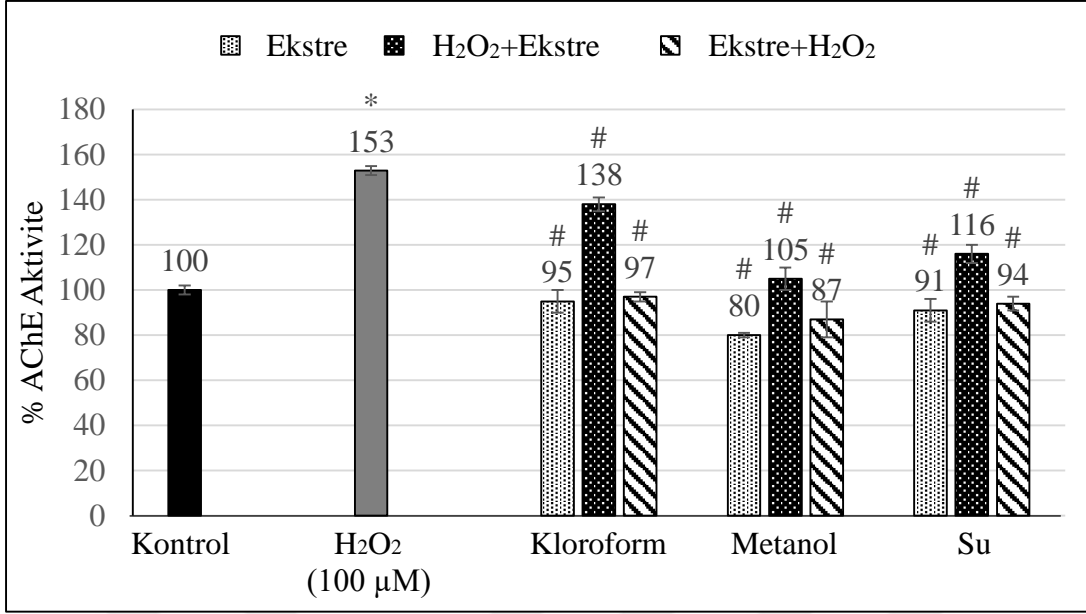
Korelasyon analizine ait veriler, ekstrelerin allokriptopin, rutin ve kuersetin miktarları ile hücrel AChE-i özellikleri arasında pozitif yönde güçlü bir ilişkinin olduğunu göstermiştir ($r=0,9$).

4.9.3. Bitki ekstraktlarının hücrel AChE indüksiyonunu engelleyici etkisi

Bitki ekstralarının fPC12 hücrelerinde H_2O_2 kaynaklı AChE indüksiyonunu engelleyici etkilerinin belirlenmesi için, fPC12 hücreleri 24 saat boyunca 1000 $\mu\text{g/mL}$ kloroform, metanol ve su ekstresi uygulanmasının ardından, 24 saat 100 μM H_2O_2 ile muamele edilmiş, uygulama gruplarındaki AChE aktivitesi H_2O_2 ve bitki ekstresi uygulaması yapılmamış kontrol grubuna göre değerlendirilmiştir. Bitki ekstralarının fPC12 hücrelerini H_2O_2 kaynaklı AChE indüksiyonundan koruyucu etkileri incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Bitki ekstralarının ardından H_2O_2 uygulanan hücrelerdeki AChE aktivitesinin yalnızca H_2O_2 uygulamasına göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, *G. corniculatum* ekstralarının fPC12 hücrelerinde H_2O_2 kaynaklı AChE indüksiyonunu engelleyici etkisinin olduğunu göstermiştir. AChE indüksiyonunu en etkin şekilde engelleyen ekstrenin metanol ekstresi olduğu belirlenmiştir. Bu durum, AChE-i özelliğe ilişkin diğer sonuçlar ile paralellik göstermiştir.

Tüm ekstraların fPC12 hücrelerinde sebep olduğu AChE aktivitesi, yalnızca H_2O_2 uygulanan gruba göre istatistiksel olarak da farklı bulunmuştur ($\#p<0,01$). Yapılan tek yönlü varyans analizinde AChE artışını engelleyici özellik bakımından kloroform ve su ekstresi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemişken ($p>0,05$), metanol ekstresinin kloroform ve su ekstresine göre daha etkin olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.2. H₂O₂ ve *G. corniculatum* ekstralarının fPC12 hücrelerinde kontrole göre % AChE aktiviteleri (*: Kontrole göre $p < 0,01$) (#: H₂O₂ grubuna göre $p < 0,01$)

4.10. H₂O₂ ile Oluşturulmuş Nörodejeneratif fPC12 Hücre Modelinde Bitki Ekstrelerinin mRNA ve Protein İfade Düzeylerine Etkisi

24 saat 100 µM H₂O₂'nin ardından uygulanan 24 saat 100, 500 ve 1000 µg/mL'lik *G. corniculatum* ekstralarının uygulandığı fPC12 hücrelerinde, AChE, Bax, Kaspaz 3, Kaspaz 9 ve Bcl-2 mRNA ifade düzeyleri qRT-PCR metodu ile, protein ifade düzeyleri ise western blot hibridizasyon yöntemi ile incelenmiştir.

QRT-PCR çalışmasında, izole edilen RNA'ların tamamının 260/280 absorban değerlerinin 2,04 ile 2,09; izole edilen cDNA'ların ise 1,75 ile 1,79 arasında olduğu belirlenmiştir. Bu durum, hem RNA hem de cDNA örneklerinin saf olduğunu göstermiştir.

4.10.1. H₂O₂ ile AChE aktivitesi uyarılmış fPC12 hücrelerinde bitki ekstralarının AChE mRNA ve protein ifade düzeylerine etkisi

Bitki ekstralarının AChE mRNA ifade düzeylerine etkisi

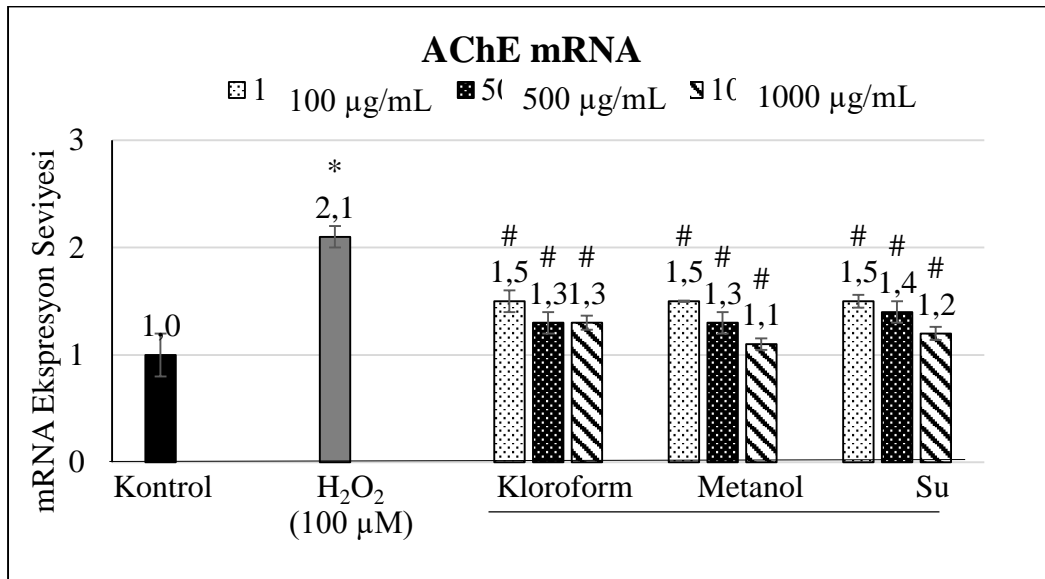
AChE geni mRNA ifade düzeylerine ilişkin bulgularımız Şekil 4.3'te gösterilmiştir. 24 saat 100 µM H₂O₂ uygulanmış fPC12 hücrelerinin AChE mRNA ifade düzeyinde kontrole (uygulama yapılmamış fPC12 hücresi) göre 2,1 katlık (% 110) artış tespit edilmiştir. H₂O₂'nin fPC12 hücrelerinin AChE seviyesinde sebep olduğu artış, kontrole göre

istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($*p<0,05$). Tüm ekstrelerin H_2O_2 ile indüklenen AChE gen ifadesini baskıladığı görülmüştür. Ekstrelerin AChE gen ifadesini baskılayıcı etkisinin konsantrasyon ile doğru orantılı olduğu ve üç farklı ekstrenin denenen konsantrasyon sonuçlarının birbirine yakınlık gösterdiği belirlenmiştir.

En yüksek baskılamamanın belirlendiği 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda, kloroform ekstraktı % 76, metanol ekstraktı % 90, su ekstraktı ise % 86 oranında AChE gen ifadesini baskılamıştır. *G. corniculatum* her üç ekstresinin uygulanan tüm konsantrasyonlarda H_2O_2 'nin sebep olduğu AChE indüksiyonunu gen düzeyinde anlamlı şekilde azalttığı yapılan varyans analizi ile istatistiksel olarak da kanıtlanmıştır ($\#p<0,05$). En iyi AChE azalışının sağlandığı 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik konsantrasyonda metanol ekstresinin ($p=0,0002$), kloroform ($p=0,003$) ve su ($p=0,0004$) ekstresine göre daha etkili olduğu tek yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular, fPC12 hücrelerine 24 saat 100 μM H_2O_2 uygulamasının AChE geninin ekspresyonunu artırdığını, *G. corniculatum* kloroform, metanol ve su ekstralarının ise AChE ekspresyonunu gen düzeyinde azalttığı için AChE-i özellikte olduğunu göstermektedir.

Ekstrelerin allokriptopin, rutin ve kuersetin miktarları ile gen düzeyinde AChE inhibitör özellikleri arasında pozitif yönde güçlü bir ilişkinin olduğu korelasyon analizine ait veriler ile gösterilmiştir ($r=0,9$).



Şekil 4.3. H_2O_2 'nin ardından farklı konsantrasyonlarda *G. corniculatum* ekstraları uygulanmış fPC12 hücrelerinde AChE mRNA ifade düzeyleri (*: Kontrolle göre $p<0,05$) (#: H_2O_2 grubuna göre $p<0,05$)

Bitki ekstralarının AChE protein ifade düzeylerine etkisi

100 μM H_2O_2 ile 24 saat muamele edilen fPC12 hücrelerinde AChE'nin uygulama yapılmamış fPC12 hücrelerine (kontrol) göre, 1,9 kat (% 90) arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Uygulanan H_2O_2 konsantrasyon ve süresi, fPC12 hücrelerinde AChE indüksiyonunu gerçekleştirebilmiştir. Yapılan istatistiksel analizde H_2O_2 'nin sebep olduğu AChE protein seviyesindeki artışın, kontrole göre anlamlı olduğu kanıtlanmıştır ($*p<0,05$). Bu sonuç, fPC12 hücrelerinde H_2O_2 'nin protein seviyesinde AChE'yi indükleyici etkisini ve oluşturulan hücre modelinin başarılı olduğunu göstermiştir.

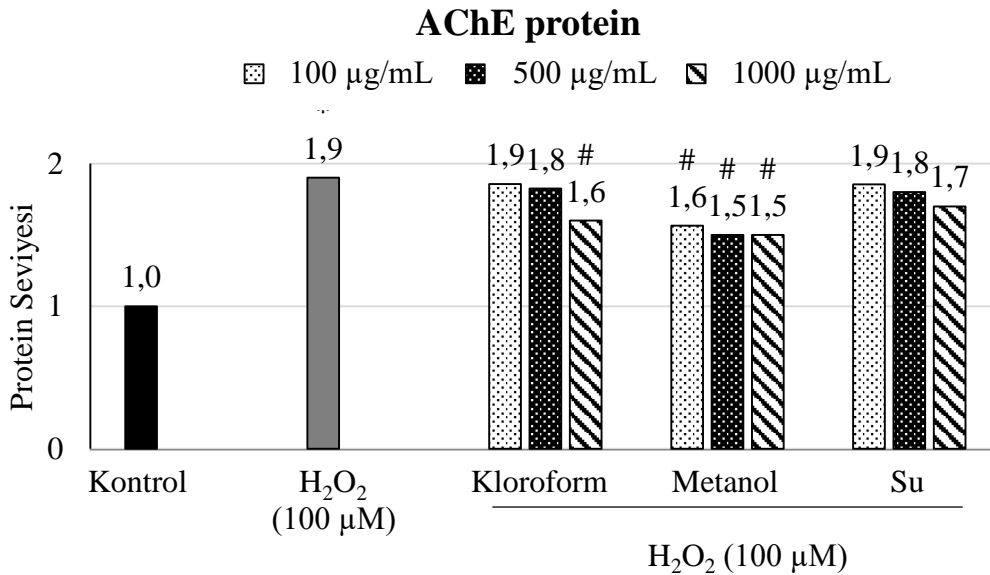
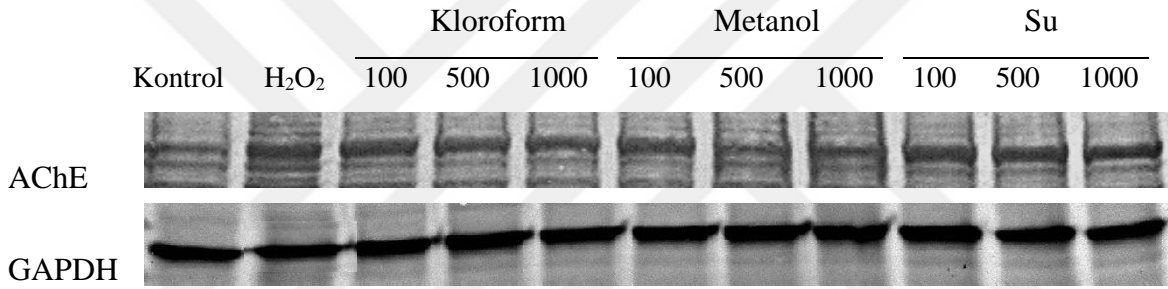
G. corniculatum metanol ekstresi, fPC12 hücrelerinde H_2O_2 'nin sebep olduğu AChE protein ifadesindeki artışı diğer ekstralara göre daha iyi baskılamış ve en iyi baskılama 500 ve 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik konsantrasyonda (% 21) tespit edilmiştir. Su ve kloroform ekstraları uygulamalarında ise sonuçlar birbirine benzerlik göstermiş ve sadece kloroform ekstresinin 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'sinde anlamlı baskılama saptanmıştır.

Kloroform ekstresinin sadece 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik konsantrasyonunun, metanol ekstresinin ise, tüm konsantrasyonlarının AChE protein seviyesi üzerinde baskılayıcı etkisi, t-Test verilerine göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($\#p<0,05$). Kloroform ekstresinin 100 ve 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik konsantrasyonlarının, su ekstresinin ise uygulanan tüm konsantrasyonlarının, H_2O_2 kaynaklı AChE protein ifade artışını anlamlı ölçüde etkilemediği saptanmıştır ($p>0,05$). En iyi AChE baskılanmasının sağlandığı 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik konsantrasyonda metanol ekstresinin ($p=0,01$), kloroform ($p=0,03$) ve su ($p=0,3$) ekstresine göre daha etkili olduğu tek yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, fPC12 hücrelerine 24 saat 100 μM H_2O_2 uygulamasının AChE protein ifadesini artırdığını, *G. corniculatum* metanol ekstresinin tüm konsantrasyonlarının ve kloroform ekstralarının ise 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik konsantrasyonunun AChE-i özellikle olduğunu göstermektedir.

G. corniculatum ekstraktlarının AChE ifade düzeyleri ile ilgili western blot analiz sonuçlarının qRT-PCR sonuçlarını desteklediği belirlenmiştir. Bu durum, metanol ekstresinin 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonunun, H_2O_2 'nin sebep olduğu AChE indüksiyonunu hem gen, hem de protein düzeyinde en iyi baskılayan uygulama olduğunu göstermiştir.

In vitro ve hücresel AChE inhibisyonuna ilişkin sonuçlar, gen ve protein seviyesinde AChE baskılanmasına ilişkin sonuçlar ile paralellik göstermiştir. Buna göre, *G. corniculatum* ekstralarının AChE inhibisyonunda etkili olduğu ve en etkin inhibisyonun metanol ekstresi tarafından sağlandığı saptanmıştır. Pearson korelasyon analizine ait veriler de ekstraların allokriptopin, rutin ve kuersetin miktarları ile *in vitro*, hücresel, gen ve protein seviyesinde belirlenen AChE-i özellikleri arasında pozitif yönde bir korelasyonun olduğunu göstermiştir ($r=0,2-0,9$).

Ekstrelerin allokriptopin, rutin ve kuersetin miktarları ile protein düzeyinde AChE inhibitör özellikleri arasında pozitif yönde bir ilişkinin olduğu korelasyon analizine ait veriler ile gösterilmiştir (sırasıyla $r=0,2$; $r=0,4$; $r=0,2$).



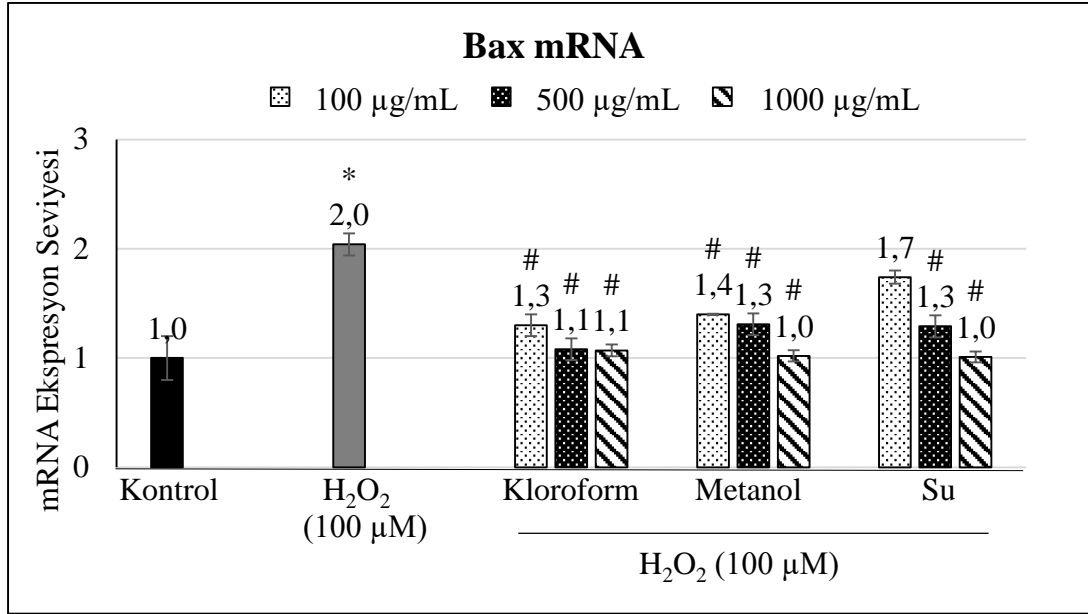
Şekil 4.4. H₂O₂'nin ardından farklı konsantrasyonlarda *G. corniculatum* ekstraları uygulanmış fPC12 hücrelerinde AChE protein seviyesi (*: Kontrolle göre $p<0,05$) (#: H₂O₂ grubuna göre $p<0,05$)

4.10.2. H₂O₂ ile nöral apoptoza indüklenmiş fPC12 hücrelerinde bitki ekstralarının apoptotik mRNA ve protein ifade düzeylerine etkisi

Bitki ekstralarının Bax mRNA ifade düzeylerine etkisi

Bax geni mRNA ifade düzeylerine ilişkin bulgularımız Şekil 4.5'te gösterilmiştir. 24 saat 100 µM H₂O₂ uygulanmış fPC12 hücrelerinde Bax mRNA ifade düzeyinin kontrole (uygulama yapılmamış fPC12 hücresi) göre 2 kat (% 100) arttığı görülmüştür. H₂O₂'nin fPC12 hücrelerinde Bax gen seviyesinde sebep olduğu artış, kontrole göre anlamlı bulunmuştur (* $p < 0,05$).

Ekstre uygulamalarının (100 µg/mL'lik su ekstresi hariç), H₂O₂ ile indüklenen Bax gen ifadesini baskıladığı, artan konsantrasyonlara bağlı baskılamamanın arttığı ve üç farklı ekstrenin sonuçlarının birbirine yakın olduğu görülmüştür. 100 µg/mL'lik konsantrasyonda kloroform ve metanol ekstresi su ekstresine göre daha etkili inhibisyon sağlamıştır. H₂O₂ kaynaklı Bax artışı üzerinde en yüksek inhibisyon ise 1000 µg/mL'lik konsantrasyonda görülmüştür. fPC12 hücrelerinde indüklenen Bax geninde 1000 µg/mL konsantrasyonda kloroform ekstraktı % 45, metanol ve su ekstraktları ise % 50 oranında baskılayıcı etki göstermiştir. *G. corniculatum* ekstralarının (100 µg/mL'lik su ekstresi hariç), H₂O₂'nin sebep olduğu Bax mRNA ekspresyon seviyesindeki artışı, istatistiksel olarak anlamlı şekilde baskıladığı t-Test analizi ile tespit edilmiştir ($p < 0,05$). 100 µg/mL'lik konsantrasyonda kloroform ve metanol ekstresinin su ekstresine göre farkı anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Varyans analizi Bax geni ifadesinin baskılanması bakımından 1000 µg/mL'lik konsantrasyonda ekstralar arasında anlamlı derecede bir fark olmadığını göstermiştir ($p > 0,05$). Elde edilen bulgular, 24 saat 100 µM H₂O₂ uygulamasının fPC12 hücrelerinde pro-apoptotik Bax geninin ekspresyonunu arttırdığını, *G. corniculatum* ekstralarının ise Bax geninin ekspresyonunu konsantrasyona bağlı olarak azalttığı için apoptozisi baskılayıcı özellik gösterdiğini kanıtlamıştır.



Şekil 4.5. H₂O₂'nin ardından farklı konsantrasyonlarda *G. corniculatum* ekstreleri uygulanmış fPC12 hücrelerinde Bax mRNA ifade düzeyleri (*: Kontrolle göre $p<0,05$) (#: H₂O₂ grubuna göre $p<0,05$)

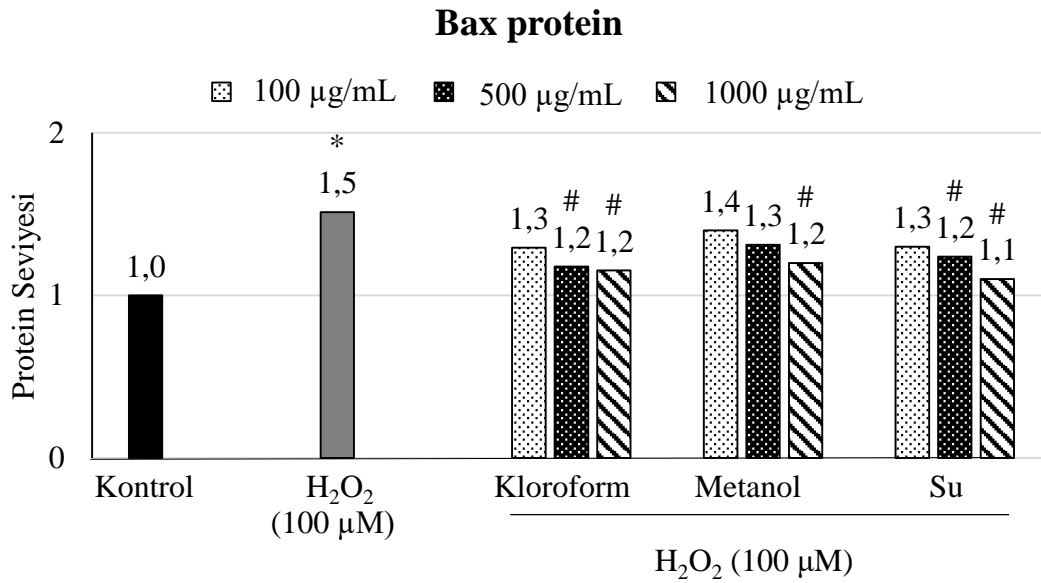
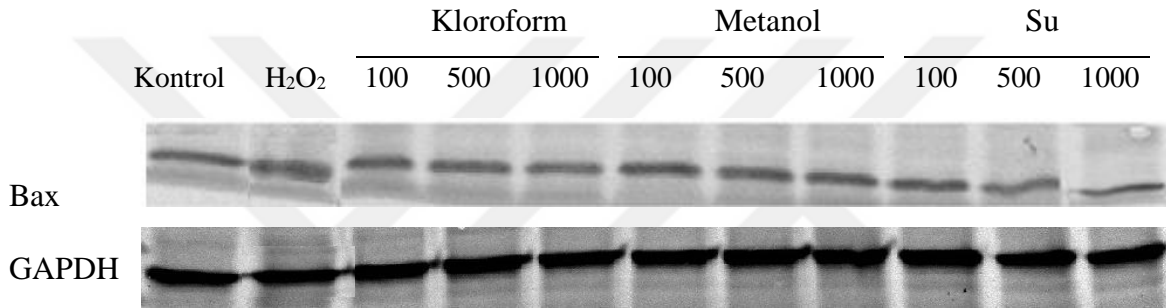
Bitki ekstrelerinin Bax protein ifade düzeylerine etkisi

Bax protein seviyesine ilişkin bulgularımız Şekil 4.6'da gösterilmiştir. 100 µM H₂O₂ ile 24 saat muamele edilen fPC12 hücrelerinde Bax protein seviyesinin uygulama yapılmamış fPC12 hücrelerine (kontrol) göre, 1,5 kat (% 50) arttığı tespit edilmiştir. Uygulanan H₂O₂ konsantrasyon ve süresinin, fPC12 hücrelerinde Bax protein indüksiyonunu gerçekleştirebildiği görülmüştür. İstatistiksel analizlerde de H₂O₂'nin fPC12 hücrelerinin Bax protein ifadesinde sebep olduğu artışın kontrole göre anlamlı olduğu saptanmıştır (* $p<0,05$).

G. corniculatum ekstrelerinin ise yüksek konsantrasyonlarda H₂O₂'nin sebep olduğu Bax protein ifadesindeki artışı baskıladığı saptanmıştır. En yüksek baskılamayı su ekstrelerinin 1000 µg/mL'lik konsantrasyonu göstermiştir (% 27). 500 µg/mL'de kloroform ve su ekstrelerinin, 1000 µg/mL'de ise tüm ekstrelerin H₂O₂ grubuna göre Bax protein seviyesindeki farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (# $p<0,05$). Bax proteininin ifadesinde en iyi inhibisyonun sağlandığı 1000 µg/mL'lik konsantrasyonda su ekstrelerinin ($p=0,01$), kloroform ve metanol ($p=0,03$) ekstrelerine göre daha etkili olduğu varyans analizi ile istatistiksel olarak da doğrulanmıştır.

Elde edilen bulgular, 24 saat 100 μM H_2O_2 uygulanmasının fPC12 hücrelerinde pro-apoptotik Bax proteininin ekspresyonunu artırdığını göstermiştir. *G. corniculatum* ekstraktlarının ise Bax proteininin ekspresyonunu azaltarak içsel apoptozu baskıladığını göstermiştir (metanol ekstresinin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik konsantrasyonu hariç).

G. corniculatum ekstraktlarının Bax ifade düzeyleri ile ilgili sonuçlarda, western blot ve qRT-PCR analizleri paralellik göstermiştir. Her iki deney sonucu, su ekstresinin 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonunun, H_2O_2 'nin sebep olduğu AChE indüksiyonunu hem gen, hem de protein düzeyinde en iyi baskılayan uygulama olduğunu göstermiştir.



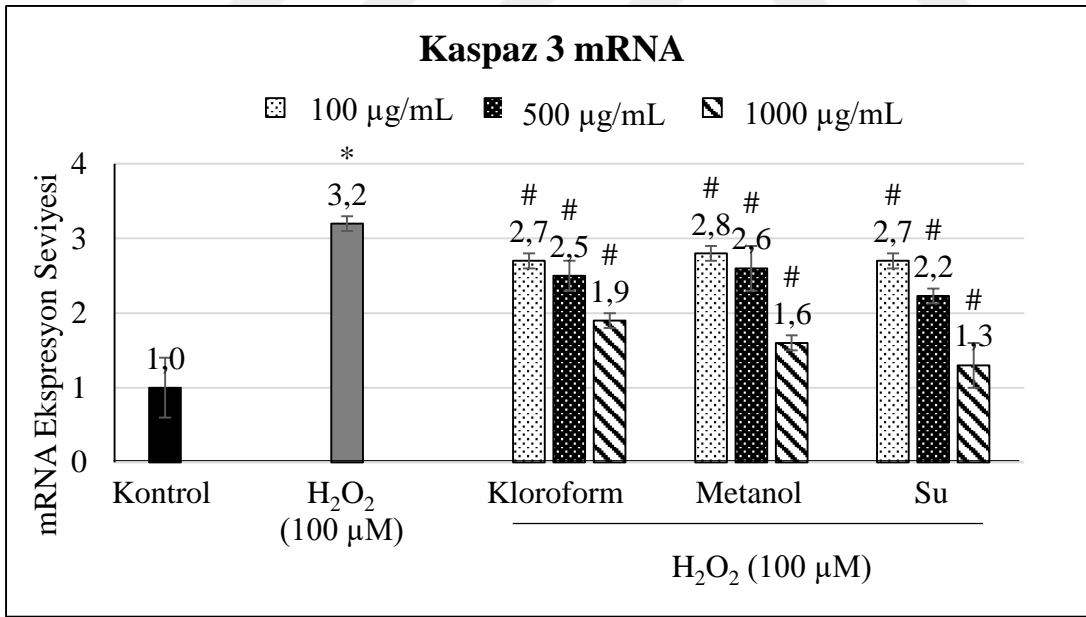
Şekil 4.6. H_2O_2 'nin ardından farklı konsantrasyonlarda *G. corniculatum* ekstraktları uygulanmış fPC12 hücrelerinde Bax protein seviyesi (*: Kontrole göre $p < 0,05$) (#: H_2O_2 grubuna göre $p < 0,05$)

Bitki ekstraktlarının Kaspaz 3 mRNA ifade düzeylerine etkisi

Kaspaz 3 geni mRNA ifade düzeylerine ilişkin bulgularımız Şekil 4.7'de gösterilmiştir. 24 saat 100 μM H_2O_2 uygulanmış fPC12 hücrelerinin Kaspaz 3 mRNA ifade düzeyinde,

kontrole göre (uygulama yapılmamış fPC12 hücresi) 3,2 katlık (% 220) bir artış tespit edilmiştir. H₂O₂ uygulanan grupta Kaspaz 3 seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklı olduğu t-Test analizi ile istatistiksel olarak da doğrulanmıştır (* $p < 0,05$).

Denenen tüm *G. corniculatum* ekstrelerinin, H₂O₂'nin sebep olduğu Kaspaz 3 mRNA ekspresyon seviyesindeki artışı, konsantrasyon artışı ile doğru orantılı şekilde baskıladığı görülmüştür. Her üç ekstrenin de uygulanan tüm konsantrasyonlarda H₂O₂'nin sebep olduğu Kaspaz 3 indüksiyonunu gen düzeyinde anlamlı şekilde azalttığı istatistiksel olarak da t-Test verileri ile kanıtlanmıştır ($p < 0,05$). Ekstre konsantrasyonları göz önüne alındığında, H₂O₂ tarafından indüklenen Kaspaz 3'ü en etkin baskılayan uygulama, 1000 µg/mL konsantrasyon olmuştur. 1000 µg/mL'lik konsantrasyonda kloroform ekstraktı % 41, metanol ekstraktı % 50, su ekstraktı ise % 59 oranında Kaspaz 3 gen ifadesini H₂O₂ uygulanan gruba göre baskılamıştır. En iyi Kaspaz 3 gen ifade baskılamasının sağlandığı 1000 µg/mL'lik konsantrasyonda su ekstresinin, kloroform ve metanol ekstresine göre farkı tek yönlü varyans analizine göre anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).



Şekil 4.7. H₂O₂'nin ardından farklı konsantrasyonlarda *G. corniculatum* ekstreleri uygulanmış fPC12 hücrelerinde Kaspaz 3 mRNA ifade düzeyleri (*: Kontrole göre $p < 0,05$) (#: H₂O₂ grubuna göre $p < 0,05$)

Bitki ekstralarının Kaspaz 3 protein ifade düzeylerine etkisi

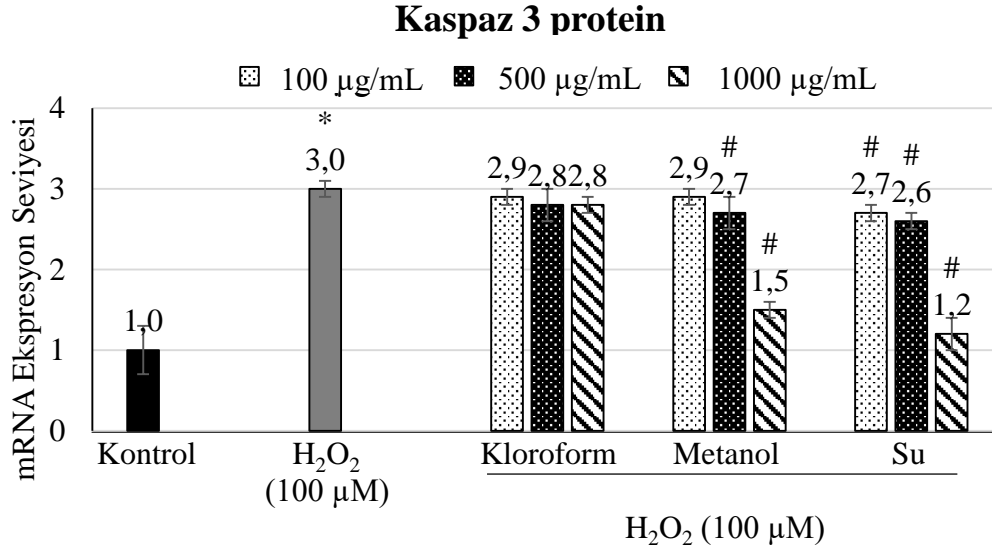
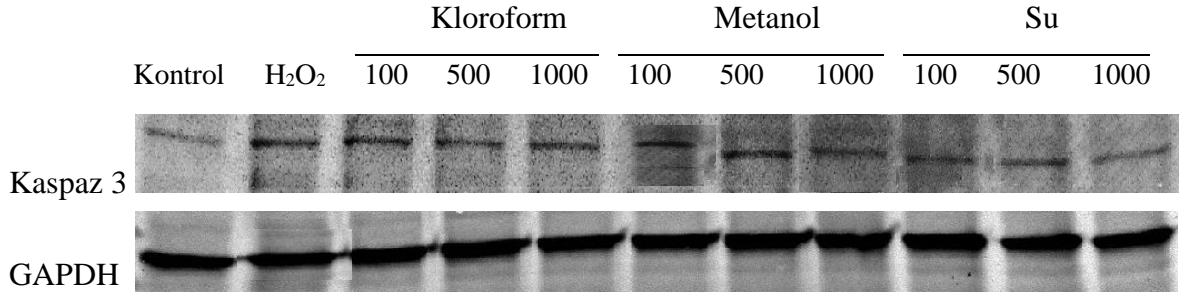
Kaspaz 3 protein seviyesine ilişkin bulgularımız Şekil 4.8’de gösterilmiştir. 100 μM H_2O_2 ile 24 saat muamele edilen fPC12 hücrelerinde, Kaspaz 3 protein seviyesinin uygulama yapılmamış fPC12 hücrelerine (kontrol) göre, 3 kat (% 200) arttığı görülmüştür. Bu artış istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur (* $p < 0,05$).

G. corniculatum metanol ve su ekstralarının, H_2O_2 ’nin sebep olduğu Kaspaz 3 geninin protein ifadesindeki artışı azalttığı saptanmıştır (metanol ekstresinin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ’lik konsantrasyonu hariç). Kloroform ekstresinin ise, Kaspaz 3 protein ifadesindeki etkisi, baskılayıcı özellikten bahsedilemeyecek derecede azdır. Kloroform ekstresinin tüm konsantrasyonlarının ve metanol ekstresinin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonunun H_2O_2 kaynaklı Kaspaz 3 inhibisyonu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farka sebep olmadığı t-Test verileri ile de doğrulanmıştır ($p > 0,05$). Buna karşın diğer uygulamaların baskılayıcı etkileri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($\#p < 0,05$).

Uygulanan ekstralar ve konsantrasyonlar ele alındığında, en yüksek baskılayıcı etkiyi su ekstresinin 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ’lik konsantrasyonu göstermiştir (% 60). 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ’lik konsantrasyonda su ekstresinin diğer ekstralara göre Kaspaz 3 proteinini baskılayıcı özellik bakımından farklı olduğu varyans analizi ile de doğrulanmıştır ($\#p < 0,05$).

Elde edilen bulgular, fPC12 hücrelerine 24 saat 100 μM H_2O_2 uygulamasının pro-apoptotik Kaspaz 3 proteininin ekspresyonunu artırdığını, *G. corniculatum* metanol ve su ekstralarının ise Kaspaz 3 protein ekspresyonunu azaltarak apoptozu baskıladığını göstermiştir (metanol ekstresinin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ’lik konsantrasyonu hariç).

G. corniculatum kloroform ekstresinin H_2O_2 kaynaklı Kaspaz 3 gen ifadesinin indüksiyonunu baskıladığı belirlenmiş olmasına rağmen, Kaspaz 3 protein ifadesi üzerinde dikkate değer bir baskılayıcı etki görülmemiştir. Gen ekspresyonunda kloroform ekstresinin baskılayıcı etkisinin diğer ekstralara göre düşük oluşu dikkate alındığında, sonuçların benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Metanol ve su ekstralarına ait qRT-PCR ve western blot analiz sonuçlarının da birbirini desteklediği görülmüştür. Her iki deney sonu da, su ekstresinin 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonunun, H_2O_2 ’nin sebep olduğu Kaspaz 3 indüksiyonunu hem gen, hem de protein düzeyinde en iyi baskılayan uygulama olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.8. H₂O₂'nin ardından farklı konsantrasyonlarda *G. corniculatum* ekstreleri uygulanmış fPC12 hücrelerinde Kaspaz 3 protein seviyesi (*: Kontrole göre $p < 0,05$) (#: H₂O₂ grubuna göre $p < 0,05$)

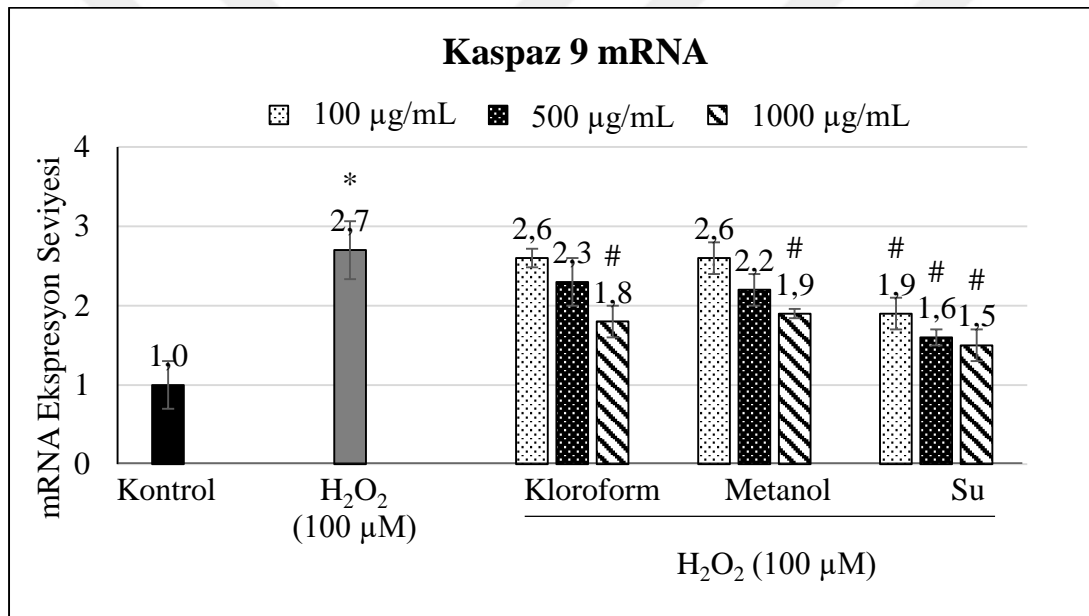
Bitki ekstrelerinin Kaspaz 9 mRNA ifade düzeylerine etkisi

Kaspaz 9 geni mRNA ifade düzeylerine ilişkin bulgularımız Şekil 4.9'da gösterilmiştir. 24 saat 100 µM H₂O₂ uygulanmış fPC12 hücrelerinin Kaspaz 9 mRNA ifade düzeyinde, kontrole göre (uygulama yapılmamış fPC12 hücreleri) 2,7 katlık (% 170) artış tespit edilmiştir. Uygulanan H₂O₂ konsantrasyon ve süresi, fPC12 hücrelerinde pro-apoptotik Kaspaz 9 gen ifadesinin indüksiyonunu gerçekleştirebilmiştir. Bu durum, nörodejeneratif hücre modelinin oluşturulmasında başarı sağlandığını göstermiştir. H₂O₂'nin fPC12 hücrelerinde Kaspaz 9 gen ifadesinde sebep olduğu artış, kontrole göre istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($*p < 0,05$).

G. corniculatum ekstrelerinin ise H₂O₂'nin sebep olduğu Kaspaz 9 mRNA ekspresyon seviyesindeki artışı, azalttığı saptanmıştır (kloroform ve metanol ekstrelerinin 100 ve 250 µg/mL'lik konsantrasyonları hariç). *G. corniculatum* kloroform ve metanol ekstresinin 100 ve 250 µg/mL'lik konsantrasyonundaki Kaspaz 9 mRNA ifadesinin H₂O₂ uygulanan hücre grubuna göre

anamlı derecede farklı olmadığı ($p>0,05$), diğerk bitki ekstresi uygulamalarının ise, baskılayıcı etkilerinin 0,05 düzeyinde anlamlı olduğu istatistiksel olarak da t-Test bulguları ile kanıtlanmıştır ($^{\#}p<0,05$).

Tüm konsantrasyonlarda Kaspaz 9 gen ifadesinin baskılanması konusunda en etkin ektre su ekstresidir. Su ekstresinin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonunun sebep olduğu inhibisyon % 30, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonunun % 41, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonunun ise % 44'tür. En iyi Kaspaz 9 gen ifade inhibisyonun sağlandığı 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik konsantrasyonda su ekstresinin ($p=0,001$), kloroform ($p=0,006$) ve metanol ($p=0,03$) ekstresine göre daha etkili olduğu tek yönlü varyans analizi ile de doğrulanmıştır.



şekil 4.9. H₂O₂'nin ardından farklı konsantrasyonlarda *G. corniculatum* ekstreleri uygulanmış fPC12 hücrelerinde Kaspaz 9 mRNA ifade düzeyleri (*: Kontrolle göre $p<0,05$) ($^{\#}$: H₂O₂ grubuna göre $p<0,05$)

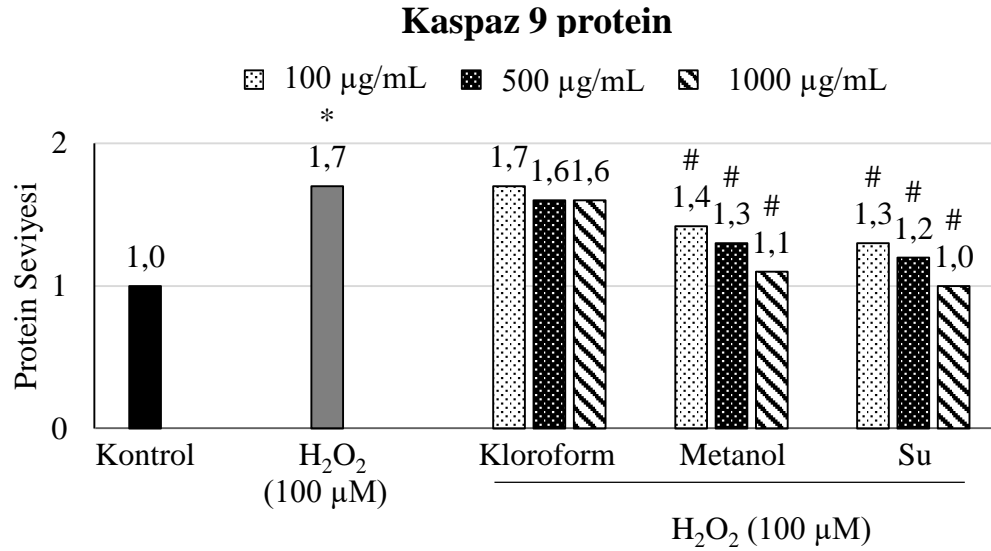
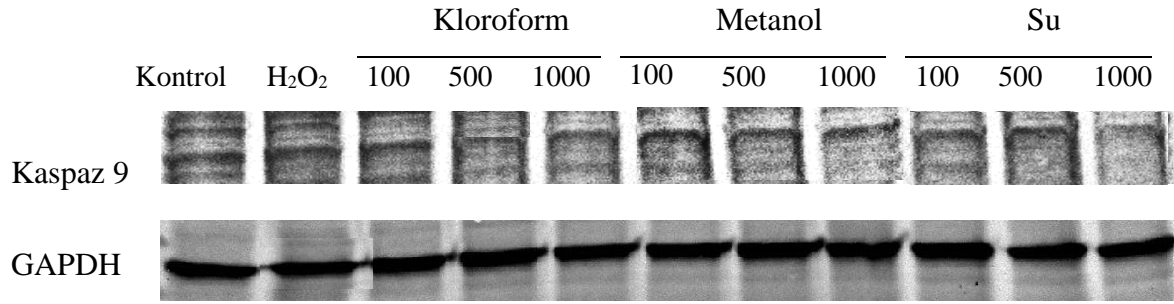
Bitki ekstrelerinin Kaspaz 9 protein ifade düzeylerine etkisi

Kaspaz 9 protein seviyesine ilişkin bulgularımız şekil 4.10'da gösterilmiştir. 100 μM H₂O₂ ile 24 saat muamele edilen fPC12 hücrelerinde, Kaspaz 9 protein seviyesinin uygulama yapılmamış fPC12 hücrelerine (kontrol) göre, 1,7 kat (% 70) arttığı görölmüştür. Uygulanan H₂O₂ konsantrasyon ve süresinin fPC12 hücrelerinde kontrole göre farkının anlamlı olduğu istatistiksel olarak da kanıtlanmıştır ($*p<0,05$).

Denenen tüm *G. corniculatum* metanol ve su ekstralarının ise, H₂O₂'nin sebep olduğu Kaspaz 9 protein ekspresyon seviyesindeki artışı, konsantrasyon artışı ile doğru orantılı şekilde baskıladığı görülmüştür. Kloroform ekstresinin uygulanan konsantrasyonları Kaspaz 9 protein ifadesini H₂O₂ uygulanan gruplara göre dikkate değer bir biçimde baskılayamamıştır. *G. corniculatum* metanol ve su ekstralarının Kaspaz 9 geninin protein ifadesinin H₂O₂ uygulanan gruba göre farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ([#] $p < 0,05$). Kloroform ekstresinin ise farkının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p > 0,05$) t-Test verileri ile doğrulanmıştır.

Tüm konsantrasyonda Kaspaz 9 protein ifadesinin baskılanması konusunda en etkin ekstre su ekstresi olmuştur. Su ekstresinin 100 µg/mL'lik konsantrasyonunun sebep olduğu inhibisyon % 24, 500 µg/mL konsantrasyonunun % 29, 1000 µg/mL konsantrasyonunun ise % 41'dir. Kaspaz 9 protein ifadesi bakımından H₂O₂ grubuna göre farkın en çok olduğu uygulamanın 1000 µg/mL'lik su ekstresi olduğu anova testi ile de doğrulanmıştır ($p < 0,05$).

G. corniculatum ekstraktlarının Kaspaz 9 ifade düzeyleri ile ilgili sonuçlar, western blot ve qRT-PCR analizlerinin birbirini desteklediğini göstermiştir. Her iki deneyde sonucu da, su ekstresinin 1000 µg/mL konsantrasyonunun, H₂O₂'nin sebep olduğu Kaspaz 9 indüksiyonunu hem gen, hem de protein düzeyinde en iyi baskılayan uygulama olduğunu göstermiştir.



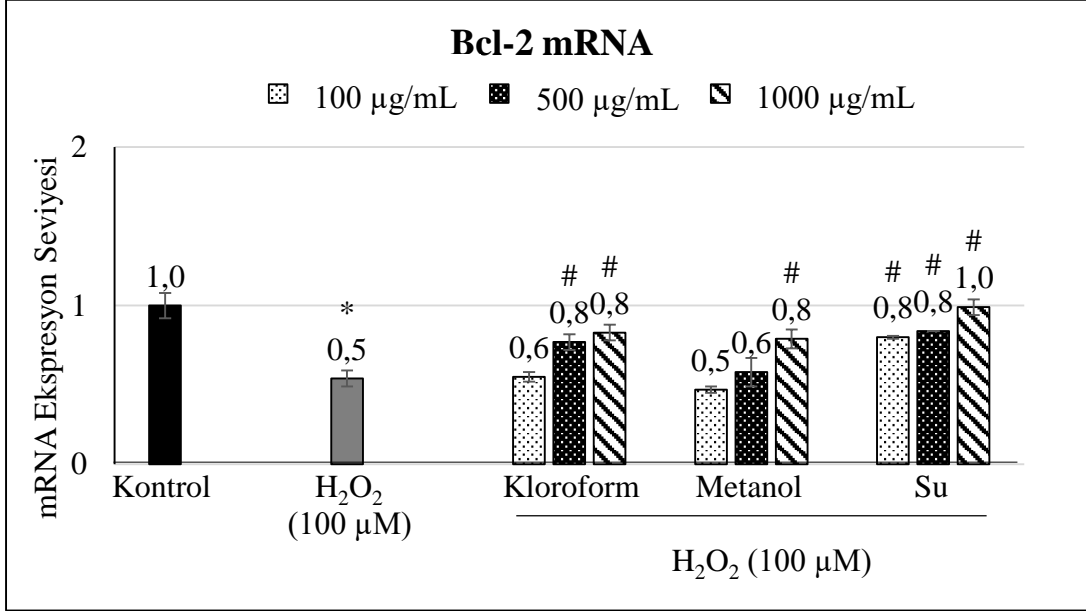
Şekil 4.10. H₂O₂'nin ardından farklı konsantrasyonlarda *G. corniculatum* ekstreleri uygulanmış fPC12 hücrelerinde Kaspaz 9 protein seviyesi (*: Kontrolle göre $p < 0,05$) (#: H₂O₂ grubuna göre $p < 0,05$)

Bitki ekstrelerinin Bcl-2 mRNA ifade düzeylerine etkisi

Bcl-2 geni mRNA ifade düzeylerine ilişkin bulgularımız Şekil 4.11'de gösterilmiştir. 24 saat 100 µM H₂O₂ uygulanmış fPC12 hücrelerinin Bcl-2 mRNA ifade düzeyinde, kontrole göre (uygulama yapılmamış fPC12 hücreleri) ½ katlık (% 50 oranında) azalma tespit edilmiştir. Bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu da kanıtlanmıştır ($*p < 0,05$).

G. corniculatum ekstrelerinin, fPC12 hücrelerinde H₂O₂ kaynaklı Bcl-2 mRNA ekspresyon inhibisyonunu arttırdığı görülmüştür (kloroform ekstresinin 100, metanol ekstresinin ise 100 ve 500 µg/mL'lik konsantrasyonları hariç). Kloroform ekstresinin 100, metanol ekstresinin ise 100 ve 500 µg/mL'lik konsantrasyonların uygulandığı fPC12 hücrelerinde Bcl-2 gen ifadesinin, H₂O₂ uygulanan hücre grubuna göre anlamlı derecede farklı olmadığı ($p > 0,05$), diğer bitki ekstresi uygulamalarının ise Bcl-2 gen ifadesini indükleyici etkilerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($*p < 0,05$) t-Test analizi ile kanıtlanmıştır.

Uygulanan ekstre konsantrasyonları ele alındığında, Bcl-2 gen ifadesinde H₂O₂ kaynaklı inhibisyonu en iyi şekilde su ekstresinin 1000 µg/mL'lik konsantrasyonunun giderdiği (% 100) görülmüştür. 1000 µg/mL'lik konsantrasyonda su ekstresinin kloroform ve metanol ekstresine göre farkı tek yönlü varyans analizine göre anlamlı bulunmuştur ([#]*p*<0,05).



Şekil 4.11. H₂O₂'nin ardından farklı konsantrasyonlarda *G. corniculatum* ekstreleri uygulanmış fPC12 hücrelerinde Bcl-2 mRNA ifade düzeyleri (*: kontrole göre *p*<0,05) ([#]: H₂O₂ grubuna göre *p*<0,05)

Bitki ekstrelerinin Bcl-2 protein ifade düzeylerine etkisi

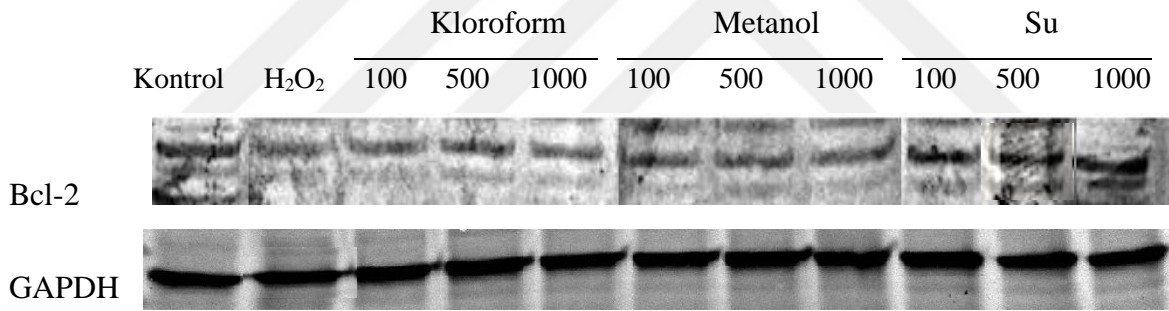
Bcl-2 protein seviyesine ilişkin bulgularımız Şekil 4.12'de gösterilmiştir. 24 saat 100 µM H₂O₂ uygulanan fPC12 hücrelerinde Bcl-2 protein seviyesinin kontrole göre % 40 oranında azaldığı saptanmıştır. Uygulanan H₂O₂ konsantrasyon ve süresinin fPC12 hücrelerinde kontrole göre Bcl-2 protein seviyesini anlamlı ölçüde azalttığı ve apoptozu indükleyebildiği istatistiksel olarak da doğrulanmıştır (**p*<0,05).

G. corniculatum su ekstresinin, H₂O₂'nin sebep olduğu Bcl-2 protein ekspresyon seviyesindeki azalışı, arttırdığı görülmüştür. Kloroform ve metanol ekstrelerinin ise H₂O₂ kaynaklı Bcl-2 protein ifade azalışını dikkate değer şekilde arttırmadığı belirlenmiştir. Yapılan t-Test analizine göre, su ekstresinin denenen tüm konsantrasyonlarının H₂O₂ uygulanan gruba göre Bcl-2 protein seviyesini istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırdığı

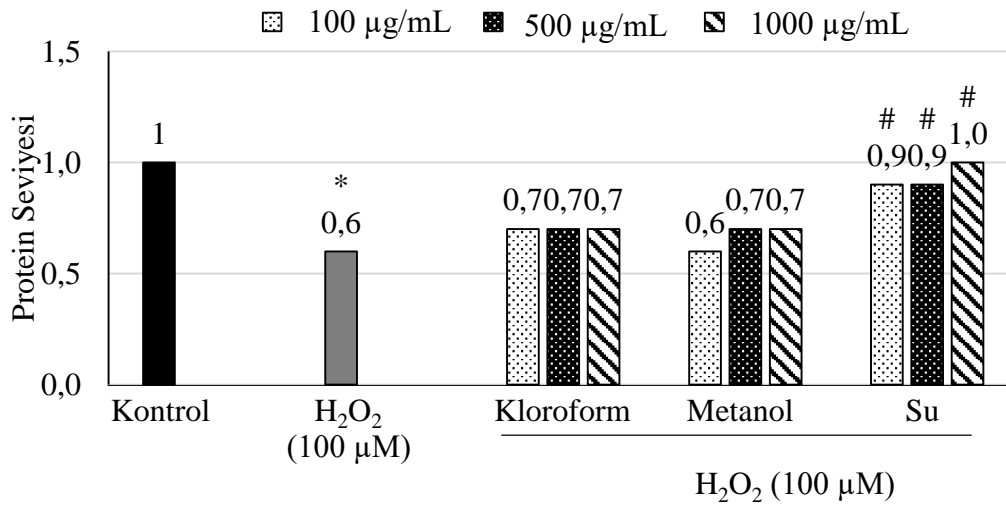
($p < 0,05$), kloroform ve metanol ekstre uygulamalarının ise Bcl-2 gen ifadesindeki etkisinin, H_2O_2 uygulanan gruba göre anlamlı olmadığı ($p > 0,05$) belirlenmiştir.

Bcl-2 protein ifadesi üzerinde H_2O_2 'nin etkisini giderici en etkin uygulama $1000 \mu\text{g/mL}$ 'lik su ekstresi olmuştur (% 67). Bu uygulamanın fPC12 hücrelerinde H_2O_2 kaynaklı Bcl-2 protein azalışını tamamen giderdiği ve Bcl-2 protein ifade seviyesini kontrol hücrelerinin düzeyine ulaştırdığı dikkati çekmiştir. Varyans analizi sonuçları, $1000 \mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonda su ekstresinin kloroform ve metanol ekstresine göre farkının $0,05$ düzeyinde anlamlı olduğunu göstermiştir ($p < 0,05$).

G. corniculatum ekstraktlarının Bcl-2 ifade düzeyleri ile ilgili sonuçlar, western blot ve qRT-PCR analizlerinin birbirini desteklediğini göstermiştir. Her iki deney sonucu da, H_2O_2 'nin Bcl-2 protein ve gen ifadesi üzerinde sebep olduğu hasarı en etkin şekilde giderici uygulamanın $1000 \mu\text{g/mL}$ 'lik su ekstresi olduğunu göstermiştir.



Bcl-2 protein



Şekil 4.12. H_2O_2 'nin ardından farklı konsantrasyonlarda *G. corniculatum* ekstraktları uygulanmış fPC12 hücrelerinde Bcl-2 protein seviyesi (*: kontrole göre $p < 0,05$) (#: H_2O_2 grubuna göre $p < 0,05$)

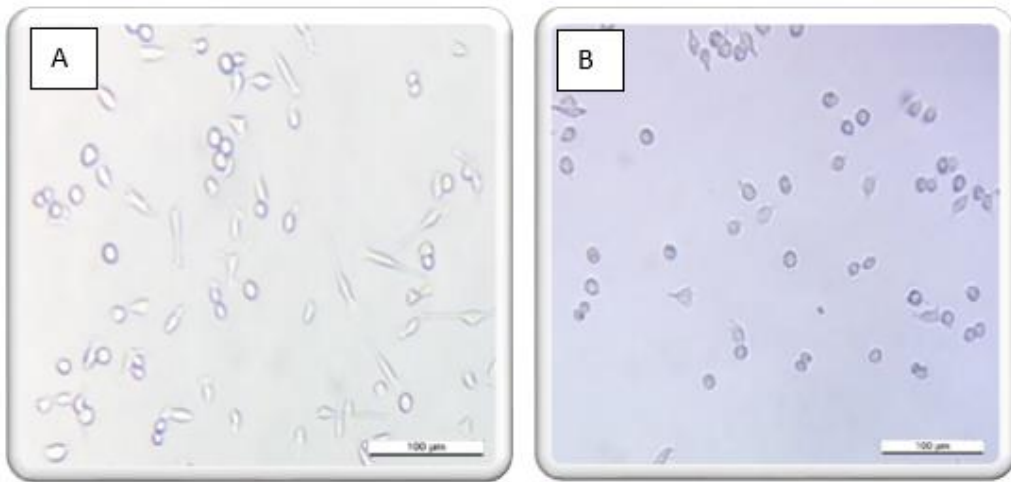
QRT-PCR ve western blot analizlerinin sonuçları hakkında genel bir değerlendirme yapacak olursak; fPC12 hücrelerinin 24 saat 100 μ M H₂O₂ uygulaması ile AChE, Bax, Kaspaz 3, Kaspaz 9 ifadesinde artış, Bcl-2 ifadesinde ise azalış hem gen hem de protein düzeyinde sağlanmıştır. Bu durum, uygulanan H₂O₂'nin fPC12 hücrelerinde AChE'yi ve apoptozu indüklediğini ve nörodejeneratif hücre modelinin başarı ile oluşturulduğunu göstermiştir. AChE-i özellik bakımından tüm ekstrelere etkin olduğu ve birbirine yakın sonuçlar gösterdiği belirlenmiştir. Ancak, *G. corniculatum* metanol ekstresinin H₂O₂ kaynaklı AChE indüksiyonunu baskılama konusunda diğer ekstrelere kıyasla daha etkili olduğu hem gen hem de protein düzeyinde tespit edilmiştir. Bu durum *in vitro* ve hüresel AChE inhibisyonuna ilişkin bulgularımız ile de uyumaktadır.

fPC12 hücrelerinde H₂O₂ kaynaklı hasar sonrası Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 gen ve protein ifadesinin baskılanması; Bcl-2 gen ve protein ifadesinin ise artırılması konusunda en etkin konsantrasyonunun 1000 μ g/mL olduğu saptanmıştır. Bax gen ifadesi üzerinde metanol ve su ekstresinin 1000 μ g/mL'lik konsantrasyonunun eşit derecede baskılayıcı etki gösterdiği ve kloroform ekstresine göre daha etkin olduğu dikkati çekmiştir. Ekstrelere Bax protein ifade düzeyindeki baskılayıcı etkileri göz önüne alındığında, su ekstresinin diğer ekstrelere göre daha etkin olduğu belirlenmiştir. *G. corniculatum* su ekstresinin 1000 μ g/mL'lik konsantrasyonunun Kaspaz 3 ve 9 genlerinin mRNA ve protein ifadesi bakımından nöral apoptozu diğer ekstrelere göre daha etkin şekilde baskıladığı görülmüştür. Ayrıca, su ekstresinin 1000 μ g/mL'lik konsantrasyonunun Bcl-2 gen ve protein ifadesinde oluşan azalmayı da en etkin şekilde arttıran uygulama olduğu dikkati çekmiştir. *G. corniculatum* ekstrelere AChE ve apoptoz mekanizmaları üzerinde gösterdiği etkinin farklı olduğu saptanmıştır. AChE mekanizması üzerinde en etkin ekstrenin metanol, apoptozun baskılanması konusunda ise en etkin ekstrenin su ekstresi olduğu belirlenmiştir. Bu durumun ekstrelerdeki içerik farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmüştür. Zira, korelasyon analizlerine ilişkin veriler, ekstrelerdeki allokriptopin, rutin ve kuersetin miktarları ile AChE-i özelliğinin ($r=0,2-0,9$); oleamid ve tetrahydroberberin oranları ile apoptoz baskılayıcı özelliğinin arasında pozitif yönlü bir ilişkinin olduğunu göstermiştir ($r>0,4$). Buna karşın, *G. corniculatum* bitkisinin hem AChE hem de apoptoz mekanizmaları üzerinden etki gösterdiği ve bu nedenle nörodejeneratif hastalıklarda terapötik ajan olarak kullanımının mümkün olabileceği söylenebilir.

4.11. LPS ile İndüklenmiş İnflamatuvar BV-2 Hücrelerinde Bitki Ektrelerinin Anti-inflamatuvar Etkilerinin Belirlenmesi

4.11.1. BV-2 hücrelerinin gelişim kontrolü

BV-2 hücrelerinin LPS varlığında ve yokluğunda görüntüleri incelenmiştir. 24 saat 1 µg/mL LPS uygulanan BV-2 hücrelerinde, LPS uygulaması yapılmamış hücelere göre mekik yapısının yuvarlaklaştığı tespit edilmiştir (Resim 4.3). Bu durumun, inflamatuvar bir ajan olan LPS'nin hücrede inflamasyon ve oksidatif stresi indüklemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

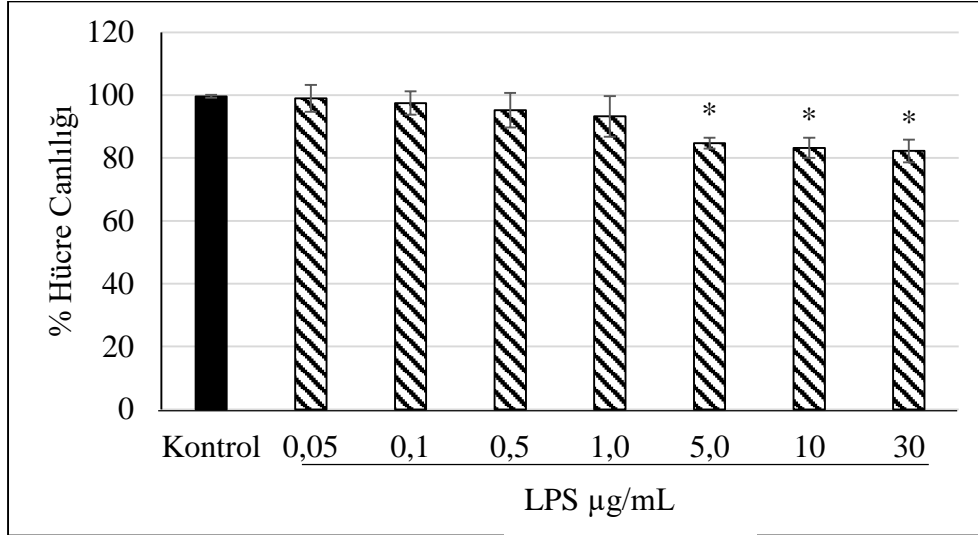


Resim 4. 3. BV-2 hücrelerinin ışık mikroskop görüntüleri A: Uygulama yapılmamış BV-2 hücreleri, B: 24 saat 1 µg/mL LPS ile muamele edilmiş BV-2 hücreleri (10X büyütme)

4.11.2. Farklı LPS konsantrasyonlarının BV-2 hücre canlılığına etkisi

Bu çalışmada, 24 saat süre ile uygulanan 0,05-30 µg/mL LPS'nin BV-2 hücre canlılığına etkisi ortaya konulmaya çalışılmıştır. Çalışma sonuçları Şekil 4.13'te gösterilmiştir. BV-2 hücre canlılığının uygulanan LPS konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Elde edilen bulgularda 0,05-1 µg/mL LPS'nin kontrole göre BV-2 hücre canlılığında 0,05 düzeyinde anlamlı bir etkiye sebep olmadığı ($p>0,05$), buna karşın, 5, 10 ve 30 µg/mL LPS'nin konsantrasyon ile doğru orantılı olarak kontrole göre hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya yol açtığı istatistiksel olarak da doğrulanmıştır ($*p<0,05$). Deney sonuçlarına göre, 24 saat 1 µg/mL LPS uygulaması, BV-2 hücreleri üzerinde dikkate değer etkisi olmayan en yüksek LPS konsantrasyonu ve uygulama süresi olarak belirlenmiştir. Bu

nedenle inflamasyon çalışmalarında BV-2 hücreleri 24 saat 1 µg/mL LPS ile muamele edilmiştir.



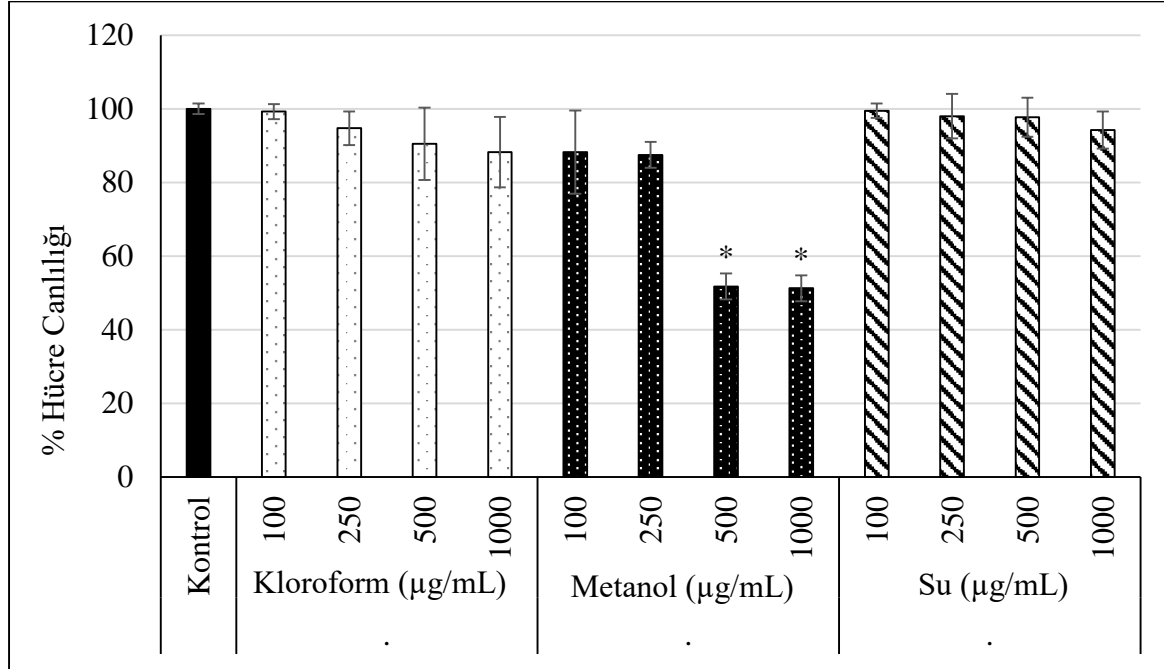
Şekil 4.13. Farklı konsantrasyonlarda 24 saat LPS uygulanmış BV-2 hücrelerinde kontrole göre % canlılık miktarları (Kontrol: Uygulama yapılmamış BV-2 hücreleri) (*: Kontrole göre $p < 0,05$)

4.11.3. Farklı konsantrasyonlarda bitki ekstralarının BV-2 hücre canlılığına etkisi

Bu çalışmada, *G. corniculatum* bitkisinin kloroform, metanol ve su ekstralarının BV-2 hücreleri üzerinde toksik olmayan ve anti-inflamasyonda etkin olabilecek konsantrasyonları tespit edilmeye çalışılmıştır. Çalışmada 24 saat süre ile 100, 250, 500 ve 1000 µg/mL *G. corniculatum* ekstraktlarının uygulanmasının ardından BV-2 hücrelerinde canlılık MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Uygulama yapılmamış kontrol grubunda, BV-2 hücre canlılığı % 100 olarak kabul edilmiş, diğer uygulama gruplarındaki hücre canlılığı kontrole göre % olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.14'de gösterilmiştir.

Sonuçlarda kloroform ve su ekstraları hücre canlılığında kontrole göre kaydadeğer bir azalmaya sebep olmamıştır. Aynı şekilde, metanol ekstresinin 100 ve 250 µg/mL'lik konsantrasyonları da hücre canlılığını önemli ölçüde değiştirmemiştir. Buna karşın, 500 ve 1000 µg/mL'lik metanol ekstresinin BV-2 hücre canlılığında önemli ölçüde azalmaya sebep olmuştur (sırasıyla, % 48 ve 49 hücre ölümü). Bu uygulamaların sebep olduğu hücre azalmasının kontrole göre istatistiksel olarak da anlamlı olduğu belirlenmiştir ($*p < 0,05$). Kloroform ve su ekstralarının uygulanan tüm konsantrasyonlarda, metanol ekstresinin ise 100

ve 250 µg/mL konsantrasyonlarında kontrole göre hücre azalması istatistiksel olarak da anlamlı değildir ($p>0,05$).



Şekil 4.14. Farklı konsantrasyonlarda 24 saat *G. corniculatum* ekstraktlarının uygulandığı BV-2 hücrelerinde kontrole göre % hücre canlılık miktarları (Kontrol: Uygulama yapılmamış BV-2 hücreleri) (*: Kontrole göre $p<0,05$)

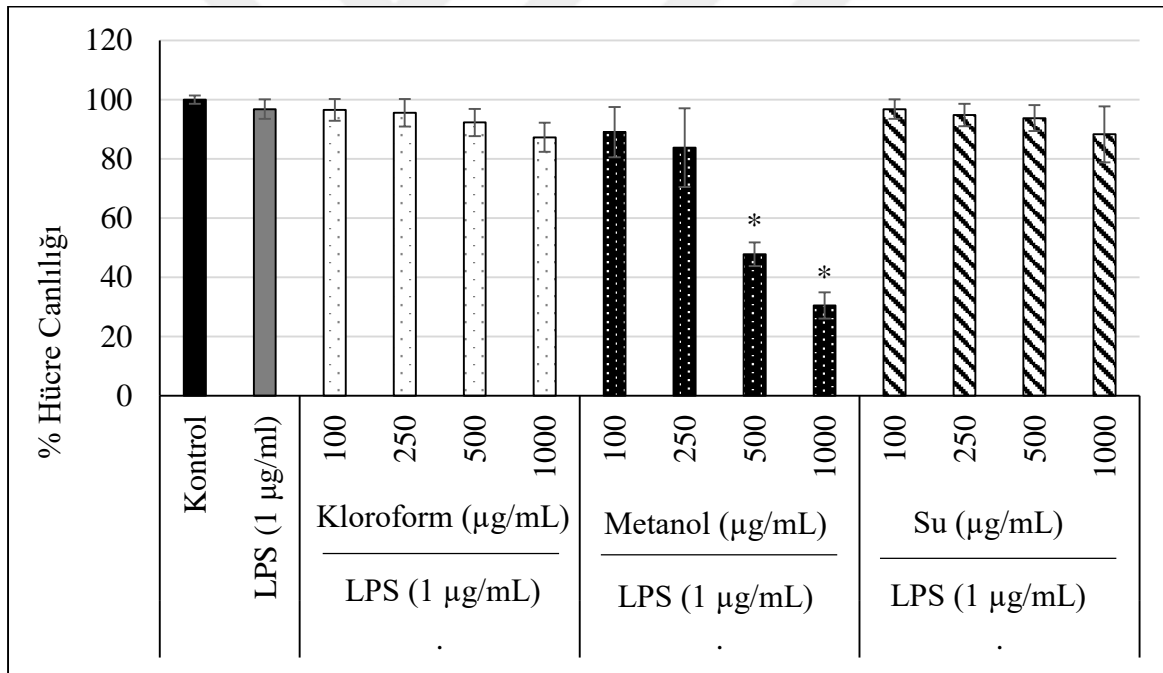
4.11.4. Bitki ekstraktları ve LPS'nin BV-2 hücre canlılığına etkisi

Çalışmada 24 saat süre ile 100, 250, 500 ve 1000 µg/mL *G. corniculatum* ekstraktlarının uygulanmasının ardından 24 saat süre ile 1 µg/mL'lik LPS ile inkübe edilen BV-2 hücrelerinde canlılığın ne şekilde etkilediği belirlenmeye çalışılmıştır. Uygulama yapılmamış, normal hücre koşullarında geliştirilen kontrol grubunda, BV-2 hücre canlılığı % 100 olarak kabul edilmiş, diğer uygulama gruplarındaki hücre canlılığı kontrole göre % olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.15'de gösterilmiştir.

1 µg/mL LPS ile 24 saat muamele edilen BV-2 hücrelerinde kontrole göre kaydadeğer bir canlılık kaybı olmamıştır. İstatistiksel veriler de 24 saat 1 µg/mL'lik LPS uygulanan grupta kontrol grubuna göre hücre canlılığındaki farkın anlamlı olmadığını göstermiştir ($p>0,05$).

Kloroform ve su ekstraktlarının ardından LPS uygulanan grupların tümünde ve 100 ve 250 µg/mL'lik metanol ekstresinin ardından LPS uygulanan gruplarda kontrole göre yüzde hücre

canlılığı dikkate alınmayacak düzeyde azalmıştır. Bu uygulamalarda kontrole göre hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir hücre azalmanın olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). 500 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik metanol ekstresinin ardından LPS uygulamasında ise, BV-2 hücre canlılığının önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır (sırasıyla 48 ± 4 ve 31 ± 4 hücre canlılığı). Bu gruplardaki hücre azalmasının kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu da kanıtlanmıştır ($*p<0,05$). Sonuçlar, LPS ile birlikte uygulanan *G. corniculatum* metanol ekstresinin 24 saatlik 500 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ uygulamalarının, BV-2 hücrelerinde sitotoksik etkiye sebep olduğunu, metanol ekstresinin 100 ve 250 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarının, kloroform ve su ekstraktlarının ise uygulanan hiçbir konsantrasyonunun sitotoksik etkiye sebep olmadığını göstermiştir. Bu sonuçların, ekstraktların tek başlarına BV-2 hücre canlılığı üzerinde etkisini gösteren deney sonuçları (Şekil 4.14) ile de paralellik göstermesi, sitotoksik etkinin ekstrakt kaynaklı olduğunu desteklemiştir.



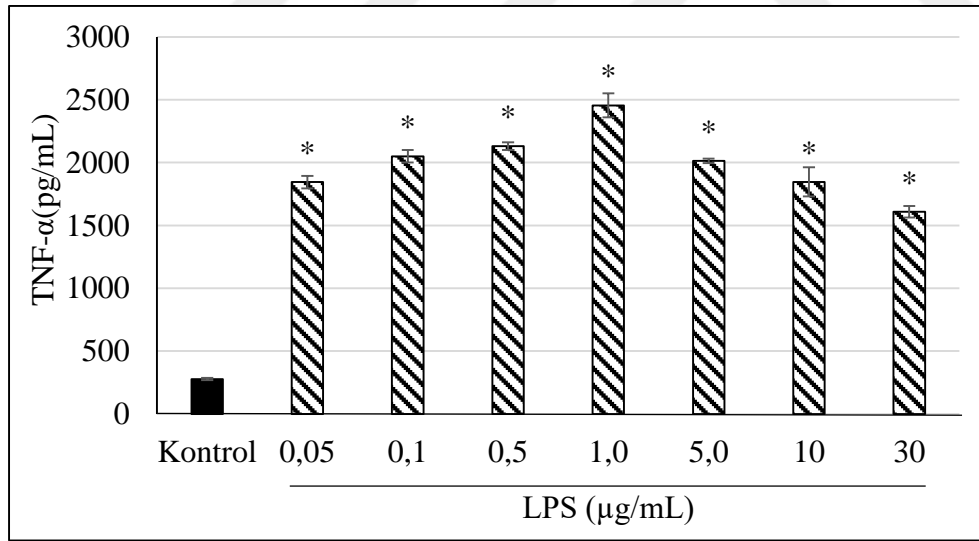
Şekil 4.15. LPS'nin ardından uygulanan farklı konsantrasyonlarda *G. corniculatum* ekstraktlarının BV-2 hücre canlılığına etkisi (Kontrol: Uygulama yapılmamış BV-2 hücreleri) (*: Kontrole göre $p<0,05$)

4.11.5. BV-2 hücrelerinde LPS'nin TNF- α indükleyici konsantrasyonlarının belirlenmesi

Bu deneyde, 24 saat süre ile 0,05-30 $\mu\text{g/mL}$ 'lik LPS'nin BV-2 hücrelerinde TNF- α indükleyici etkisi ELISA yöntemi ile araştırılmıştır. TNF- α seviyesinde en iyi induksiyona

sebeup olan LPS konsantrasyonu belirlenmeye çalışılmıştır. Araştırma bulguları Şekil 4.16’da gösterilmiştir. LPS uygulanmamış kontrol grubunda TNF- α seviyesi 278 ± 35 pg/mL olarak tespit edilmiştir. Uygulanan tüm LPS konsantrasyonları, TNF- α seviyesini kontrole göre arttırmıştır (5,7- 8,8 kat). Bu artış istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur (* $p<0,05$).

0,05-1 $\mu\text{g/mL}$ ’lik LPS uygulanan BV-2 hücrelerinde, TNF- α düzeyinin konsantrasyon ile doğru orantılı şekilde arttığı, 1 $\mu\text{g/mL}$ ’dan yüksek LPS konsantrasyonlarında ise, TNF- α seviyesinin 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS uygulamasına göre azaldığı belirlenmiştir. 5-30 $\mu\text{g/mL}$ LPS uygulamalarında BV-2 hücrelerinde % 15-18 oranında hücre ölümünün belirlenmiş olması (Şekil 4.13), bu durumun hücre ölümü ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. En yüksek TNF- α indüksiyonu 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS konsantrasyonunda tespit edilmiştir (2455 ± 96 pg/mL). 1 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda LPS ile 24 saat inkübe edilen BV-2 hücrelerinde belirgin bir sitotoksik etki gözlenmemiş olması ve en yüksek TNF- α indüksiyonunun bu uygulama süresi ve konsantrasyonda sağlaması nedeniyle, bundan sonraki çalışmalarda BV-2 hücreleri, 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS ile 24 saat muamele edilmiştir.



Şekil 4.16. Farklı konsantrasyonlarda 24 saat LPS uygulamalarının BV-2 hücrelerinde TNF- α seviyesine etkileri (Kontrol: Uygulama yapılmamış BV-2 hücreleri) (*: Kontrole göre $p<0,05$)

4.11.6. Bitki ekstraktlarının TNF- α indüksiyonunu engelleyici etkisi

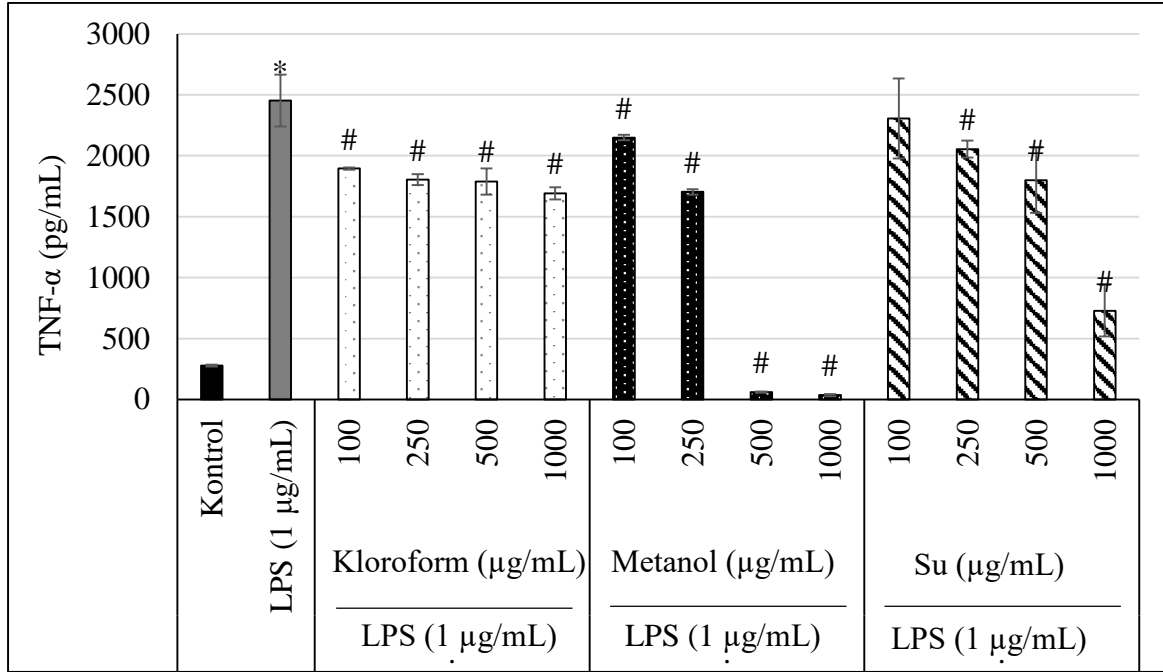
Ekstraktların nöral inflamasyonda anti-inflamatuar etkilerini ortaya koymak için, 100, 250, 500 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda *G. corniculatum* ekstraktlarının 24 saat süre ile uygulanmasının ardında 24 saat 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS ile muamele edilen BV-2 hücrelerinde, bitki

ekstraktlarının TNF- α indüksiyonunu engelleyici etkileri ELISA yöntemi ile belirlenmiş ve dolayısıyla anti-inflamatuar özellikleri ortaya konulmuştur. Bulgular, Şekil 4.17’de gösterilmiştir.

TNF- α seviyesi, kontrol grubunda (uygulama yapılmamış BV-2 hücreleri) 278 ± 8 pg/mL, 1 μ g/mL LPS uygulanan BV-2 hücre grubunda ise 2453 ± 212 pg/mL’dir (kontrole göre ~10 kat artış). Bu sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildiğinde, 1 μ g/mL LPS uygulanan grupta TNF- α seviyesindeki artışın kontrol grubuna göre anlamlı olduğu görülmüştür ($*p<0,05$). Bu sonuç, nöral inflamatuvar hücre modelinin oluşturulabildiğini göstermiştir.

Her üç bitki ekstraktının da BV-2 hücrelerinde LPS kaynaklı TNF- α artışını engelleyici etkisinin olduğu tespit edilmiştir (su ekstresinin 100 μ g/mL konsantrasyonu hariç). Ekstrelerin konsantrasyonlara göre anti-inflamatuar etkileri değerlendirildiğinde, tüm ekstrelerin artan konsantrasyonla orantılı olarak LPS kaynaklı TNF- α indüksiyonunu engellediği saptanmıştır. 100 μ g/mL konsantrasyonda kloroform (LPS uygulanan gruba göre % 23 oranında engelleme), 250-1000 μ g/mL’lik konsantrasyonda ise metanol ekstresi diğer ekstreler göre daha etkin anti-inflamatuar etki göstermiştir (LPS uygulanan gruba göre sırasıyla, % 30, 97 ve 98 oranında engelleme). Su ekstresinin 100 μ g/mL konsantrasyonu ($p>0,05$) dışındaki tüm ekstre uygulamalarında LPS ile uyarılan BV-2 hücrelerine göre TNF- α seviyelerinin anlamlı derecede düşük olduğu istatistiksel olarak da t-Test analizi ile kanıtlanmıştır ($\#p<0,05$). Yapılan istatistiksel analizde (tek yönlü varyans analizi) 500 ve 1000 μ g/mL konsantrasyonlarda gösterdikleri etkiler dikkate alındığında metanol ekstresinin su ve kloroform ekstresine göre farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Ancak, bu uygulamaların yapıldığı hücre gruplarında, TNF- α seviyelerinin kontrol grubunun da altında olduğu dikkati çekmiştir. Bunun, metanol ekstresinin LPS ile uygulanmasının BV-2 hücrelerinde yüksek oranda öldürücü olmasından kaynaklı olabileceği tahmin edilmektedir. MTT ile belirlenen sitotoksosite sonuçları da bunu desteklemiştir (Şekil 4.15). Bu nedenle, su ekstraktının 1000 μ g/mL konsantrasyonunun TNF- α indüksiyonunu daha etkin şekilde engellediği söylenebilir (LPS uygulanan gruba göre % 70 oranında engelleme).

Korelasyon analizlerine ilişkin verilerimiz, ekstrelerdeki oleamid ve tetrahidroberberin oranları ile TNF- α indüksiyonunu engelleyici etki arasında anti-inflamatuar ve apoptoz baskılayıcı etki arasında pozitif yönlü bir ilişkinin olduğunu işaret etmiştir (sırasıyla $r=0,1$; $r=0,8$).



Şekil 4.17. *G. corniculatum* ekstraktları ve LPS'nin BV-2 hücrelerinde TNF- α seviyesine etkileri (Kontrol: Uygulama yapılmamış BV-2 hücreleri) (*: Kontrole göre $p<0,05$)

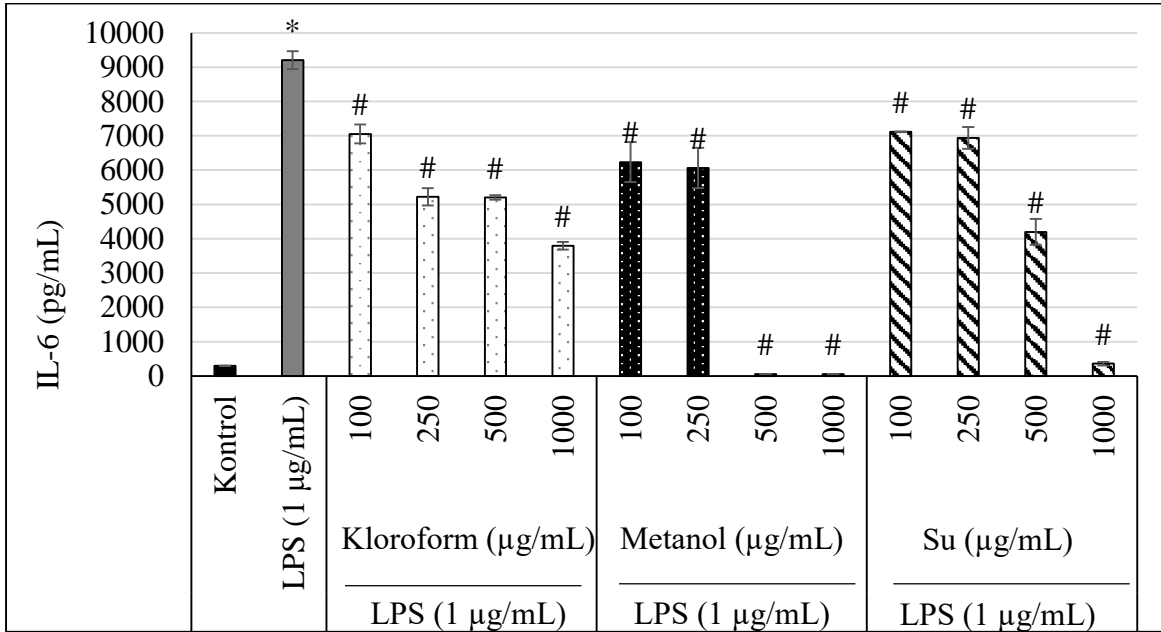
4.11.7. Bitki ekstraktlarının IL-6 indüksiyonunu engelleyici etkisi

Bu çalışmada, *G. corniculatum* kloroform, metanol ve su ekstraktlarının BV-2 hücrelerinde LPS kaynaklı pro-inflamatuar IL-6 indüksiyonunu engelleyici etkileri ELISA yöntemi ile belirlenmiş ve dolayısıyla anti-inflamatuar etkileri ortaya konulmuştur. Sonuçlar, Şekil 4.18'de gösterilmiştir. IL-6 seviyesi, kontrol grubunda (uygulama yapılmamış BV-2 hücreleri) 296 ± 3 pg/mL, 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS uygulanan BV-2 hücre grubunda ise 9204 ± 258 pg/mL olarak belirlenmiştir (kontrol grubuna göre ~31 kat artış). Bu sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildiğinde, 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS uygulanan grupta kontrol grubuna göre IL-6 seviyesinde anlamlı bir artış olduğu görülmüştür (* $p<0,05$).

Her üç bitki ekstraktının da BV-2 hücrelerinde LPS kaynaklı IL-6 indüksiyonunu engelleyici etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Ekstraktların anti-inflamatuar etkilerinin, konsantrasyon artışı ile doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiştir. Tüm ekstre uygulamalarında LPS ile uyarılan BV-2 hücrelerine göre IL-6 seviyelerinin anlamlı derecede düşük olduğu istatistiksel olarak da kanıtlanmıştır (# $p<0,05$).

Konsantrasyonlara göre ekstrelerin IL-6 bakımından anti-inflamatuar etkileri değerlendirildiğinde, 250 µg/mL konsantrasyonda kloroform ekstresi (LPS uygulanan gruba göre % 43 oranında engelleme), 100, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda ise metanol ekstresi diğer ekstrele göre daha etkin anti-inflamatuar etki göstermiştir (LPS uygulanan gruba göre sırasıyla % 32, 98 ve 99 oranında engelleme). Yapılan varyans analizine göre 1000 µg/mL konsantrasyonda anti-inflamatuar etki bakımından metanol ekstresinin su ve kloroform ekstresine göre farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Fakat, metanol ekstresinin 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarının uygulandığı hücre gruplarında, IL-6 seviyelerinin kontrol grubunun da altında olduğu dikkati çekmiştir. Bu grupların IL-6 indüksiyonunu engelleyici etkilerinin gerçekte BV-2 hücreleri üzerinde gösterdikleri sitotoksik etkiden kaynaklanabileceği tahmin edilmektedir. MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksikite sonuçları da bu durumu desteklemiştir (Şekil 4.15). Su ekstresinin anti-inflamatuar etkisinin ise hücre canlılığındaki azalmadan kaynaklanmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle, su ekstraktının 1000 µg/mL konsantrasyonunun IL-6 üzerinde en etkin anti-inflamatuar etkili uygulama olduğu söylenebilir (LPS uygulanan gruba göre % 96 oranında engelleme).

Korelasyon analizlerine ilişkin verilerimiz, ekstrelerdeki oleamid ve tetrahydroberberin oranları ile IL-6 indüksiyonunu engelleyici etki arasında anti-inflamatuar ve apoptoz baskılayıcı etki arasında pozitif yönlü bir ilişkinin olduğunu işaret etmiştir (sırasıyla $r=0,4$; $r=0,6$).



Şekil 4.18. *G. corniculatum* ekstraktları ve LPS'nin BV-2 hücrelerinde IL-6 seviyesine etkileri (Kontrol: Uygulama yapılmamış BV-2 hücreleri) (*: Kontrolle göre $p<0,05$) (#: H₂O₂ grubuna göre $p<0,05$)

Sonuçlar değerlendirildiğinde, hem TNF- α hem de IL-6 pro-inflamatuar sitokinleri üzerinde ekstrelerin konsantrasyona bağlı olarak anti-inflamatuar etki gösterdiği, en etkin anti-inflamatuar etkiye ise su ekstresinin 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonunun sebep olduğu belirlenmiştir.

AChE, apoptoz ve inflamasyon yollarına ilişkin sonuçlarımız değerlendirildiğinde, *G. corniculatum* ekstrelerinin her üç yolda da etki gösterdiği, AChE-i özellik dikkate alındığında metanol ekstresinin, apoptozu baskılayıcı ve anti-inflamatuar özellik dikkate alındığında ise su ekstresinin diğer ekstrele göre daha etkin olduğu tespit edilmiştir.





5. TARTIŞMA

Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS), Huntington, Alzheimer (AH) ve Parkinson hastalığı da dahil olmak üzere akut ve kronik nörodejeneratif hastalıklar, yüksek morbidite ve mortalite oranlarına sahiptir (Prusiner, 2001; Friedlander, 2003). Bugün, nörodejeneratif hastalıklar için birçok semptomatik tedavi mevcut olmasına karşın, hastalıkların seyrini geri döndürebilecek bir tedavi sözkonusu değildir (Chen ve Pan, 2014).

Nörodejeneratif hastalıklar, hastalığın ilerlemesinin farklı aşamalarında ortak semptomolojik özellikler gösterebilir. Nörodejeneratif hastalıkların ana fizyolojik semptomları arasında yüksek oksidatif stres, proteinlerin yanlış katlanması / agregasyonu, kolinerjik iletimin kaybı, inflamasyon ve nöral ölüm yer almaktadır (Winner, Kohl ve Gage, 2011; Nakamura ve Lipton, 2007). Bu nedenle nörodejeneratif hastalıkların terapötik yaklaşımları arasında ortak mekanizmalar üzerinde etkili bileşiklerin keşfi ön plandadır.

Fitokimyasallar, nörodejenerasyonun önlenmesini sağlayabileceği gibi ilerlemesini de yavaşlatabilir. Aynı zamanda antioksidatif, anti-inflamatuar ve antiamiloidogenik özellikler ile çoklu patolojik süreçleri hedefleyebildiklerinden terapötik yaklaşımlar için yüksek potansiyele sahiptir. Çeşitli bitkisel sekonder metabolitlerin mitokondriyal stresi, apoptotik faktörleri, serbest radikal süpürücü sistemi ve nörotrofik faktörleri de düzenlediği bilinmektedir (Venkatesan, Ji ve Kim, 2015). Daha önce yapılmış birçok çalışma, fitokimyasallar ile tedavinin, zihinsel ve fiziksel performansı iyileştirerek, nöronal hücre sağkalımını arttırarak ve antioksidan sistemi güçlendirerek sağlığa yararlı olduğunu bildirmiştir (Essa ve diğerleri, 2012; Howes ve Houghton, 2012).

Bu tez çalışmasında nörolojik hastalıkların ortak mekanizmaları üzerinde iyileştirici ve koruyucu etkiye sahip alternatif bitkisel ajanların keşfine yönelik deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında geleneksel tıpta hafıza arttırıcı ve anti-travmatik olarak kullanılan (Belfiglio, 2015; Al-Qura'n, 2009, Ahmed ve diğerleri, 2013; Orhan ve diğerleri, 2004) ve Türkiye'de yaygın olarak yayılış gösteren *G. corniculatum* bitkisinden farklı çözücüler ile elde edilen ekstralarının, hidrojen peroksit (H₂O₂) ile nöral dejenerasyona uğratılmış nörit benzeri farklılaştırılmış PC12 hücrelerinde (fPC12) AChE ve apoptoz; lipopolisakkarit (LPS) ile inflamasyon oluşturulmuş BV-2 hücrelerinde ise inflamasyon yolları üzerinde etkisi araştırılmıştır.

Çalışmalar, bitki ekstraktlardaki kimyasal madde içeriğinin, kullanılan çözücüye göre değiştiğini göstermiştir. Maddelerin kimyasal yapılarındaki değişiklikler, çözücüler içinde çözünebilme özelliklerini değiştirmekte ve böylece farklı çözücüler ile hazırlanan ekstraksiyonlarda farklı kimyasal profiller ortaya çıkabilmektedir. Bitki metabolitleri ile yapılan çalışmalarda metabolik kapsamı genişletmek adına farklı çözücüler ile hazırlanan ekstraktlar kullanıldığından (Wolfender ve diğerleri, 2013) tez çalışması kapsamında *G. corniculatum*'un kloroform, metanol ve su ektreleri hazırlanmış ve deneysel çalışmalar bu üç ekstrenin farklı konsantrasyonları kullanılarak yapılmıştır.

Bitkisel kaynaklı biyoaktif bileşikler tanenler, alkaloidler, fenolik bileşikler, glikozitler, linyanlar, terpenoidler gibi çeşitli kimyasal gruplara aittir (Zhao, Wu ve Wang, 2015). Bu grupların çözünebilme potansiyelleri çözücünün yapısına göre değişkenlik gösterir. Polarite indeksi, bir çözücünün nispi polaritesinin ölçüğü niteliğindedir. 5'ten daha az polarite indeksine sahip çözücüler, polar olmayan çözücü olarak kabul edilirken; % 5'ten daha fazla polarite indeksine sahip çözücüler, polar çözücü olarak kabul edilir. Kloroform, 4,1 polarite indeksine sahip olması sebebiyle polar olmayan bileşiklerin ekstraksiyonunda etkili bir çözücüdür. Su ise 10,2 polarite indeksine sahip olması sebebiyle polar bileşikler için iyi bir çözücüdür. Metanol, 5,1 polarite indeksine sahiptir. Bu nedenle hem polar hem de polar olmayan bileşikler için çözücü özellik gösterir (Ngo, Scarlett, Bowyer, Ngo ve Vuong, 2017; İnt-8). Tüm alkoller arasında sadece metanolün 65 °C gibi düşük bir kaynama noktasına sahip olması Soxhlet gibi çözücünün buharlaştırılması yoluyla ekstre elde etme yöntemlerinde ekstraksiyonu kolaylaştıran bir etmendir (İnt-8).

Bitkisel ekstraksiyonlarda elde edilen ekstre verimi, terapötik ve / veya protektif etken maddelerin miktarı için kaynak teşkil etmektedir (Goktas, Sahin ve Yigitarslan, 2015). Bu nedenle elde edilen ekstre verimi, bitkisel kaynaklı araştırmalar için önemlidir. Çalışmamızda, *G. corniculatum* bitkisinin elde edilen kloroform, metanol ve su ekstraktları verim bakımından karşılaştırıldığında, ekstre veriminin metanol (% 49,0) > su (% 39,2) > kloroform (% 13,9) şeklinde olduğu dikkati çekmiştir. Metanol ekstresindeki ekstre veriminin diğer ekstrelerle göre daha yüksek oluşu, metanolde hem polar hem de polar olmayan bileşiklerin çözünebilmesi ve metanolün ekstraksiyonu kolaylaştıran bir çözücü olması ile ilişkili olabilir. Nörodejeneratif hastalıklar üzerinde etkin olabilecek biyobileşenlerin eldesinde, yüksek verimde ekstre elde ettiğimiz metanolün, çözücü olarak kullanımı önerilebilir.

Çalışmada kullanılan *G. corniculatum*, tıbbi ve aromatik özellikleri ile öne çıkan *Papaveraceae* familyası üyesidir. Aynı familya üyelerine ait ekstre verimleri ile ilgili bulgularda, metanol çözücüsü ile hazırlanan ekstrelerin % 7,9-35,6, su ekstrelerinin ise 5,1-9,3 olduğu belirlenmiştir (Alali ve diğerleri, 2013; Sourabie ve diğerleri, 2012; Jimoh, Adedapo, Aliero ve Afolayan, 2010; Shang ve diğerleri, 2015). Çalışmamızda, *G. corniculatum* metanol ve su ekstre verimleri, literatürlerde belirtilen *Papaveraceae* familyasına ait diğer türlere göre daha yüksek bulunmuştur. Biyoteknolojik olarak kullanılma potansiyeli olan bitkiler için yüksek ekstraksiyon veriminin aktif bileşenlerin maksimum verimlilikle elde edilebilmesi için avantaj sağlayabileceği bildirilmiştir (Ericsson, Peredo ve Nistér, 2007). Bu nedenle, aynı familyanın farklı türleri ile benzer bileşenleri bulundurma potansiyeli olan *G. corniculatum*, diğer türlere kıyasla daha yüksek ekstre verimine sahip olması bakımından avantaj sağlayabilir.

Bitkisel kaynak araştırmalarında ekstre içeriklerinin bilinmesi, etkiye sebep olan bileşiklerin belirlenebilmesi için çok önemlidir. *G. corniculatum* ekstrelerinde toplam alkaloid, flavonoid ve fenolik bileşik miktarlarına ilişkin bulgularımızda, tüm ekstrelerde majör bileşiğin alkaloid olduğu, diğer bileşiklerin ise dikkate değer bulunmayacak düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre, ekstrelerin aktivitelerinden kaynaklanan etkinin alkaloid içerikleri tarafından sağlandığı söylenebilir. Ekstreler göre alkaloid miktarlarının metanol (112 mg/g ekstre) > kloroform (109 mg/g ekstre) > su (93 mg/g ekstre) şeklinde olduğu bulunmuştur. *G. corniculatum* metanol ve kloroform ekstrelerinde su ekstresine göre daha yüksek miktarda alkaloidin belirlenmiş olması, alkaloidlerin organik yapıda bileşikler olduğunu ve metanol, kloroform gibi organik çözücülerde iyi çözünebildiğini belirten literatürler ile uyumludur (Hesse, 2002: 24-26; İnt-7). Çalışmamızda kullanılan *G. corniculatum* ile aynı lokaliteden farklı tarihte toplanan bitkilerden elde edilen metanol ve su ekstrelerinin total alkaloid miktarları sırasıyla 101 ve 77 mg/g ekstre olarak tespit edilmiştir (Koçancı ve diğerleri, 2017). Buna göre aynı lokaliteden farklı tarihlerde toplanan *G. corniculatum* örneklerinde, alkaloid miktarının yaklaşık aynı olduğu söylenebilir. Çalışmamız kapsamında, *G. corniculatum* ekstrelerinde flavonoid ve fenolik bileşik miktarlarının alkaloid miktarına göre çok düşük olduğu tespit edilmiştir. Yine farklı tarihlerde toplanan *G. corniculatum*'un metanol ve su ekstresindeki flavonoid ve fenolik bileşik miktarlarının çalışma sonuçlarımıza yakın bulunmuş olması (Koçancı ve diğerleri, 2017) bulgularımızı desteklemiştir.

Çalışmamız kapsamında *G. corniculatum* ekstrelerinin muhtemel bileşen içerikleri GC-MS ve HPLC ile analiz edilmiştir. Her üç ekstrede de yağ asitleri ve alkaloidlerin varlığı tespit edilmiştir. Bu sonuç, *Papaveraceae* familyasının yağ asitleri ve alkaloid bakımından zengin olduğunun belirtildiği literatürlerle paralellik göstermiştir (Preininger 1985:23-37; Yu ve diğerleri, 2014; Marin ve diğerleri, 1989). GC-MS verilerimizde her üç ekstrede de alkaloid bileşik içeriğinin diğer bileşiklere kıyasla yüksek olduğu ve majör alkaloidin allokriptopin (% 35,7-51,6) olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda, ekstrele göre allokriptopin miktarlarının metanol > su > kloroform şeklinde olduğu bulunmuştur. Bu durum, alkaloidlerin organik çözücülerde iyi çözünebildiğini belirten literatürler ile uyumludur (Hesse, 2002: 24-26; İnt-7). *G. corniculatum* majör alkaloidi olarak tespit edilen ve [1,3]Benzodioxolo[5,6-e][2]benzazecin-14(6H)-one, 5,7,8,15-tetrahydro-3,4-dimethoxy-6-methyl olarak da bilinen allokriptopin, bir izokinolin alkaloididir (Onda ve Takahashi, 1989: 181-209). Allokriptopin için esas bitkisel kaynaklarının, *Papaveraceae* (*Argemone*, *Bocconia*, *Eschscholtzia*, *Glaucium*, *Macleaya*, *Sanguinaria*, *Chelidonium*, *Papaver*, *Hylomecon*, *Stylomecon*), *Fumariaceae* (*Corydalis*, *Dactylicapnos*), *Ranunculaceae* (*Thalictrum*), *Rutaceae* (*Fagara*), *Berberidaceae* (*Berberis*), *Sapindaceae* (*Pteridophyllum*) olduğu kaydedilmiştir (Capasso ve diğerleri, 2002). Bulgularımız da bu literatürü desteklemektedir. Novak ve diğerleri (1972) ve Doncheva ve diğerleri (2014) tarafından yapılan çalışmada, *G. corniculatum* ekstraktlarında allokriptopinin majör alkaloid olduğu, Manske (1960:393) ve Israilov ve diğerleri (1983:714-716)'nin çalışmalarında da *G. corniculatum* ekstrelerinde allokriptopinin tespit edildiği vurgulanmıştır. Ancak allokriptopinin majör bileşen olarak belirlendiği ekstrelerin, nörodejeneratif ve inflamatuvar hücre modellerinde etkilerinin ortaya konulduğu bir çalışma mevcut değildir. Bu bakımdan çalışmamız ilk olma özelliğini taşımaktadır.

Ekstrelerdeki yağ asidi miktarlarının metanol > kloroform > su şeklinde olduğu belirlenmiştir. Bu durum, yağ asitlerinin metanol ve kloroform gibi organik çözücülerde iyi; suda az çözüldüğünü belirten çalışmalar ile desteklenmiştir (Kolb ve Brown, 1955; Ralston ve Hoerr, 1942). Çalışmamız kapsamında, kloroform ekstresinde oktadekadienoik asit ve su ekstresinde oktadesenamid yağ asidinin majör olarak tespit edilmiş olması, *G. corniculatum* majör yağ asitlerinin oktadekadienoik asit, oktadekenoik asit ve hegzadekanoik asit olduğunu belirten yayınlar ile de benzerlik göstermiştir (Marin ve diğerleri 1989). Yağ asitlerinin anti-inflamatuvar ve anti-oksidan etkileri sebebiyle nörodejeneratif hastalıklar üzerinde etkili olduklarını gösteren literatürler olmasına karşın (Oh ve diğerleri, 2010, Lei,

Vacy ve Boon, 2016), yağ asitleri bakımından *G. corniculatum* ekstralarının bu mekanizmalar üzerinde etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu konuda çalışmamızda elde edilen veriler özgün değerdedir.

Tez çalışması kapsamında, *G. corniculatum* ekstralarının AChE inhibisyonuna ve nöral apoptoza etkileri, fPC12 hücreleri üzerinde incelenmiştir. PC12 hücreleri sinir hücresi kökenli olmamasına rağmen, NGF eşliğinde farklılaşarak nörit benzeri sinir hücreleri haline gelmektedir (Levi ve diğerleri, 1985; Greene ve Tishler, 1976). fPC12 hücreleri, oksidatif strese bağlı nörodejeneratif hastalık mekanizmalarının araştırılmasında hücre modeli olarak kullanılmaktadır (Bai ve diğerleri, 2002). Çalışmamız sırasında, 100 ng/mL NGF ile 4 gün muamele edilen PC12 hücreleri, nörodejeneratif hücre modeli olarak kullanılmıştır.

Çalışmamızda, ekstraktların test edildiği fPC12 hücreleri oksidatif stres kaynağı olduğu bilinen H₂O₂ ile muamele edilerek, oksidatif stres kaynaklı nörodejeneratif hücre modelinin oluşturulabilmesi amaçlanmıştır. Benzer çalışmalarda da fPC12 hücreleri ile nörodejeneratif hücre modelinin oluşturulmasında H₂O₂ yaygın olarak kullanılmaktadır (Ao ve diğerleri, 2014; Li ve Li, 2015; Ma, Liu, Xun ve Zhang, 2014). H₂O₂'nin düşük konsantrasyonlarda hücrelerde nörodejenerasyona sebep olmadığı, yüksek konsantrasyonlarda ise sitotoksik etki yaratarak hücre sağkalımını önemli ölçüde azalttığı ve nörodejenerasyona sebep olduğu belirtilmiştir (Jiang ve diğerleri, 2003). Yüksek sitotoksik etkiye maruz kalan hücre modellerinde, etkenlerin terapötik / protektif etkilerine ilişkin veriler yanıltıcı olabileceğinden, H₂O₂'nin PC12 hücreleri üzerinde yüksek sitotoksik etki göstermeyecek, ancak, oksidatif strese bağlı nörodejenerasyon belirleçlerinde artışa sebep olacak etkin konsantrasyonlarının belirlenmesine yönelik sitotoksikite çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, H₂O₂ PC12 hücre canlılığını konsantrasyon ve uygulama süresi ile doğru orantılı şekilde azaltmıştır. ISO 10993-5 standartlarına göre, *in vitro* olarak test edilen kimyasalların sitotoksik etki düzeylerini belirlemek için dört nitel sınıflandırma grubu temel alınmıştır. Bu standartta yüksek derecede sitotoksik etki gösteren maddelerin toplam hücre konsantrasyonunun % 50'nin üzerinde hücre ölümüne sebep olduğu belirtilmişken, orta derecede sitotoksik etki gösteren maddelerin, % 50-79; hafif sitotoksik etki gösteren maddelerin, % 80-89; sitotoksik olmayan maddelerin ise % 90'a eşit veya daha fazla hücre canlılığı sağladığı belirtilmiştir (ISO, 2009). Çalışmamız verilerinde 200 µM ve üzerindeki tüm H₂O₂ konsantrasyonlarının ve 100 µM H₂O₂'nin 48 saatlik uygulamasının, PC12 hücreleri üzerinde yüksek derecede sitotoksik etkiye sebep olduğu (≥ % 50 hücre ölümü),

diğer uygulamaların ise yüksek derecede sitotoksik etkiye sebep olmadığı belirlenmiştir. H₂O₂'nin PC12 hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri ile ilgili sonuçlarımıza benzer bulgular literatürde de mevcuttur: 24 saat 100-1000 µM H₂O₂'nin PC12 hücre canlılığı üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, H₂O₂'nin konsantrasyona bağlı hücre canlılığını azalttığı (kontrolle göre % 10-80 hücre ölümü) kaydedilmiştir (Ma ve diğerleri, 2014). Çalışmamız sonucunda tespit ettiğimiz, artan H₂O₂ konsantrasyonuna bağlı PC12 hücre canlılığı azalması, benzer şekilde literatür ile uyumlu bulunmuştur (Pera ve diğerleri, 2013). H₂O₂'nin sebep olduğu yüksek sitotoksik etkinin apoptozdan çok nekroza sebep olduğu literatürde gösterilmiştir (Hampton ve Orrenius, 1997; Nosseri, Coppola ve Ghibelli, 1994; Tochigi ve diğerleri, 2013). Çalışma sonuçlarımızda elde edilen verilere dayanarak, daha sonraki çalışmalarda yüksek toksik etki göstermeyen 50 ve 100 µM H₂O₂ konsantrasyonlarının 24 saatlik uygulaması, fPC12 hücrelerinde nörodejeneratif hücre modelinin oluşturulmasında tercih edilmiştir.

Tıbbi bitkilerin çeşitli hastalıklar üzerinde terapötik / protektif etkilerini gösteren birçok bulgu olmasına karşın, bazı bitkisel bileşenlerin toksik özellikleri sebebiyle kullanımları uygun bulunmamaktadır (Gadano, Gumi ve Carballo, 2006). Bu nedenle, potansiyel terapötik / protektif ajanların yüksek derecede sitotoksik etkisinin olmaması beklenmektedir. Tez çalışmamız sırasında *G. corniculatum* ekstrelerinin sitotoksik etkilerinin olup olmadığı, PC12 hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelenerek belirlenmiştir. Sonuçlarımızda, tüm bitki ekstrelerinin konsantrasyon ve uygulama süresi ile doğru orantılı olarak hücre canlılığını azalttığı, fakat, ekstrelerin uygulanan en yüksek konsantrasyon ve sürede (1000 µg/mL 24 saat) dahi % 50'nin üzerinde hücre ölümüne sebep olmadığı tespit edilmiştir. US NCI bitki tarama programına göre, ham bitki özütlerinin *in vitro* sitotoksik etkinliğe sahip olması için, hücrelerin % 50'sinin ölümüne sebep olan konsantrasyonun ≤ 20 µg/mL olması gerekmektedir (Sriwiryajan, Ninpesh, Sukpondma, Nasomyon ve Graidist, 2014). Çalışmamız sonucunda, *G. corniculatum* kloroform, metanol ve su ekstrelerinin en uzun süreli uygulamalarında dahi hücrelerin % 50'sinin ölümüne sebep olan konsantrasyonunun 20 µg/mL'den yüksek olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla 1616, 1196 ve 1103 µg/mL). Bu bilgiye dayanarak, ekstrelerinin PC12 hücreleri üzerinde yüksek sitotoksik etkisinin olmadığı söylenebilir. *G. corniculatum* ekstrelerinin PC12 hücreleri üzerinde yüksek derecede sitotoksik etki göstermemiş olması, nörodejeneratif hasarlar için tedavi edici / önleyici ajan olarak kullanılabilmesi açısından önem arz etmektedir.

Çalışmamız kapsamında fPC12 hücrelerine H₂O₂ uygulaması ile oluşturulan *in vitro* nörodejeneratif hücre modeline *G. corniculatum* ekstreleri uygulanarak, ekstrelerinin AChE, nöral apoptoz ve nöral inflamasyonda etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu modelde hedef yollarda en etkin olabilecek ve sitotoksik etkisi olmayan ekstre konsantrasyon ve uygulama sürelerinin belirlenebilmesi için H₂O₂'nin ardından uygulanan ekstrelerin PC12 hücre canlılığı üzerinde etkileri araştırılmıştır. Sitotoksik etki, ISO 10993-5 standartlarına göre belirlenmiştir (hücre ölümü, \geq % 50 ise yüksek derecede sitotoksik, % 50-21 ise hafif derecede sitotoksik, % 20-11 ise hafif derecede sitotoksik, \leq % 10 ise sitotoksik değil). Standartlar esas alındığında, uygulamaların hiçbirinde % 50'nin üzerinde hücre ölümünün olmadığı belirlenmiştir. H₂O₂ ile birlikte uygulanan bitki ekstrelerinin, uygulanan en yüksek konsantrasyon ve sürede dahi, ISO 10993-5 standartlarına göre PC12 hücreleri üzerinde yüksek sitotoksik etkisinin olmadığı görülmüştür. Bitki ekstrelerinin düşük konsantrasyonları (100 ve 250 µg/mL), H₂O₂'nin sebep olduğu hücre ölümünü kısmen gidererek (% 9-28 oranında engelleme) PC12 hücrelerini oksidatif hasardan koruyucu etki göstermiştir. Ekstrelerin yüksek konsantrasyonlarında H₂O₂'ye karşı koruyucu etkinin gözlenmemiş olmasının, bu konsantrasyonlardaki sitotoksik etkileri ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. *G. corniculatum* ekstrelerinin oksidatif strese karşı nörokoruyucu etkisinin gösterilmiş olması, nörodejeneratif hastalıklarda oluşan nöron kayıplarını engelleyici bir ajan olarak kullanılabilme potansiyeli bakımından önemlidir.

En sık görülen nörodejeneratif hastalık olan AH'de en önemli patolojik belirteçlerden biri, kolinerjik iletim kaybına sebep olan AChE enzim artışıdır (Mufson, Counts, Perez ve Ginsberg, 2008). Bu nedenle AH'nin tedavisinde / önlenmesinde etkili olabilecek ajanların AChE-i özellik göstermeleri önemlidir. Mevcut AChE-i ilaçların nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde tam anlamıyla başarı sağlayamadığını ve nörodejeneratif hastalıklar için tespit edilecek etken maddelerin tek bir mekanizma üzerinden etkili olmasının yeterli olmayacağını belirten literatürler mevcuttur (Birks, 2006; Bakar ve Yuluğ, 2009; Sherwin 2000, Chertkow, 2002). Yine de bugün AH'nin ilaçla tedavisinde en geçerli stratejinin AChE inhibisyonu olması sebebiyle, nörodejeneratif hastalıklar üzerinde etkin maddelerin keşfi için AChE-i özellik, önemli bir belirteçtir (Anand ve diğerleri, 2014). Çalışmamız kapsamında, 100, 250, 500 ve 1000 µg/mL *G. corniculatum* ekstrelerinin *in vitro* AChE-i özelliklerinin olduğu belirlenmiştir (% 23-90). Bulgularımız, tüm ekstrelerde AChE-i özelliğin konsantrasyon ile doğru orantılı şekilde arttığını ve maksimum inhibitör etkinin denenen en yüksek konsantrasyon olan 1000 µg/mL'de olduğunu göstermiştir. 1000

$\mu\text{g/mL}$ 'de *in vitro* AChE inhibisyonu metanol (% 90) > su (% 89) > kloroform (% 72) şeklinde olmuştur. Metanol ve su ekstralarının pozitif kontrol olarak kullanılan AChE inhibitörü galantamine (% 93) yakın etki gösterdiği de dikkat çekicidir. Farlow ve Hake'ye göre (2001) ideal bir AChE-i'nin yaklaşık % 60-80 oranında AChE inhibisyonu sağlaması gerekmektedir. Buna göre, *G. corniculatum* kloroform ekstresinin 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'sinin, metanol ve su ekstresinin ise 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ 'sinin ideal AChE inhibisyonu sağladığından bahsedilebilir. Çalışma sonuçlarımızda *G. corniculatum* kloroform, metanol ve su ekstralarının *in vitro* AChE inhibisyon etkisinin olduğu tespit edilmiş olup, farklı çözücülerden elde edilen ekstraların etkin konsantrasyonlarının farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bu durumun çözücüye bağlı aktif bileşen muhtevasının farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmamız ile *G. corniculatum*'un AChE inhibisyonunda iyi bir aday olarak kullanılabilir olduğu gösterilmiştir.

Sınırlı sayıda yapılan çalışmada, *G. corniculatum*'un kloroform:metanol (1:1) ekstresinin 10 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'de sırasıyla % 9 ve 87 (Orhan ve diğerleri, 2004); etanol ekstresinin 500 $\mu\text{g/mL}$ 'de % 100 oranında *in vitro* AChE inhibisyonu gösterdiği kaydedilmiştir (Jana, 2012). Buna göre, *G. corniculatum* metanol ve su ekstralarının kloroform:metanol (1:1) ekstresine kıyasla daha yüksek, kloroform ekstresinin ise daha düşük AChE-i özellik gösterdiği söylenebilir. *G. corniculatum*'un metanol, kloroform ve su ekstralarının etanol ekstresine göre daha zayıf AChE-i özellikte olduğu belirlenmiş olmasına karşın, kloroform, metanol ve su ekstresinin etanol ekstresine göre daha ideal AChE-i özellikte olduğu söylenebilir.

Tez çalışması kapsamında, fPC12 hücrelerinde oksidatif hasar yolu ile AChE aktivitesi indüklenmiş hücre modelinin oluşturulması amaçlanmıştır. Hücrelerde H_2O_2 gibi pro-oksidan maddeler ile teşvik edilen oksidatif stresin, AChE aktivitesi üzerinde indükleyici etki gösterdiği farklı çalışmalarla kanıtlanmıştır (Zhang ve diğerleri, 2008; Molochkina, Zorina, Fatkullina, Goloschapov ve Burlakova, 2005; Bond ve diğerleri, 2006). Ayrıca, H_2O_2 'in en kararlı ROS olduğu, hücre zarlarından geçebildiği ve çeşitli proteinlerin değişmesine neden olarak hücrede hasar oluşturabildiği, hücre membran yapısını ve aktivitesini değiştirerek hücre içinde AChE indüksiyonuna sebep olduğu gösterilmiştir (Li ve Jackson, 2002; Waldron ve Rozengurt, 2000; Knapp ve Klann, 2000; Molochkina ve diğerleri, 2005). Uygulanan H_2O_2 konsantrasyon ve süresinin AChE indüksiyon seviyesinde etkili olması nedeniyle (Garcia-Ratés, Lewis, Worrall ve Greenfield, 2013; Jiang, Zhang, Zhu, Li ve Zhang, 2007), çalışmamızda öncelikle fPC12 hücreleri üzerinde maksimum

AChE indüksiyonuna sebep olacak H₂O₂ konsantrasyon ve uygulama süresi araştırılmıştır. fPC12 hücrelerinde en yüksek AChE indüksiyonuna sebep olan H₂O₂ uygulamasının, 100 µM 24 saat olduğu tespit edilmiştir (kontrole göre ~1,6 kat artış). Bu artışın kontrol grubundaki AChE seviyesine göre farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Çizelge 4.1). Bir çalışmada, 100 µM H₂O₂'nin, PC12 hücrelerinin AChE aktivitesinde kontrole göre yaklaşık 1,4 katlık artışa sebep olduğu ve bu artışın hücrede oksidatif stres artışı ile ilişkili bulunduğu kaydedilmiştir (Jiang ve diğerleri, 2007). Buna göre, çalışmamızda denenen H₂O₂ konsantrasyon ve uygulama süresi ile nörodejeneratif hücre modelinin başarıyla oluşturulduğu söylenebilir.

Çalışmamız kapsamında, *G. corniculatum* ekstrelerinin hücrel AChE aktivitesi üzerinde etkisi üç farklı şekilde incelenmiştir: Ekstrelerin nörodejeneratif hastalıklara karşı güvenilir bir şekilde kullanılıp kullanılmayacağı belirlenmesi için hücrel AChE indükleyici aktivitesi; H₂O₂ kaynaklı AChE indüksiyonunu giderici özelliklerinin olup olmadığının belirlenmesi için, hücrel AChE inhibitör etkisi ve H₂O₂ kaynaklı AChE indüksiyonundan koruyucu özelliklerinin olup olmadığının belirlenmesi için, hücrel AChE indüksiyonu engelleyici etkisi incelenmiştir (Çizelge 4.2). Sonuçlara göre, üç ekstrenin de hücrel AChE indükleyici etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Hücrel AChE indüksiyonunun kolinerjik iletim kaybına sebep olarak nörodejeneratif süreçlerde etkili olduğunu gösteren çalışmalar (Francis ve diğerleri, 1999) dikkate alındığında, *G. corniculatum* ekstrelerinin nörodejeneratif etkilerinin olmadığı ve nörolojik hasarlara karşı güvenilir bir şekilde kullanımının mümkün olabileceği söylenebilir. Ekstrelerin hücrel AChE inhibitör özelliği değerlendirildiğinde, metanol ve su ekstresinin H₂O₂ uygulanan gruba göre AChE inhibitör özelliklerinin olduğu ($p<0,05$) (sırasıyla, % 31, 24 inhibisyon), kloroform ekstresinin ise istatistiksel olarak anlamlı bir inhibitör etkisinin olmadığı ($p>0,05$) (% 10 inhibisyon) saptanmıştır. fPC12 hücreleri üzerinde AChE-i etkilerinin Ellman metodu ile araştırıldığı çalışmalarda, AChE-i olarak kullanılan genisteinin yaklaşık % 4-33, huperzine A'nın yaklaşık % 40 AChE inhibisyon gösterdiği belirtilmiştir (Liu ve diğerleri, 2018a; Tang, Wang ve Tang, 2005). Buna göre, *G. corniculatum* metanol ve su ekstrelerinin AChE-i olarak kullanılan maddelere yakın etkilerinin olduğu dikkat çekicidir. Bu sonuçlar, *G. corniculatum* metanol ve su ekstrelerinin AChE mekanizması ile nörodejenerasyonu giderici bir ajan olarak kullanılabilir olduğunu düşündürmüştür. Ekstrelerin AChE indüksiyonunu engelleyici etkilerine ait verilerde, üç ekstrenin de AChE aktivitesindeki artışı önleyici özellikte olduğu saptanmıştır (kloroform ekstresinde % 36, metanol ekstresinde % 43, su

ekstresinde % 38 engelleme). Çalışmamızda, *G. corniculatum* ekstrelerinin AChE indüksiyonunu engelleyici etkileri ilk defa gösterilmiştir. AChE'nin inhibe edilmesi ve AChE indüksiyonunun engellenmesi ile nöroproteksiyonun sağlanabildiği yönündeki kanıtlar (Murray ve diğerleri, 2013), AChE'yi nörodejenerasyonun önlenmesi ve giderilmesi konusunda etkin yeni ajanların araştırılmasında bir belirteç haline getirmiştir. Buna göre sonuçlar, *G. corniculatum* ekstrelerinin hem hücrel AChE'yi inhibe edici hem de hücrel AChE indüksiyonunu engelleyici özellikleri nedeniyle nöroprotektif bir ajan olarak kullanılabilir olduğunu düşündürmüştür. *In vitro* sonuçlarda olduğu gibi hücrel AChE aktivitesi üzerine yapılan üç farklı incelemede de metanol ekstresinin diğer ekstreler göre daha etkin olduğu dikkati çekmiştir. Bu etkinin, ekstrelerdeki biyoaktif bileşik içerik farklılığından kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Çalışmamız, *G. corniculatum* ekstraktlarının hem nörodejeneratif hasarı giderici hem de nörodejeneratif hasarın oluşumunu engelleyici özelliklerinin olabileceğinin gösterildiği ilk çalışmadır. Nörodejeneratif hastalık patolojilerinin çoklu kaynağı, bu hastalıklara karşı ilaç alternatiflerinin araştırılmasında çok hedefli yaklaşımların avantajlı olduğunu göstermektedir (Piemontese, 2017). *G. corniculatum* ekstraktlarının AChE aktivitesi üzerinde gösterdiği etki, nörodejeneratif hastalıklarda hem önleyici hem de tedavi edici etkilerinin olabileceğinin gösterilmiş olması bakımından önemlidir. Yapılan analizlerde, *G. corniculatum* ekstrelerinin AChE indüksiyonundan koruyucu özelliklerinin AChE indüksiyonunu giderici özelliklerine göre daha iyi olduğu belirlenmiştir. Bu durum, ekstrelerin anti-oksidatif veya serbest radikal süpürücü etkilerinin olabileceğini düşündürmüştür. Zira, antioksidanların serbest radikalleri nötralize ederek nöron kayıplarına karşı terapötik etkiler gösterdiği kaydedilmiştir (Uttara, Singh, Zamboni ve Mahajan, 2009). Nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkışının önlenmesi veya geciktirilmesi, hastalık seyrinin yavaşlatılması açısından önemlidir (Post, 1999). Bu nedenle *G. corniculatum* ekstrelerinin henüz hastalık ortaya çıkmadan hastalığa sebep olabilecek toksik etkenlerin ortadan kaldırılmasında etkili olabileceğinin gösterilmiş olması önemli bir bulgudur.

Çeşitli çalışmalar, AChE'yi bazal seviyelerde ifade eden hücreler de dahil olmak üzere, oksidatif strese maruz kalmış çeşitli hücre tiplerinde, AChE ekspresyonunun hem gen hem de protein düzeyinde arttığını göstermiştir (Yang, He ve Zhang, 2002). AChE'nin aşırı ekspresyonunun, hücrelerin apoptoz duyarlılığını arttırdığı ve AChE ifadesinin azaltılması ile oksidatif stres kaynaklı nörodejenerasyonun giderilebileceği bildirilmiştir (Jin, He, Shi, Lu ve Zhang, 2004). Bu nedenle çalışmamızda, *G. corniculatum* ekstraktlarının AChE

üzerinde gen ve protein ifadesi düzeyinde inhibitör etkisinin ve bu etkinin nöral apoptozla ilişkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Ekstrelerin inhibitör etkilerinin belirlenebilmesi için öncelikle H₂O₂ uygulanması ile fPC12 hücrelerinde gen ve protein seviyesinde AChE indüksiyonu sağlanmaya çalışılmıştır. 100 µM 24 saat H₂O₂ uygulanan fPC12 hücrelerinde uygulama yapılmamış hücrelere göre, AChE ifadesinin gen düzeyinde 2,1, protein düzeyinde ise 1,9 kat arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.3, 4.4). Sonuçlarımız, H₂O₂'nin hücrel AChE indüksiyonuna sebep olduğunu gösteren çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (Xie ve diğerleri, 2011; Garcimartín ve diğerleri, 2017). Bu sonuçlar, uygulanan H₂O₂'nin hem gen hem de protein düzeyinde AChE indüksiyonunu sağlamada başarılı olduğunu ve nörodejeneratif hücre modelinin oluşturulması için uygun olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda, *G. corniculatum* ekstrelerinin H₂O₂'nin sebep olduğu AChE ifadesindeki artışı, inhibe ettiği tespit edilmiştir. AChE gen ve protein ifadesi üzerinde en etkin inhibitör etkiyi metanol ekstresinin 1000 µg/mL'lik konsantrasyonu göstermiştir (gen ifadesinde % 90, protein ifadesinde % 21 inhibisyon). Ekstrelerinin *in vitro* ve hücrel AChE inhibisyon etkisi ile ilgili sonuçlarımızda etkinin metanol > su > kloroform şeklinde olduğunu belirlenmesi, AChE'nin gen ve protein düzeyinde inhibisyonunda da en iyi etkinin metanol ekstresinde görülmüş olması ile uyumluluk göstermiştir. *G. corniculatum* ekstrelerinin gen ve protein düzeyinde AChE etkileri ilk kez çalışmamızla belirlenmiştir. Bir AChE-i olan lityumun PC12 hücrelerinin AChE mRNA ifadesinde yaklaşık % 50 inhibisyona sebep olduğu belirlenmiştir (Jing ve diğerleri, 2008). Buna göre, çalışmamızda *G. corniculatum* ekstrelerinin gen düzeyinde lityumdan daha etkin AChE inhibisyonu sağladığının belirlenmiş olması önemli bir bulgudur.

G. corniculatum ekstrelerinin AChE-i özellikleri ile ilgili genel bir değerlendirme yapacak olursak, Ellman, qRT-PCR ve western blot hibridizasyonu yöntemleriyle elde ettiğimiz veriler, birbirini destekler niteliktedir. Her üç yöntem ile yapılan analizlerde de metanol ekstresinin AChE mekanizmasında diğer ekstrele göre daha etkin olduğu dikkati çekmiştir. Bu durumunun ekstrelerdeki bileşik içerik farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Zira, ekstrelerin AChE-i özellikleri ile allokrriptopin, rutin ve kuersetin içerikleri arasında ilişki olabileceği göze çarpmıştır.

AChE'nin aşırı ekspresyonunun, hücrelerin apoptoz duyarlılığını arttırabildiğine ve AChE ekspresyonunun engellenmesi ile hücrelerin apoptozdan kurtarılabilmesine ilişkin bilgiler vardır (Jin ve diğerleri, 2004). Bu durum, AChE'nin nörodejeneratif ölüm mekanizmalarında

önemli bir rol oynadığını gösterir. Çalışmamız kapsamında, *G. corniculatum* ekstraktlarının AChE mekanizması ile bağlantılı olan nöral apoptoz mekanizmasında inhibitör etkileri incelenmiştir. Bunun için, fPC12 hücrelerinde H₂O₂ uygulaması ile nöral apoptozun indüklenmesi sağlanmıştır. Enzimatik oksidaz aktivitesinin doğal bir yan ürünü olan H₂O₂'nin serbest radikallerin endojen kaynağı olduğu ve hücresel düzeyde oksidatif strese katkıda bulunduğu bilinmektedir. Ekzojen H₂O₂'in, kortikal nöron ve fPC12 hücre kültürlerinde, oksidatif stresi, apoptozu ve hücre nekrozunu arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Kapur ve diğerleri, 2006). Bcl-2 ailesi, hem apoptozun inhibitörlerini hem de hızlandırıcılarını içerdiği için apoptoz süreçlerinin anlaşılmasında özellikle üzerinde durulan gen de proteinlerdendir (Tatton ve Olanow, 1999). Kaspazlar ise, hem içsel hem de dışsal yolda apoptotik sürecin devam etmesini sağladıkları için önemlidir. Bu nedenle, Bcl-2 ailesi ve kaspazlar (Kaspaz 3, 8, 9 gibi) nöronal apoptoz yolağında temel mediyatörler olarak tanımlanmıştır. H₂O₂'nin, hücre ölümünü tetiklediği, mitokondri ve sitoplazmada Bax, p53, Kaspaz 3, 9 seviyesini arttırırken, Bcl-2 seviyesini azalttığı ve hücre ölüm mekanizmalarını aktifleştirdiği gösterilmiştir (Feng ve diğerleri, 2013). Ayrıca, H₂O₂ ile muamele edilmiş fPC12 hücrelerinde, hücre içi ROS miktarındaki artışa bağlı olarak, sitokrom c salınıminde, Kaspaz 9 ve 3 aktivasyonunda ve Bax/Bcl-2 oranında artış, mitokondriyal membran potansiyelinde azalma olduğu gösterilmiştir (Huang ve diğerleri, 2015). Çalışmamız kapsamında apoptotik hücre modelinin oluşturulabilmesi için, fPC12 hücrelerine 24 saat 100 µM H₂O₂ uygulanmıştır. H₂O₂ uygulanan fPC12 hücrelerinin mRNA ekspresyon seviyelerinde kontrole göre sırasıyla Bax'da 2, Kaspaz 3'te 3,2, Kaspaz 9'da 2,7 kat artış, Bcl-2'de 0,5 kat azalış; protein ekspresyon seviyelerinde ise kontrole göre sırasıyla Bax'da 1,5, Kaspaz 3'te 3,0, Kaspaz 9'da 1,7 kat artış, Bcl-2'de 0,4 kat azalış tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda H₂O₂'nin farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinin fPC12 hücrelerinde mRNA ekspresyon seviyesini Bax'da yaklaşık 1,4-4 (Liu ve diğerleri, 2014; Clementi, Pani, Sampaolese ve Tringali, 2018); Kaspaz 3'te yaklaşık 2-3,5 (Nair ve diğerleri, 2003); Kaspaz 9'da yaklaşık 3,5 kat arttırdığı; Bcl-2'de ise yaklaşık 0,5 kat azalttığı (Wu ve diğerleri, 2014; Jiang ve diğerleri, 2016); protein ekspresyon seviyesini Bax'da yaklaşık 1,5-2 (Jiang, Liu, Bao ve An, 2003); Kaspaz 3'te yaklaşık 2,5-8 (Liu ve diğerleri, 2014; Jiang ve diğerleri, 2016; Yan, Yang, Luo ve Wu, 2011) arttırdığı; Bcl-2'de ise yaklaşık 0,75 kat azalttığı (Lv ve diğerleri, 2017) gösterilmiştir. Literatürlerde gen ve protein seviyesindeki bu etkiler ile apoptozun indüklendiği sonucuna varılmıştır. Çalışmamız kapsamında uygulanan H₂O₂'nin literatürlerde bahsi geçen aralıklarla uyumlu etkilere sebep olduğu göz önüne alındığında, uygulanan H₂O₂ konsantrasyon ve süresi ile

fPC12 hücrelerinde nöral apoptozun indüklendiği ve nörodejeneratif hücre modelinin oluşturulduğu söylenebilir.

Çalışmamız kapsamında, *G. corniculatum* ekstralarının nörodejeneratif hastalıklarda oluşan apoptotik hasarı giderici etkilerinin olup olmadığı araştırılmıştır. Bu kapsamda, H₂O₂ uygulaması ile apoptozun indüklendiği fPC12 hücrelerinde *G. corniculatum* ekstralarının Bax, Kaspaz 3,9 ve Bcl-2 gen ve protein ifadelerine etkileri belirlenmiştir. Uygulanan tüm ekstraların fPC12 hücrelerinde, H₂O₂ indüksiyonu sonucu oluşan Bax mRNA ve protein ifadesini, konsantrasyona bağlı olarak azalttığı tespit edilmiştir (gen ifadesinde % 15-50, protein ifadesinde % 13-27) (Şekil 4.5, 4.6). Gen ifadesine ilişkin sonuçlarımız, 100 µg/mL’de kloroform ve metanol ekstralarının su ekstresine göre daha etkin inhibitör etkiye sebep olduğunu göstermektedir. Bu durum, Bax mRNA ifadesinin baskılanması konusunda düşük konsantrasyonlarda kloroform etkisinin, yüksek konsantrasyonlarda ise tüm ekstraların etkili olduğunu göstermektedir. 1000 µg/mL’lik konsantrasyonda, ekstralar arasında anlamlı bir fark olmadığı ve maksimum inhibisyonun bu konsantrasyonda olduğu saptanmıştır. Protein ifadesine ilişkin sonuçlarımızda ise 100 µg/mL’lik konsantrasyonda üç ekstrede de istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon tespit edilememiştir ($p>0,05$). 1000 µg/mL’lik konsantrasyonda ise maksimum inhibitör etkiyi su ekstresinin sağladığı ve H₂O₂ kaynaklı Bax mRNA indüksiyonunu kısmen kontrol seviyelerine düşürdüğü belirlenmiştir.

Çin tıbbında kullanılan ve anti-apoptotik özellikleri ile bilinen LSS (lychee seed saponins) maddesinin uygulandığı PC12 hücrelerinde, apoptotik hücre grubuna göre, Bax mRNA ekspresyonunun yaklaşık % 13-25 daha az olduğu belirlenmiştir (Wang ve diğerleri, 2017). Aynı şekilde, biyoaktif bir bileşik olan hiperoksidin uygulandığı PC12 hücrelerinde Bax mRNA seviyesinin H₂O₂ kaynaklı ekspresyonuna göre % 40-50 daha az olduğu saptanmıştır (Jiang ve diğerleri, 2016). Anti-apoptotik bir bileşik olan allisinin varyantlarının da PC12 hücrelerinde H₂O₂ indüksiyonu sonucu oluşan Bax protein ifadesi üzerinde yaklaşık % 10-50 azaltıcı etkisinin olduğu belirtilmiştir. % 10’luk azalmanın apoptoz üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı, fakat % 50’lik azalmanın apoptozda baskılayıcı etki gösterdiği kaydedilmiştir (Lv ve diğerleri, 2017). *Rehmannia glutinosa* bitkisinin bir bileşiği olan katalpolün 0,1 mM konsantrasyon ve 9 saat süre ile uygulandığı PC12 hücre gruplarında, Bax protein ifadesinin H₂O₂ ile indüklenen hücre grubuna göre yaklaşık % 25 daha az olduğu belirlenmiştir (Jiang, Liu, Bao ve An, 2004). Literatürdeki bu etkiler, apoptozun azaltılması adına anlamlı bulunmuştur. Buna göre, çalışmamızda denenen *G. corniculatum* ekstralarının

Bax mRNA ifadesini % 15-50, protein ifadesini % 13-27 oranında azalttığı göz önüne alındığında, ekstrelerin apoptozun gen ve protein düzeyinde baskılanmasında etkili olduğu söylenebilir.

G. corniculatum ekstrelerinin H₂O₂ kaynaklı Kaspaz 3 mRNA seviyesindeki artışı % 16-59, protein seviyesindeki artışı ise % 10-60 oranında inhibe ettiği saptanmıştır (Şekil 4.7, 4.8). Sonuçlarımız, su ekstresinin 500 ve 1000 µg/mL’de diğer ekstrele göre daha etkin inhibisyon sağladığını ve 1000 µg/mL’lik konsantrasyonunda, H₂O₂ hasarı ile oluşan Kaspaz 3 mRNA ve protein indüksiyonunu en iyi baskılayan uygulama olduğunu göstermiştir.

C. decumbens alkaloid ekstrelerinin uygulandığı PC12 hücrelerinde, H₂O₂ kaynaklı indüksiyonuna göre Kaspaz 3 mRNA ifadesinin yaklaşık % 13-88 daha az olduğu kaydedilmiştir (Yan, Yang, Luo ve Chunzhen, 2011). Aynı şekilde, biyoaktif bir bileşik olan hiperoksidin PC12 hücrelerinde, H₂O₂ kaynaklı Kaspaz 3 mRNA ekspresyonunu % 17-82 azalttığı belirlenmiştir (Jiang ve diğerleri, 2016). Anti-inflamatuar ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinen ve bitkisel bir ilaç olan kostunolitin uygulandığı PC12 hücrelerinde Kaspaz 3 aktivitesinin H₂O₂ kaynaklı indüksiyona göre konsantrasyonlara göre % 20-40 daha az olduğu belirlenmiştir (Cheong ve diğerleri, 2016). Nörodejeneratif hastalıklarda etkili bir ilaç olduğu bilinen galantamin ile muamele edilen PC12 hücrelerinde Kaspaz 3 protein ifadesinin, apoptoz indüksiyonu gerçekleştirilmiş hücre grubuna göre % 28 daha az olduğu tespit edilmiştir (Liu, Xu, Yan, Wang ve Zheng, 2010). Literatürde bahsedilen bu etkiler ile H₂O₂ kaynaklı apoptozun baskılandığı sonucuna varılmıştır. Buna göre, *G. corniculatum* ekstrelerinin Kaspaz 3 mRNA ifadesinde % 16-59, protein ifadesinde ise % 10-60 oranında baskılama sağladığı göz önüne alındığında, ekstrelerin apoptozun gen ve protein düzeyinde baskılanmasında etkili olduğu söylenebilir.

G. corniculatum ekstrelerinin H₂O₂ kaynaklı artış sonucu oluşan Kaspaz 9 gen ve protein ifadesi üzerinde inhibitör etkileri değerlendirildiğinde (Şekil 4.9, 4.10), *G. corniculatum* ekstrelerinin H₂O₂’nin sebep olduğu artış sonucu oluşan Kaspaz 9 ekspresyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Ekstrelerin gen düzeyinde sağladığı Kaspaz 9 baskılayıcı etki, % 14-44, protein düzeyinde sağladığı baskılayıcı etki % 18-41 oranındadır. Su ekstresi, denenen tüm konsantrasyonlarda Kaspaz 9 gen ve protein ifadesinin azaltılmasını sağlayan en etkin ekstre olmuştur. Ayrıca, su ekstresinin 1000 µg/mL’lik konsantrasyonu, maksimum inhibisyona sebep olan uygulamadır.

Cucumaria frondosa'dan elde edilen fosfolipitler ile muamele edilen PC12 hücrelerinde Kaspaz 9 mRNA ifadesinin H₂O₂ kaynaklı indüksiyona göre yaklaşık % 30 ve % 50 oranında daha az olduğu belirtilmiştir (Wu ve diğerleri, 2014). Başka bir çalışmada, galantamin ile muamele edilen PC12 hücrelerinde, apoptoz indüklenen gruba göre % 23 daha az Kaspaz 9 protein ifadesinin olduğu belirlenmiştir (Liu ve diğerleri, 2010). Çalışmalarda, belirlenen gen ve protein ifadesindeki bu etkilerin apoptozu baskılayıcı özellikte olduğu sonucuna varılmıştır. Buna göre, çalışmamızda denenen *G. corniculatum* ekstrelerinin Kaspaz 9 mRNA ifadesinde % 14-44 oranında azalma gösterdiği göz önüne alındığında, ekstrelerin yüksek konsantrasyonlarda apoptozun baskılanmasında etkili olduğu söylenebilir. Ayrıca, *G. corniculatum* metanol ve su ekstrelerinin, H₂O₂ kaynaklı Kaspaz 9 protein indüksiyonu üzerinde baskılayıcı etki gösterdiğinden de bahsedilebilir.

Çalışmamızda anti-apoptotik Bcl-2 gen ve protein ifadesi üzerinde *G. corniculatum* ekstrelerinin etkileri incelendiğinde (Şekil 4.11, 4.12), kloroform ekstresinin 100, metanol ekstresinin ise 100 ve 500 µg/mL'lik konsantrasyonu dışındaki diğer uygulamaların, gen düzeyinde Bcl-2 ifadesini H₂O₂ uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırdığı belirlenmiştir. Su ekstresinin uygulanan tüm konsantrasyonlarının, protein seviyesinde Bcl-2 ifadesinde anlamlı bir artış sağladığı da tespit edilmiştir. Su ekstresinin denenen tüm konsantrasyonlarda H₂O₂ kaynaklı Bcl-2 hasarının giderilmesi konusunda en etkin ekstre olduğu (H₂O₂ grubuna göre gen düzeyinde % 60-100, protein düzeyinde 50-67 artış) ve 1000 µg/mL konsantrasyonda maksimum indüksiyona sebep olarak Bcl-2 gen ve protein düzeyini kontrol grubunun seviyesine yükselttiği dikkati çekmiştir.

Oksidatif stres inhibitörü olan N-asetil-L-sisteinin (NAC) uygulandığı adiposit kültürlerinde Bcl-2 gen ifadesinin, H₂O₂ uygulanan hücre gruplarına göre yaklaşık % 50 daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Cao ve diğerleri, 2017). Aynı şekilde, *Scutellaria baicalensis Georgi* bitkisinden elde edilen antioksidatif bir madde olan baicalin ile muamele edilen PC12 hücrelerinde, Bcl-2 protein ifadesinin, H₂O₂ kaynaklı azalmaya göre yaklaşık % 30-50 daha yüksek olduğu kaydedilmiştir (Zheng ve diğerleri, 2014). Literatürdeki bu sonuçlar, NAC ve baicalinin nöral apoptozu giderici etkilerinin olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Buna göre, çalışmamızda elde edilen Bcl-2 indükleyici etki göz önünde bulundurularak (gen düzeyinde % 60-100, protein düzeyinde 50-67), *G. corniculatum* ekstrelerinin apoptozun baskılanmasında etkili olduğu söylenebilir.

Apoptozda içsel yolağın pro-apoptotik (Bax, Bad) ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerine ait gen ve proteinleri tarafından; dışsal yolağın ise sırasıyla aktifleşen Kaspaz 8, Kaspaz 9 ve Kaspaz 3 gen ve proteinleri tarafından gerçekleştiği bilinmektedir. Kaspaz 3 aktivasyonu her iki yolda, ortak endonükleaz olarak dikkati çekmektedir (Reed, 2000). Buna göre, *G. corniculatum* ekstrelerinin apoptoz mekanizması üzerinde etkileri ile ilgili genel bir değerlendirme yapacak olursak, ekstraktların apoptoz yolağındaki gen ve protein ifadelerine farklı şekilde etki gösterdiği dikkat çekicidir. Kloroform ekstrelerinin Bax ve Bcl-2 ifadesi üzerinde gen ve protein seviyesinde, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 ifadesi üzerinde ise yalnızca gen düzeyinde etkili olduğu belirlenmiştir. Bu durum kloroform ekstresinin içsel yolda hem gen hem de protein ifadesi bakımından; dışsal yolda ise sadece gen ifadesi bakımından etkili olduğunu göstermiştir. Metanol ve su ekstresinin, hem dışsal hem de içsel yollardaki gen ve proteinler üzerinde etkisi tespit edilmiştir. Su ekstresinin, hedef gen ve proteinlerin tamamında etkili olduğu ve apoptozu baskılayıcı etkilerinin kloroform ve metanol ekstresine göre daha etkin olduğu saptanmıştır (Bax gen ifadesi hariç). Su ekstresinin 1000 µg/mL konsantrasyonun en etkin apoptoz baskılayıcı uygulama olduğu dikkati çekmiştir. Apoptoz baskılayıcı özelliğın ekstrelere göre farklı oluşunun, bileşenlerin çözünbilme özelliklerine bağlı olarak bileşik içeriklerinin farklılığından kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Zira, ekstrelerin oleamid ve tetrahydroberberin miktarı ile gösterilen apoptoz baskılayıcı etki arasında bir ilişkinin olabileceği düşünülmüştür. Çalışmamız kapsamında, *G. corniculatum*'un apoptozu baskılayıcı özellikte olduğu ve nörodejeneratif hastalıklarda apoptotik mekanizmalar üzerinde iyileştirici etki gösterebilme potansiyelinin olduğu belirlenmiştir.

Ekstrelerin gen ve protein ifadeleri üzerine etkileri hakkında genel bir değerlendirme yapıldığında, AChE, Bax, Kaspaz 3, 9 ve Bcl-2 gen düzeyindeki inhibitör etkilerin, protein düzeyindeki etkilere kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Hücrelerde gen ekspresyonlarının öncelikle mRNA ifadesi, daha sonra ise protein ifadesinin oluşması ile gerçekleştiği bildirilmiştir (Schwanhäusser ve diğerleri, 2011). Buna göre, çalışmamız kapsamında gen ve protein ifadelerinin aynı uygulama süresinde değerlendirilmiş olması, protein ifadesindeki etkinin gen ifadesine göre daha düşük bulunmasının sebebi olabilir.

Çalışmamız kapsamında, *G. corniculatum* ekstrelerinin hem AChE'yi hem de apoptozu baskıladığı etkisinin olduğu belirlenmiştir. AChE ile apoptoz mekanizması arasındaki ilişkiye değinen çalışmalarda, AChE'nin ACh'yi hidrolize etmenin dışında morfogülasyon,

adezyon, stres ve patogeneze gibi diğer fizyolojik süreçlere katıldığı (Rosenberry, 1975; Zhang ve diğerleri, 2002), apoptoz sırasında aşırı eksprese edildiği ve apoptozom formasyonunda önemli bir rol oynadığı kaydedilmiştir (Park ve diğerleri, 2008). AChE'nin, nöronlarda apoptozu indüklediği ve AChE indüksiyonunun apoptoz için bir belirteç olduğu da gösterilmiştir (Huang ve diğerleri, 2005). AChE-i'lerinin ise reaktif oksijen türlerinin inhibisyonu yoluyla anti-apoptotik aktivite gösterdiği (Wang ve diğerleri, 2013), AChE geninin susturulması ile Bax, Kaspaz 9 ve Kaspaz 3 aktivasyonunun azaltıldığı, Bcl-2 aktivasyonunun ise arttırıldığı bildirilmiştir (Wang ve diğerleri, 2013; Espallergues ve diğerleri, 2010). Literatürdeki bu bilgiler, *G. corniculatum* ekstrelerinde gösterilen AChE ve apoptoz baskılayıcı özelliğın ilişkili olduğunun açıklayıcısı niteliğindedir. AChE'nin baskılanmasında metanol, apoptozun baskılanmasında ise su ekstresinin diğer ekstrele göre daha etkin oluşu, *G. corniculatum*'un nörodejeneratif hastalıklarda çok yönlü etkilere sebep olabilecek potansiyelde olduğuna işaret etmiştir.

İnflamasyon ve mikroglial aktivasyonu, pek çok nörodejeneratif hastalık patogenezi için ortak bir mekanizmadır. Lipopolisakkaritler (LPS) gibi ekzotoksinlerin BV-2 mikroglial hücrele morfolojisinde değişikliğe sebep olduğun, hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak mikroglialların aşırı aktifleşmesini sağlayarak nöronlarda ilerleyici ve kümülatif kayba neden olduğun bildirilmiştir (Gao ve diğerleri, 2002; Ling ve diğerleri, 2002; Ling ve diğerleri, 2006). Çalışmamız kapsamında, inflamatur etkiye yönelik incelemeler LPS ile indüklenmiş mikroglial BV-2 hücreleri kullanılarak yapılmıştır.

Çalışmamızda, LPS uygulaması sonrası BV-2 hücre morfolojisinin değiştiğın, hücrelerdeki mekik yapının yuvarlaklaştığı gözlenmiştir (Resim 4.3). Artan LPS konsantrasyonlarına bağlı olarak BV-2 hücrelerinin mekik yapısında yuvarlaklaşmalar olduğun, bu durumun LPS kaynaklı inflamasyon ve hücre içi stres artışına bağlı olarak geliştiğın daha önce yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Kumar ve diğerleri, 2014). Bu literatür, LPS uygulaması sonucu BV-2 hücre morfolojisinde tespit ettiğımız değişimi açıklar niteliktedir. Hücrelerde tespit ettiğımız morfolojik değişikliklerin, uyguladığımız LPS ile inflamatur süreçlerin başlatıldığına dair bir göstergesi olduğun söylenebilir.

Tez çalışmamız kapsamında, LPS'nin BV-2 hücreleri üzerinde yüksek sitotoksik etki göstermeyecek, ancak, inflamasyona bağlı nörodejenerasyon belirleçlerinde artışa sebep olacak etkin konsantrasyonları belirlenmiştir. LPS'nin BV-2 hücre canlılığı üzerindeki

etkilerine ilişkin çalışma sonuçlarımız, LPS'nin konsantrasyon ve süre artışı ile doğru orantılı olarak BV-2 hücre canlılığını azalttığını göstermiştir. 0,05-1 µg/mL'lik LPS konsantrasyonlarının kontrole göre hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı, 5-30 µg/mL konsantrasyonlarının ise hücrelerde sitotoksik etkiye sebep olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.13). Sonuçlarımız, LPS'nin konsantrasyon ve uygulanan süre ile doğru orantılı olarak hücre ölümünü tetiklediğini gösteren çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (Dai ve diğerleri, 2015; Hu ve diğerleri, 2013; Harun, Vidyadaran, Lim, Cole ve Ramasamy, 2015; Lei ve diğerleri, 2013; Abuarqoub, Foresti, Green ve Motterlini, 2006; Xu, Li, Qu, Zheng ve Lu, 2014; Hu ve diğerleri, 2014). Buna göre, 0,05-1 µg/mL'lik LPS konsantrasyonlarının BV-2 hücrelerinde inflamatuvar indüksiyonu için güvenle kullanılabilir olduğu söylenebilir.

Potansiyel terapötik / protektif ajanların yüksek derecede sitotoksik etkisinin olmaması beklendiğinden tez çalışmamız sırasında *G. corniculatum* ekstrelerinin BV-2 hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerinin olup olmadığı belirlenmiştir. *G. corniculatum* kloroform ve su eksresinin, BV-2 hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir azalmaya sebep olmadığı, metanol ekstresinin 500 ve 1000 µg/mL'sinin ise hücre canlılığında yaklaşık % 50 azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14). % 50 ve üzerinde hücre ölümüne sebep olan maddelerin ağır derecede sitotoksik etkili olduğunu gösteren çalışmalara dayanarak (ISO, 2009), *G. corniculatum* metanol ekstresinin 24 saatlik 500 ve 1000 µg/mL uygulamalarının, BV-2 hücrelerinde toksik etkisinin olduğu, bu nedenle anti-inflamatuvar uygulama olarak değerlendirilemeyeceği söylenebilir.

Çalışmamızda, *G. corniculatum* ekstrelerinin PC12 ve BV-2 hücre canlılıkları üzerinde gösterdiği etki birbirinden farklı bulunmuştur. PC12 ve BV-2 hücre uygulamaları karşılaştırıldığında, 500 ve 1000 µg/mL *G. corniculatum* metanol ekstresinin, BV-2 hücrelerinde PC12'ye göre daha fazla hücre ölümüne sebep olduğu görülmüştür. BV-2'nin, mikrogliaların morfolojik, fenotipik ve fonksiyonel özelliklerini gösteren eşsiz bir fare hücre hattı olduğu (Blasi, Barluzzi, Bocchini, Mazzolla ve Bistoni, 1990) ve mikrogliaların, merkezi sinir sisteminin doğal ve doğuştan gelen fagositleri olduğu belirtilmiştir. Fagositoz, makrofajlar, monositler, nötrofiller ve dendritik hücreler gibi fagositler tarafından gerçekleştirilebilen, çoğunlukla 0,5 µm'den büyük katı parçacıkların hücre içine alımını tanımlayan endositoz tipidir (Young, 2006). Fagositik özellikte olmayan hücrelerde ise, hücre içine madde alışverişinin seçici geçirgen zar modeline tabi olduğu bilinmektedir. *G.*

corniculatum ekstralarının hücre hatları üzerinde sebep olduğu sitotoksik etki farklılıklarının, BV-2 hücrelerinde maddelerin hücre içine fagositoz yolu ile alınmasından, PC12 hücrelerinde ise madde girişinin seçici geçirgen zar vasıtasıyla kısmen engellenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmamız kapsamında LPS uygulaması öncesinde *G. corniculatum* ekstraları uygulanan BV-2 hücre modelinde, ekstraların anti-inflamatuar etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu nedenle, *G. corniculatum* ekstraktları ve LPS'nin birlikte BV-2 hücrelerine uygulanmasının hücre canlılığını nasıl etkilediği araştırılmıştır. Metanol ekstresi ve LPS'nin birlikte uygulanmasında, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonların BV-2 hücre canlılığını kontrole göre anlamlı ölçüde azalttığı (kontrole göre sırasıyla % 52 ve 69 hücre ölümü), diğer uygulamaların ise BV-2 hücre canlılığı üzerinde kontrole göre anlamlı bir farka sebep olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.15). ISO 10993-5 standartlarına göre, *G. corniculatum* metanol ekstresinin 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonları ile birlikte uygulanan LPS'nin, BV-2 hücreleri için toksik olduğu söylenebilir. Metanol ekstresinin 500 ve 1000 µg/mL'sinin ardından LPS'nin uygulandığı hücre gruplarında görülen ölümün, metanol ekstresinin bu konsantrasyonlarda yalnız başına sebep olduğu hücre ölümüyle paralellik gösterdiği göz önüne alındığında, hücre canlılığındaki azalmanın metanol ekstresinin gösterdiği toksik etkiden kaynaklandığını söylemek mümkündür.

BV-2 hücrelerinde inflamasyonun uyarılmasında en etkin LPS konsantrasyonlarının belirlenmesi için LPS'nin TNF- α ifadesi üzerinde etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, uygulanan tüm LPS konsantrasyonları (0,05-30 µg/mL) kontrole göre TNF- α protein seviyesini anlamlı şekilde arttırmıştır (Şekil 4.16). 0,05-1 µg/mL LPS uygulamalarında, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak TNF- α seviyesinde artış olduğu kaydedilmiş olmasına karşın (kontrole göre 6,6-8,8 kat), 1-30 µg/mL LPS uygulamalarında TNF- α uyarımının konsantrasyon ile ters orantılı olduğu belirlenmiştir (kontrole göre 5,7-8,8 kat). 1 µg/mL LPS konsantrasyonu, TNF- α ifadesinde maksimum indüksiyona sebep olmuştur. 1 µg/mL LPS ile 24 saat muamele edilen BV-2 hücrelerinde TNF- α seviyesinin indüklendiğini ve nöral inflammatuar hücre modelinin oluşturulduğunu gösteren çalışmalar da bulgularımızı destekler niteliktedir (Horvath, Nutile-McMenemy, Alkaitis ve DeLeo, 2008; Jung ve diğerleri, 2006; Hu ve diğerleri, 2013; Salih ve Kim, 2014; Kim ve diğerleri, 2014; Jung ve diğerleri, 2010). Çalışmamızda BV-2 hücreleri üzerinde ağır sitotoksik etki göstermeyecek derecede düşük, fakat, inflamasyon belirteçlerinde artışa neden olacak

derecede yüksek LPS konsantrasyonunun belirlenmesi amaçlandığından, daha sonraki çalışmalarda BV-2 hücrelerine 24 saat 1 µg/mL LPS uygulaması yapılmıştır.

Çalışmamızda, *G. corniculatum* ekstrelerinin BV-2 hücrelerinde LPS kaynaklı TNF-α protein indüksiyonunu engelleyici etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, üç ekstrenin de BV-2 hücrelerinde LPS kaynaklı TNF-α artışını engelleyici, anti-inflamatuar etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (su ekstresinin 100 µg/mL konsantrasyonu hariç) (Şekil 4.17). Anti-inflamatuar etkinin, konsantrasyon ile doğru orantılı olduğu saptanmıştır. 100 µg/mL konsantrasyonda kloroform ekstresinde; 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonda ise metanol ekstresinde diğer uygulamalara göre daha düşük TNF-α miktarı belirlenmiştir. Fakat, metanol ekstresinin 500 ve 1000 µg/mL'lik konsantrasyonları TNF-α miktarının kontrol grubunun da altına düşmesine sebep olmuştur. Bunun, metanol ekstresinin 500 ve 1000 µg/mL'lik konsantrasyonlarının sebep olduğu toksik etki ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu durum göz önüne alındığında, TNF-α'ya dayalı anti-inflamatuar etki bakımından, düşük konsantrasyonda (100 µg/mL) kloroform ekstresinin, yüksek konsantrasyonda ise (1000 µg/mL) su ekstresinin diğer uygulamalara göre daha etkin olduğundan bahsedilebilir.

Çalışmamızda, LPS uygulaması sonrası IL-6 sitokin indüksiyonu sağlanarak BV-2 hücrelerinde nöral inflammatuar model oluşturulmaya çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlarda, 24 saat 1 µg/mL LPS uygulanan hücre grubunda IL-6 protein seviyesinin kontrole göre yaklaşık 31 kat arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.18). 24 saatlik 1 µg/mL LPS uygulamasının IL-6 protein seviyesini indükleyici etkiye sebep olduğunu gösteren çalışmalar da sonuçlarımızı desteklemiştir (Horvath ve diğerleri, 2008; Kim ve diğerleri, 2007). Buna göre uygulanan LPS ile inflammatuar hücre modelinin başarı ile oluşturulduğu söylenebilir.

Çalışmamız kapsamında, *G. corniculatum* ekstrelerinin BV-2 hücrelerinde LPS kaynaklı IL-6 protein indüksiyonunu engelleyici, anti-inflamatuar etkileri ortaya konulmuştur. LPS uygulamasından önce *G. corniculatum* ekstraktları ile muamele edilen hücre gruplarında, LPS grubuna göre IL-6 protein seviyesinin daha düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.18). Ekstrelerin, IL-6 protein seviyesi üzerindeki anti-inflamatuar etkileri, konsantrasyona göre değişkenlik göstermiştir. 250 µg/mL konsantrasyonda kloroform ekstresi (LPS uygulanan gruba göre % 43 daha az IL-6 miktarı), 100, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonda ise metanol ekstresi daha etkin IL-6 indüksiyonunu engelleyici etkiye sebep olmuştur (LPS

uygulanan gruba göre sırasıyla % 32, 98 ve 99 daha az IL-6 miktarı). Metanol ekstresinin 500 ve 1000 µg/mL’lik konsantrasyonlarının uygulandığı hücre gruplarında IL-6 protein seviyesinin kontrol grubundan daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, TNF-α protein seviyesine ilişkin sonuçlarımız ile de paralellik göstermiştir. Metanol ekstresinin 500 ve 1000 µg/mL’lik konsantrasyonlarının BV-2 hücrelerinde ağır sitotoksik etki ile ilişkili olduğu, daha önce yapılan hücre sağkalımı analizinde gösterilmiştir (Şekil 4.14). Bu durum göz önüne alındığında, metanol ekstresinin 500 ve 1000 µg/mL’lik konsantrasyonlarında sağlanan etkinin anti-inflamatuar özellikten değil, sitotoksik etkiden kaynaklandığı söylenebilir. IL-6 protein artışına karşı düşük konsantrasyonda (250 µg/mL) kloroform ekstresinin, yüksek konsantrasyonda ise (1000 µg/mL) su ekstresinin daha etkili olduğu gözle çarpmıştır. IL-6 protein artışına karşı en etkin anti-inflamatuar etki, su ekstresinin 1000 µg/mL konsantrasyonunda saptanmıştır (LPS uygulanan gruba göre % 96 daha az IL-6 miktarı). Literatürde *Glaucium* cinsine ait üyelerin farklı mekanizmalar ile anti-inflamatuar etkiler gösterdiğini kanıtlayan çalışmalar olmasına karşın (Morteza-Semnani, Saeedi, Hamidian, Vafamehr ve Dehpour, 2002; Morteza-Semnani, Saeedi ve Hamidian, 2004; Koçancı ve diğerleri, 2017; Arafa, Mohamed ve Eldahmy, 2016), *G.corniculatum* ekstresinin BV-2 hücrelerinde hem TNF-α hem de IL-6 protein seviyelerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız bu bakımdan ilk olma özelliğini taşımaktadır.

Bitkisel bir anti-inflamatuar ajan olduğu bilinen 6-Shogaol ile muamele edilen BV-2 hücrelerinde LPS uygulanan hücre grubuna göre yaklaşık % 30-80 daha az TNF-α miktarı tespit edilmiş ve bu durum, 6-Shogaol’un anti-inflamatuar etkilerinin olduğu şeklinde yorumlanmıştır (Han ve diğerleri, 2017). Bu literatür ile çalışmamızda elde edilen TNF-α indüksiyonunu engelleyici etki (% 23-70) karşılaştırıldığında, *G. corniculatum* ekstresinin TNF-α indüksiyonunu engelleyerek nöral inflamasyon üzerinde anti-inflamatuar etkisinin olduğu söylenebilir.

Glaucium flavum Crantz (Papaveraceae)’dan elde edilen glausin ve onun yapısal analogu olan oksoglausin ile muamele edilen peritoneal makrofajlarda LPS uygulanan hücre grubuna göre glausinin % 25, oksoglausinin ise % 38 daha az IL-6 seviyesine sebep olduğu tespit edilmiş ve glausin ve oksoglausinin anti-inflamatuar etkili bileşikler olduğu belirtilmiştir (Remichkova, Dimitrova, Philipov ve Ivanovska, 2009). Aynı şekilde, bitkisel bir metabolit olan plumbagin uygulanan BV-2 hücrelerinde LPS uygulanmış hücrelerine göre IL-6 protein

seviyesinin yaklaşık % 25 daha az olduğu ve bu özelliği sebebiyle plumbagin'in anti-inflamatuar etki gösteren nöroprotektif bir ajan olduğu kaydedilmiştir (Messeha, Zarmouh, Mendonca, Kolta ve Soliman, 2017). Buna göre, çalışmamızda elde edilen IL-6 indüksiyonunu engelleyici etki (% 32-96) göz önüne alındığında *G. corniculatum* ekstrelerinin IL-6 indüksiyonunu engelleyerek nöral inflamasyon üzerinde anti-inflamatuar etkisinin olduğu söylenebilir.

İnflamasyon mekanizmasına ilişkin sonuçların genel bir değerlendirmesini yapacak olursak, uygulanan LPS konsantrasyon ve süresinin, BV-2 hücrelerinde inflamatuvar yanıt oluşturulmasında başarılı olduğu, *G. corniculatum* ekstrelerinin ise hem TNF- α hem de IL-6 sitokinlerinin LPS kaynaklı artışını engelleyici etki gösterdiği söylenebilir. Hem TNF- α hem de IL-6 protein sonuçlarına dayanarak, en etkin anti-inflamatuar etki, su ekstresinin 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik uygulamalarında görülmüştür. Çalışma sonuçlarımız, *G. corniculatum* ekstrelerinin nörodejeneratif hastalıklarda anti-inflamatuar ajan olarak kullanılabileceğinin göstergesi niteliğindedir.

AChE, apoptoz ve inflamasyon, mekanizmaları arasındaki ilişkiye deyinen çalışmalarda, AChE-i etki gösteren bileşiklerin, lenfosit proliferasyonu ve pro-inflamatuar sitokin üretiminin yanı sıra, hücre dışı esteraz aktivitesini baskılayıcı etki göstererek anti-inflamasyon özellik sergilediği gösterilmiştir (Nizri, Hamra-Amitay, Sicsic, Lavon ve Brenner, 2006). Ayrıca, apoptotik hücre ölümünün, aktif astrosit ve mikroglia tarafından üretilen sitokinlerin etkisi ile ilişkili olduğu ve inflamatuvar süreçlere bağlı olarak geliştiği öne sürülmüştür (Sawada, 1999). Apoptozda kaspazların aktivasyonunun TNF- α gibi inflamasyon araçları tarafından gerçekleştirilebileceği de kaydedilmiştir (Huppertz, Frank ve Kaufmann, 1999). Bu literatürler, *G. corniculatum* ekstrelerinde gösterilen AChE, apoptoz baskılayıcı ve anti-inflamatuar etkinin birbiri ile ilişkili olabileceğinin göstergesi niteliğindedir.

G. corniculatum ekstrelerinde AChE-i etki bakımından metanol ekstresinin, apoptozu baskılayıcı ve anti-inflamatuar etki bakımından ise su ekstresinin diğer ekstrele göre daha etkin olduğu belirlenmiştir. Bu durum, çözücü özelliklerine bağlı olarak ekstrelerdeki bileşik muhtevasının farklı oluşu ile açıklanabilir. Zira *G. corniculatum*'daki biyoaktif bileşik muhtevaları ve miktarlarının ekstrele göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Farklı çözücüler ile elde edilen bitki ekstrelerinin AChE, apoptoz baskılayıcı ve anti-inflamatuar

etkilerinin farklı olduğu literatürde de gösterilmiştir (Adewusi, Moodley ve Steenkamp, 2011; Lukhele, 2016; Murugan ve Parimelazhagan, 2014). Çalışmamız kapsamında, metanol ekstresindeki toplam alkaloid miktarının diğer ekstrele göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum, AChE-i özelliğin alkaloid kaynaklı olabileceğini düşündürmüştür. Ekstrelerdeki alkaloid miktarları ile AChE-i özellik arasında pozitif yönde bir korelasyonun tespit edilmiş olması da bu kanıyı desteklemiştir ($r=0,3$). *G. corniculatum*'un papaverin, protopin, berberin, bulbocapnin ve glausin alkaloidleri bakımından zengin olduğunu ve allokriptopin alkaloidinin *G. corniculatum*'da majör alkaloid olarak tespit edildiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (Novak ve diğerleri, 1972; Doncheva ve diğerleri, 2014). Bu alkaloidlerin AChE inhibisyon özelliklerinin olduğu literatürde gösterilmiştir (Ji ve Shen, 2012; Adsersen ve diğerleri, 2007; Mollataghi ve diğerleri, 2012; Park ve Eun, 1989; Doncheva ve diğerleri, 2014; Şener ve Orhan, 2005). Çalışmamız kapsamında da ekstrelerdeki majör alkaloid allokriptopin olarak belirlenmiştir. *Fumaria vaillanti* ekstraktlarından elde edilen allokriptopinin yüksek AChE-i etkisinin olduğu Ellman metodu ile gösterilmiştir (% 89) (Şener ve Orhan, 2005). Bu bilgi, ekstrelerdeki AChE-i özelliğin allokriptopinden kaynaklanabileceğini destekler niteliktedir. *G. corniculatum* metanol ekstresinin rutin ve kuersetin miktarının da diğer ekstrele göre yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu flavonoidlerin AChE-i özellikte olduğu literatürlerde gösterilmiştir (Hernandez, Falé, Araújo and Serralheiro, 2010; Ademosun, Oboh, Bello ve Ayeni, 2016). Çalışmamızda en etkin *in vitro* ve hücresele AChE-i etkinin metanol ekstresinde tespit edilmiş olması ve metanol ekstresindeki allokriptopin, rutin ve kuersetin oranının diğer ekstrele kıyasla daha yüksek bulunması, AChE-i özelliğin bu bileşiklerden kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Pearson korelasyon analizine ait veriler de ekstrelerin allokriptopin, rutin ve kuersetin miktarları ile *in vitro*, hücresele, gen ve protein seviyesinde belirlenen AChE-i özellikleri arasında pozitif yönde bir korelasyonun olduğunu göstermiştir ($r=0,2-0,9$). *G. corniculatum* su ekstresinin biyoaktif bileşen içeriğine ait verilerde ise, oleamid yağ asidinin yalnızca su ekstresinde bulunduğu ve su ekstresindeki tetrahidroberberin alkaloidi miktarının diğer ekstrele göre yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum, hem apoptozu baskılayıcı hem de anti-inflamatuar etkinin oleamid ve tetrahidroberberin bileşikleriyle ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Zira, oleamidin pek çok nörotransmitter sistemle etkileşime girdiği ve BV-2 hücrelerinde anti-inflamatuar etkilere sebep olduğu bildirilmiştir (Oh ve diğerleri, 2010). Ayrıca, tetrahidroberberinin berberin türevi bir alkaloid olduğu ve berberin alkaloidlerinin anti-inflamatuar, anti oksidan ve anti-apoptotik özellikler gösterdiği çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Zou ve diğerleri, 2017; Amritpal ve diğerleri, 2010; Chen

ve diğeri, 2018). Korelasyon analizlerine ilişkin verilerimiz de ekstrelerdeki oleamid ve tetrahydroberberin oranları ile anti-inflamatuar ($r=0,1-0,8$) ve apoptoz baskılayıcı etki ($r>0,4$) arasında pozitif yönlü bir ilişkinin olduğunu işaret etmiştir. Buna göre, *G. corniculatum* metanol ekstresinin AChE-i, su ekstresinin ise apoptoz baskılayıcı ve anti-inflamatuar etkili bileşikler için iyi bir kaynak olduğu söylenebilir. *G. corniculatum* kaynaklı bileşenlerinin AChE-i, apoptoz baskılayıcı ve anti-inflamatuar özellikleri ile ilgili bir literatürün bulunmaması nedeniyle çalışmamız özgün değerdedir. Ayrıca, *G. corniculatum* ekstrelerinin AChE, apoptoz ve inflamasyon olmak üzere üç farklı yolak ile nörodejeneratif hastalıkların ortak mekanizmaları üzerinde çoklu etkisinin olabileceği ilk defa çalışmamız ile gösterilmiştir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

G. corniculatum bitki ekstraktları ile yapılan bu tez çalışması sonucunda amaca uygun olacak şekilde sonuçlar elde edilmiştir. Genel değerlendirme yapılacak olursa,

1. *G. corniculatum* ekstre verimleri ile ilgili bulgularımızda ekstre veriminin metanol > kloroform > su şeklinde olduğu belirlenmiştir. *G. corniculatum* metanol ve su ekstralarında literatürlerde belirtilen *Papaveraceae* familyasına ait diğer türlere göre daha yüksek oranda verim elde edilmesi, biyoteknolojik verim ve kullanım potansiyeli bakımından önemli bir bulgu olmuştur.
2. *G. corniculatum* kloroform, metanol ve su ekstralarının içerik analizi ile ilgili sonuçlar her üç ekstrede de majör bileşiğin alkaloid olduğunu göstermiştir. GC-MS ve HPLC analizlerinde ekstraların alkaloid harici yağ asidi ve flavonoidleri de içerdiği tespit edilmiştir.
3. Farklı çözücü ekstralarında benzer biyoaktif bileşenlerin varlığı saptanmış, buna karşın ekstraktlara göre farklılığın genellikle biyoaktif bileşenlerin miktar veya oranlarından kaynaklandığı belirlenmiştir. Metanol ekstresinde toplam alkaloid miktarının diğer ekstrele göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Her üç ekstrede de tetrahidropalmitin tetrahydroberberin N-oksit ve allokriptopin alkaloidlerinin varlığı tespit edilmiş, allokriptopinin majör olduğu ve metanol ekstresinin allokriptopin içeriğinin diğer ekstrele göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde, rutin ve kuersetin flavonoidlerinin de metanol ekstresinde diğer ekstrele göre daha yüksek miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. Su ekstresinde ise allokriptopin oranı yüksek olmakla birlikte, tetrahydroberberin alkaloidi ve oleamid yağ asidi miktarı diğer ekstrele göre daha yüksek bulunmuştur.
4. *G. corniculatum* ekstralarının *in vitro* AChE-i özellikleri ile ilgili bulgularımız, tüm ekstraların nöral ölüm etkenlerinden olan AChE artışını azaltıcı etkisinin olduğunu göstermektedir. En etkin AChE inhibisyonunun metanol ekstresinde tespit edilmiş olması, ekstre verimi sonuçlarımız ile de paralellik göstermektedir. Metanol ve su ekstralarının 1000 µg/mL konsantrasyonda pozitif kontrol olarak kullanılan ve FDA tarafından onaylı AChE-i olan galantamine yakın bir etki göstermesi dikkat çekicidir. Elde ettiğimiz sonuçlarda *G. corniculatum* kloroform ekstresinin 1000 µg/mL konsantrasyonu ile metanol ve su ekstresinin 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonları ideal AChE inhibisyonu sağlamıştır.

5. *G. corniculatum* ekstraktlarının nörodejeneratif hücre modeli üzerinde AChE-i etkisine yönelik çalışmamızda, uygulanan H₂O₂ konsantrasyon ve süresi ile (100 µM, 24 saat) fPC12 hücrelerinde AChE indüksiyonu sağlanarak nörodejeneratif hücre modeli başarı ile oluşturulmuştur.
6. *G. corniculatum* ekstrelerinin tek başına uygulandığında fPC12 hücrelerinin AChE aktivitesinde indüksiyona sebep olmadığı ve bu nedenle nörolojik hasarlara karşı güvenilir bir şekilde kullanımının mümkün olabileceği söylenebilir.
7. *G. corniculatum* ekstrelerinin hem fPC12 hücrelerinde H₂O₂ kaynaklı AChE indüksiyonunu engellediği, hem de inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu durum, *G. corniculatum* ekstrelerinin AChE mekanizması sayesinde nörodejeneratif hastalıklara karşı hem önleyici hem de tedavi edici etkiler gösterebileceğini düşündürmüştür. Her iki etkide de metanol ekstresinin diğer ekstreler göre daha etkili olduğu saptanmıştır. Bu etki % ekstraksiyon verimi ve *in vitro* AChE inhibisyonu ile ilgili sonuçlarımızla paralellik göstermiştir.
8. *G. corniculatum* ekstrelerinin H₂O₂'nin sebep olduğu AChE gen ve protein ifadesindeki artışı azaltıcı etkisinin olduğu kanıtlanmıştır. AChE'nin gen ve protein seviyesinde inhibisyonuna ilişkin sonuçlar da metanol ekstresinin diğer ekstreler kıyasla daha etkin olduğunu göstermiştir. Bu durum metanol ekstresinin *in vitro* ve hücrel AChE-i özelliğini doğrulamıştır. Çalışılan tüm metotlarda nörodejeneratif hücre modelinde *in vitro*, hücrel ve moleküler düzeyde AChE mekanizmalarında *G. corniculatum* metanol ekstresinin kloroform ve su ekstresine göre daha etkin olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda, metanol ekstresinde ekstraksiyon veriminin diğer ekstreler göre daha yüksek oluşu, biyoteknolojik uygulamalar için AChE-i eldesinde metanol ekstresinin daha avantajlı olabileceğini göstermektedir.
9. *G. corniculatum* ekstraktlarının nöral apoptotik hücre modeli üzerinde etkisine yönelik çalışmamızda, uygulanan H₂O₂ konsantrasyon ve süresi ile (100 µM, 24 saat) fPC12 hücrelerinde proapoptotik Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 seviyelerinin artışı, anti-apoptotik Bcl-2'nin ise azalışı sağlanarak nöral apoptotik hücre modeli başarı ile oluşturulmuştur.
10. fPC12 hücrelerine H₂O₂'nin ardından uygulanan *G. corniculatum* ekstrelerinin, proapoptotik gen ve protein (Bax, Kaspaz 3, Kaspaz 9) seviyelerinin artışına, anti-apoptotik gen ve protein (Bcl-2) seviyelerinin ise azalışına sebep olarak, oluşturulan nöral apoptotik hücre modelinde H₂O₂ kaynaklı apoptotik hasarı giderici etkilerinin olduğu moleküler düzeyde kanıtlanmıştır. Elde edilen sonuçlarda, 1000 µg/mL'lik su

- ekstresinin 24 saatlik uygulamasının hem gen hem de protein seviyesinde Bax, Kaspaz 3, Kaspaz 9 ve Bcl-2 üzerinde en etkin uygulama olduğu belirlenmiştir (Bax geni hariç).
11. *G. corniculatum* ekstrelerinin inflamatuvar hücre modeli üzerinde anti-inflamatuvar etkisine yönelik çalışmamızda, uygulanan LPS konsantrasyon ve süresi ile (1 µg/mL 24 saat) BV-2 hücrelerinde pro-inflamatuvar TNF-α ve IL-6 protein seviyelerinin artışı sağlanmıştır. Dolayısıyla uygulanan LPS ile nöral inflamatuvar hücre modelinin başarı ile oluşturulduğu söylenebilir.
 12. BV-2 hücrelerine LPS öncesinde uygulanan *G. corniculatum* ekstrelerinin, TNF-α ve IL-6 indüksiyonunu engellediği ve inflamatuvar hücre modelinde anti-inflamatuvar özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Metanol ekstresinin 500 ve 1000 µg/mL'lik konsantrasyonlarında görülen anti-inflamatuvar etkinin sitotoksiteden kaynaklandığı saptanmıştır. Su ekstresinin 1000 µg/mL'lik konsantrasyonunun hem TNF-α hem de IL-6 inhibisyonunda en etkin uygulama olduğu belirlenmiştir.
 13. Metanol ekstresindeki AChE-i özelliğın diğer ekstrelele kıyasla daha etkin oluşunun ekstredeki allokriptopin, rutin ve kuersetinden kaynaklanabileceği söylenebilir. Ayrıca su ekstresinde anti-inflamatuvar ve apoptozu baskılayıcı etkinin diğer ekstrelele kıyasla daha etkin oluşunun ekstredeki tetrahydroberberin ve oleamid etkisi ile ilişkili olabileceği söylenebilir. Dolayısıyla *G. corniculatum* metanol ekstresinin AChE-i maddeler bakımından, su ekstresinin ise anti-inflamatuvar ve apoptozu baskılayıcı etki gösteren bileşikler bakımından iyi bir kaynak olduğundan bahsedilebilir.
 14. İlaç geliştirme aşamalarında etken maddelerin tam etki mekanizmaları bilinmeksizin sadece hayvan model çalışmalarında pozitif sonuç vermesinin baz alınması, etkin ilaç araştırmalarını ve bu ilaca yönelik tedavi yöntemlerini yetersiz kılmaktadır. Bu çalışmada, *G. corniculatum* kloroform, metanol ve su ekstrelerinin nörodejeneratif hastalıklarda çoklu yolaklar üzerinden etki potansiyelinin olduğu gösterilmiştir. Hem bu özelliği hem de doğal kaynaklı olması sebebiyle *G. corniculatum* ekstraktları nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde sağlanamayan tam başarıda, daha etkin ve yan etkisi daha az olan alternatif bileşiklere kaynak olabileceği çalışmamız ile belirlenmiştir. Ancak sonuçlarımızdan yola çıkarak bileşiklerin tam etkilerinin belirlenebilmesi için devam çalışmalarının yapılması gerekmektedir.
 15. Çalışmaya konu olan bitki türünün, Türkiye'de yaygın olarak bulunmasına rağmen, ülkemizde ve yurt dışında bu bitki ekstraktlarının nörodejeneratif hastalıklar üzerine çoklu yolaklarda etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışma mevcut değildir. Bu tez

çalışması bu konuda yapılan ilk çalışma olması nedeniyle *G. corniculatum* bitkisinin nörodejeneratif hastalıklarda alternatif olma potansiyeline dikkat çekmiştir.

16. Çalışmamızın *G. corniculatum* ekstraktlarının AChE, apoptoz ve inflamasyon yollarında etkilerinin ortaya konulduğu ilk çalışma olması nedeniyle, elde edilen sonuçların bitkisel kaynaklı bileşenlerle, nörodejeneratif hastalıkların tedavisi ve / veya önlenmesine yönelik çalışma yapan araştırmacılara önemli katkı sağlaması beklenmektedir.
17. Bu çalışma ile AChE, apoptoz ve inflamasyonda etki mekanizması ortaya konmuş bir ajanın nörodejeneratif ve inflamatuvar hücre modellerinde ağır sitotoksik etkisinin olmadığı (metanol ekstresinin 500 ve 1000 µg/mL'lik konsantrasyonlarının 24 saatlik uygulamaları hariç) belirlenmiştir. Bu durum, *G. corniculatum* ekstraktlarının ilaç hammaddesi olabilme potansiyelini arttırmakta olup, buna yönelik ileri düzey çalışmaların yapılması gerektiği öngörülmektedir.

Sonuçlarımız, *G. corniculatum* ekstrelerinin nörodejeneratif hastalıkların başlangıcı ve seyrinde görülen çoklu yollar üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. AChE, apoptoz ve inflamatuvar yolağın nörodejeneratif hastalıkların ortak moleküler mekanizmaları olduğu göz önüne alındığında, çalışmamız ile *G. corniculatum* ekstrelerinin nörodejeneratif mekanizmalarda her üç yolk üzerinde de etkinliği ortaya konulmuştur. Ayrıca, bulgularımız, *G. corniculatum* ekstrelerinin nöral ölüm ve nöral inflamasyon yollarında etkin ilaç adayı potansiyelinde olan biyoaktif bileşenler için bir kaynak olabileceğini göstermiştir. *G. corniculatum* ekstrelerinin AChE, apoptoz ve inflamasyon yolları üzerinde etkilerinin mukayeseli olarak araştırıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır. Bu tez çalışması ilk olması nedeniyle bundan sonraki çalışmalara kaynak oluşturacaktır. Çalışmamızda tespit edilen etkilerin kaynağı total bitki ekstresidir. Bileşiklerin sinerjistik etki oluşturma potansiyelleri göz önüne alındığında, ilerleyen dönemlerde yapılacak çalışmalarda saf bileşikler yerine bitki ekstrelerinin kullanımının da mümkün olabileceği gösterilmiştir. Her ne kadar ekstrelerdeki bileşik içerikleri belirlenmiş olsa da, etkinin hangi bileşik veya bileşiklerden kaynaklandığının belirlenmesi, detaylı analizleri gerekli kılmaktadır. Ayrıca, ileri düzey moleküler çalışmalar ile nörodejeneratif yollardan sorumlu diğer gen ve proteinlerin ekspresyonundaki etki mekanizmasının daha kapsamlı olarak araştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Aal, E. I., Haroon, A. M., and Mofeed, J. (2015). Successive Solvent Extraction and GC–MS Analysis for the Evaluation of the Phytochemical Constituents of the Filamentous Green Alga *Spirogyra longata*. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 41(3), 233-246.
- Abdel-lateif, K. S., Maghrabi, I. A., and Eldeab, H. A. (2016). The plant natural products: their antioxidants, free radical scavengers, DNA protection and antimicrobial activities. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, 6, 293.
- Abuarqoub, H., Foresti, R., Green, C. J., and Motterlini, R. (2006). Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory actions of 2'-hydroxychalcone in RAW 264.7 murine macrophages. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 290(4), C1092-C1099.
- Adamczyk, B., Adamczyk, S., Smolander, A., Kitunen, V., and Simon, J. (2018). Plant secondary metabolites—missing pieces in the soil organic matter puzzle of boreal forests. *Soils*, 2(1), 2.
- Ademosun, A. O., Oboh, G., Bello, F., and Ayeni, P. O. (2016). Antioxidative properties and effect of quercetin and its glycosylated form (Rutin) on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities. *Journal of Evidence-based Complementary & Alternative Medicine*, 21(4), 11-17.
- Adewusi, E. A., Moodley, N., and Steenkamp, V. (2011). Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected southern African medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 77(3), 638-644.
- Adsersen, A., Kjølbye, A., Dall, O., and Jäger, A. K. (2007). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* Schweigg. and Kort. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(1), 179-182.
- Ahmed, F., Ghalib, R. M., Sasikala, P., and Ahmed, K. M. (2013). Cholinesterase Inhibitors from Botanicals. *Pharmacognosy Reviews*, 7(14), 121-130.
- Ajanal, M., Gundkalle, M. B., and Nayak, S. U. (2012). Estimation of Total Alkaloid in Chitrakadivati by UV-Spectrophotometer. *Ancient Science of Life*, 31(4), 198-201.
- Akeson, R., and Warren, S. L. (1986). PC12 adhesion and neurite formation on selected substrates are inhibited by some glycosaminoglycans and a fibronectin-derived tetrapeptide. *Experimental Cell Research*, 162(2), 347-362.
- Alali, F. Q., Njadat, R. M., Mhaidat, N. M., Alkofahi, A. S., Al-Gharaibeh, M. M., and El-Elimat, T. (2013). Alkaloids from *Glaucium aleppicum* *Papaveraceae*. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6, 308-312.
- Albrecht, S., Bourdeau, M., Bennett, D., Mufson, E. J., Bhattacharjee, M., and LeBlanc, A. C. (2007). Activation of Caspase-6 in aging and mild cognitive impairment. *The American Journal of Pathology*, 170(4), 1200-1209.

- Aliev, G., Obrenovich, M. E., Reddy, V. P., Shenk, J. C., Moreira, P. I., Nunomura, A., Zhu, X., Smith, M. A., and Perry, G. (2008). Antioxidant therapy in Alzheimer's disease: theory and practice. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(13), 1395.
- Al-Qura'n, S. (2009). Ethnopharmacological survey of wild medicinal plants in Showbak, Jordan. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(1), 45-50.
- Al-Snafi, A. E. (2016). Medicinal plants with antioxidant and free radical scavenging effects (part 2): plant based review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 6(7), 62-82.
- Álvarez, A., Cacabelos, R., Sanpedro, C., García-Fantini, M., and Aleixandre, M. (2007). Serum TNF-alpha levels are increased and correlate negatively with free IGF-I in Alzheimer Disease. *Neurobiology of Aging*, 28(4), 533-536.
- Alves de Almeida, A. C., de-Faria, F. M., Dunder, R. J., Manzo, L. P. B., Souza-Brito, A. R. M., and Luiz-Ferreira, A. (2017). Recent Trends in Pharmacological Activity of alkaloids in animal colitis: Potential use for inflammatory bowel disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-24.
- Alzheimer, A. (1906). Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde. *Neurol Central*, 25,1134.
- Amritpal, S., Sanjiv, D., Navpreet, K., and Jaswinder, S. (2010). Berberine: alkaloid with wide spectrum of pharmacological activities. *Journal of Natural Products (India)*, 3, 64-75.
- Anand, R., Gill, K. D., and Mahdi, A. A. (2014). Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*, 76, 27-50.
- Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M. T., Michel, P. P., Marquez, J., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Hirsch, E. C., and Agid, Y. (1997). Apoptosis and Autophagy in Nigral Neurons of Patients with Parkinson's Disease. *Histology and Histopathology*, 12(1), 25-32.
- Anusha, C., Sumathi, T., and Joseph, L. D. (2017). Protective role of apigenin on rotenone induced rat model of Parkinson's disease: Suppression of neuroinflammation and oxidative stress mediated apoptosis. *Chemico-biological Interactions*, 269, 67-79.
- Ao, G. Z., Chu, X. J., Ji, Y. Y., and Wang, J. W. (2014). Antioxidant properties and PC12 cell protective effects of a novel curcumin analogue (2E, 6E)-2, 6-bis (3, 5-dimethoxybenzylidene) cyclohexanone (MCH). *International Journal of Molecular Sciences*. 15(3), 3970-3988.
- Arafa, A. M., Mohamed, M. E. S., and Eldahmy, S. I. (2016). The aerial parts of yellow horn poppy (*Glaucium flavum* Cr.) growing in Egypt: Isoquinoline alkaloids and biological activities. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8(5), 323.
- Bading, H. (2017). Therapeutic targeting of the pathological triad of extrasynaptic NMDA receptor signaling in neurodegenerations. *Journal of Experimental Medicine*, 214(3), 569-578.

- Bagli, E., Goussia, A., Moschos, M. M., Agnantis, N., and Kitsos, G. (2016). Natural compounds and neuroprotection: mechanisms of action and novel delivery systems. *In vivo*, 30(5), 535-547.
- Bai, O., Wei, Z., Lu, W., Bowen, R., Keegan, D., and Li, X. M. (2002). Protective effects of atypical antipsychotic drugs on PC12 cells after serum withdrawal. *Journal of Neuroscience Research*, 69(2), 278-283.
- Bakar, M., ve Yuluğ, B. (2009). Hafif kognitif bozukluk. *Türkiye Klinikleri Journal of Neurology Special Topics*, 2(1), 88-93.
- Balch, W. E., Morimoto, R. I., Dillin, A., and Kelly, J. W. (2008). Adapting proteostasis for disease intervention. *Science*, 319(5865), 916-919.
- Balez, R., Steiner, N., Engel, M., Muñoz, S. S., Lum, J. S., Wu, Y., Wang, D., Vallotton, P., Sachdev, P., O'Connor, M., Sidhu, K., Münch, G., and Ooi, L. (2016). Neuroprotective effects of apigenin against inflammation, neuronal excitability and apoptosis in an induced pluripotent stem cell model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 6, 1-16.
- Bang, O. Y., Hong, H. S., Kim, D. H., Kim, H., Boo, J. H., Huh, K., and Mook-Jung, I. (2004). Neuroprotective effect of genistein against beta amyloid-induced neurotoxicity. *Neurobiology of Disease*, 16(1), 21-28.
- Barcia, C., de Pablos, V., Bautista-Hernández, V., Sánchez-Bahillo, Á., Bernal, I., Fernández-Villalba, E., Martín, J., Banon, R., Fernandez-Barreiro, A., and Herrero, M. T. (2005). Increased plasma levels of TNF- α but not of IL1- β in MPTP-treated monkeys one year after the MPTP administration. *Parkinsonism and Related Disorders*, 11(7), 435-439.
- Barnham, K. J., Masters, C. L., and Bush, A. I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature reviews Drug discovery*, 3(3), 205-214.
- Behl, C. (2000). Apoptosis and Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 107(11), 1325-1344.
- Belfiglio, V. J. (2015). Treatment of traumatic brain injury in the roman army. *Balkan Military Medical Review*, 18(4), 101-105.
- Berghe, T. V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., and Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 15(2), 135-147.
- Bergmann, M. (1993). Motor neuron disease/Amyotrophic Lateral Sclerosis—Lessons from ubiquitin. *Pathology-Research and Practice*, 189(8), 902-912.
- Bergsbaken, T., Fink, S. L., and Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature Reviews Microbiology*, 7(2), 99.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Lipp, P. (1998). Calcium—a life and death signal. *Nature*, 395(6703), 645-648.

- Bhat, R. V., Budd Haeberlein, S. L., and Avila, J. (2004). Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *Journal of Neurochemistry*, 89(6), 1313-1317.
- Bhathena, S. J., and Velasquez, M. T. (2002). Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(6), 1191-1201
- Bhuiyan, M. I. H., Kim, H. B., Kim, S. Y., and Cho, K. O. (2011). The neuroprotective potential of cyanidin-3-glucoside fraction extracted from mulberry following oxygen-glucose deprivation. *The Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 15(6), 353-361.
- Binder, B. Y., Peebles, C. A., Shanks, J. V., and San, K. Y. (2009). The effects of UV-B stress on the production of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnology Progress*, 25(3), 861-865.
- Birks, J. S. (2006). Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1,1-19.
- Björkqvist, M., Wild, E. J., Thiele, J., Silvestroni, A., Andre, R., Lahiri, N., Raibon, E., Lee, R. V., Benn, C. L., Soulet, D., Magnusson, A., Woodman, B., Landles, C., Pouladi, M. A., Hayden, M. R., Khalili-Shirazi, A., Lowdell, M. W., Brundin, P., Bates, G. P., Leavitt, B. R., Möller, T., and Tabrizi, S. J. (2008). A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's Disease. *Journal of Experimental Medicine*, 205(8), 1869-1877.
- Blasi, E., Barluzzi, R., Bocchini, V., Mazzolla, R., and Bistoni, F. (1990). Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *Journal of Neuroimmunology*, 27(2-3), 229-237.
- Boka, G., Anglade, P., Wallach, D., Javoy-Agid, F., Agid, Y., and Hirsch, E. C. (1994). Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's Disease. *Neuroscience Letters*, 172(1-2), 151-154.
- Bond, C. E., Patel, P., Crouch, L., Tetlow, N., Day, T., Abu-Hayyeh, S., Williamson, C., and Greenfield, S. A. (2006). Astroglia up-regulate transcription and secretion of 'readthrough' acetylcholinesterase following oxidative stress. *European Journal of Neuroscience*, 24(2), 381-386.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P., and Lipton, S. A. (1995). Apoptosis and Necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(16), 7162-7166.
- Bozic, I., Savic, D., Stevanovic, I., Pekovic, S., Nedeljkovic, N., and Lavrnja, I. (2015). Benfotiamine upregulates antioxidative system in activated BV-2 microglia cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 351-364.
- Bozkurt, B., Coban, G., Kaya, G. I., Onur, M. A., and Unver-Somer, N. (2017). Alkaloid profiling, anticholinesterase activity and molecular modeling study of *Galanthus elwesii*. *South African Journal of Botany*, 113, 119-127.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brodacki, B., Staszewski, J., Toczyłowska, B., Kozłowska, E., Drela, N., Chalimoniuk, M., and Stępien, A. (2008). Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNF α , and INF γ concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic Parkinsonism. *Neuroscience Letters*, 441(2), 158-162.
- Brooks, B. R., Miller, R. G., Swash, M., and Munsat, T. L. (2000). El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*, 1(5), 293-299.
- Brown, D. R. (2001). Microglia and Prion Disease. *Microscopy Research and Technique*, 54(2), 71-80.
- Brown, G. C., and Neher, J. J. (2014). Microglial phagocytosis of live neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(4), 209-216.
- Burguillos, M. A., Hajji, N., Englund, E., Persson, A., Cenci, A. M., Machado, A., Cano, J., Joseph, B., and Venero, J. L. (2011). Apoptosis-inducing factor mediates dopaminergic cell death in response to LPS-induced inflammatory stimulus: evidence in Parkinson's disease patients. *Neurobiology of Disease*, 41(1), 177-188.
- Cakmur, R. (2011). Parkinson hastalığı ve medikal tedavisi. *Klinik Gelişim*, 53-58.
- Camacho, I. E., Serneels, L., Spittaels, K., Merchiers, P., Dominguez, D., and De Strooper, B. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor γ induces a clearance mechanism for the amyloid- β peptide. *Journal of Neuroscience*, 24(48), 10908-10917.
- Camins, A., Verdaguer, E., Junyent, F., Yeste-Velasco, M., Pelegrí, C., Vilaplana, J., and Pallás, M. (2009). Potential mechanisms involved in the prevention of neurodegenerative diseases by lithium. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 15(4), 333-344.
- Cao, G., Xing, J., Xiao, X., Liou, A. K., Gao, Y., Yin, X. M., Clark, R. S., Graham S. H., and Chen, J. (2007). Critical role of calpain I in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury. *Journal of Neuroscience*, 27(35), 9278-9293.
- Cao, W., Li, M., Wu, T., Feng, F., Feng, T., Xu, Y., and Sun, C. (2017). α MSH prevents ROS-induced apoptosis by inhibiting Foxo1/mTORC2 in mice adipose tissue. *Oncotarget*, 8(25), 40872.
- Capasso, A., Aquino, R., Tommasi, N., Piacente, S., Rastrelli, L., and Pizza, C. (2002). Neuropharmacology activity of alkaloids from South American medicinal plants. *Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents*, 2(1), 1-15.
- Carkeet, C., Clevidence, B. A., and Novotny, J. A. (2008). Anthocyanin excretion by humans increases linearly with increasing strawberry dose. *The Journal of Nutrition*, 138(5), 897-902.

- Casey, D. A., Antimisiaris, D., and O'Brien, J. (2010). Drugs for Alzheimer's disease: are they effective?. *Pharmacy and Therapeutics*, 35(4), 208.
- Chauhan, N. B., and Mehla, J. (2015). Ameliorative effects of nutraceuticals in neurological disorders. In V. R. Preedy, R. R. Watson (Eds.), *Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease*. Academic Press, pp. 245-260.
- Chavez-Valdez, R., Martin, L. J., Flock, D. L., and Northington, F. J. (2012). Necrostatin-1 attenuates mitochondrial dysfunction in neurons and astrocytes following neonatal hypoxia-ischemia. *Neuroscience*, 219, 192-203.
- Cheah, J. H., Kim, S. F., Hester, L. D., Clancy, K. W., Patterson III, S. E., Papadopoulos, V., and Snyder, S. H. (2006). NMDA receptor-nitric oxide transmission mediates neuronal iron homeostasis via the GTPase Dexas1. *Neuron*, 51(4), 431-440.
- Chen, C. Y., Peng, W. H., Tsai, K. D., and Hsu, S. L. (2007). Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF- κ B and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages. *Life Sciences*, 81(23-24), 1602-1614.
- Chen, C., Zhou, J., and Ji, C. (2010). Quercetin: a potential drug to reverse multidrug resistance. *Life Sciences*, 87(11-12), 333-338.
- Chen, H. L., Lee, H. J., Huang, W. J., Chou, J. F., Fan, P. C., Du, J. C., Ku, Y. L., and Chiou, L. C. (2012). *Clerodendrum inerme* leaf extract alleviates animal behaviors, hyperlocomotion, and prepulse inhibition disruptions, mimicking tourette syndrome and schizophrenia. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1, 1-8.
- Chen, H. Q., Jin, Z. Y., Wang, X. J., Xu, X. M., Deng, L., and Zhao, J. W. (2008). Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. *Neuroscience Letters*, 448(2), 175-179.
- Chen, S., Sayana, P., Zhang, X., and Le, W. (2013). Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Molecular Neurodegeneration*, 8(1), 28.
- Chen, X., and Pan, W. (2014). The treatment strategies for neurodegenerative diseases by integrative medicine. *Integrative Medicine International*, 1(4), 223-225.
- Chen, Y., Zheng, Z., Wang, J., Tang, C., Khor, S., Chen, J., Zhang, Z., Tnag, Q., Wang, C., Lou, Y., Wnag, Z., Xiao, J., and Wang, X. (2018). Berberine suppresses apoptosis and extracellular matrix (ECM) degradation in nucleus pulposus cells and ameliorates disc degeneration in a rodent model. *International Journal of Biological Sciences*, 14(6), 682.
- Cheong, C. U., Yeh, C. S., Hsieh, Y. W., Lee, Y. R., Lin, M. Y., Chen, C. Y., and Lee, C. H. (2016). Protective effects of Costunolide against hydrogen peroxide-induced injury in PC12 cells. *Molecules*, 21(7), 898.
- Chertkow, H. (2002). Mild cognitive impairment. *current opinion in neurology*, 15(4), 401-407.
- Cheung, E. C., Joza, N., Steenaart, N. A., McClellan, K. A., Neuspiel, M., McNamara, S., MacLaurin, J. G., Rippstein, P., Park, D. S., Shore, G. C., McBride, H. M., Penninger,

- J. M., Slack, R. S. (2006). Dissociating the dual roles of apoptosis-inducing factor in maintaining mitochondrial structure and apoptosis. *The EMBO Journal*, 25(17), 4061-4073.
- Chiang, C. S., McBride, W. H., and Withers, H. R. (1993). Radiation-induced astrocytic and microglial responses in mouse brain. *Radiotherapy and Oncology*, 29(1), 60-68.
- Chinta, S. J., Ganesan, A., Reis-Rodrigues, P., Lithgow, G. J., and Andersen, J. K. (2013). Anti-inflammatory role of the isoflavone diadzein in lipopolysaccharide-stimulated microglia: implications for Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, 23(2), 145-153.
- Chiti, F., Taddei, N., Bucciantini, M., White, P., Ramponi, G., and Dobson, C. M. (2000). Mutational analysis of the propensity for amyloid formation by a globular protein. *The EMBO Journal*, 19(7), 1441-1449.
- Cho, J. (2006). Antioxidant and neuroprotective effects of hesperidin and its aglycone hesperetin. *Archives of Pharmacal Research*, 29(8), 699-706.
- Choi, D. K., Koppula, S., and Suk, K. (2011). Inhibitors of microglial neurotoxicity: focus on natural products. *Molecules*, 16(2), 1021-1043.
- Choi, Y. T., Jung, C. H., Lee, S. R., Bae, J. H., Baek, W. K., Suh, M. H., Park, J. Park, C. W., and Suh, S. I. (2001). The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate attenuates β -amyloid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Life sciences*, 70(5), 603-614.
- Christofferson, D. E., and Yuan, J. (2010). Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), 263-268.
- Ciofani, G., Genchi, G. G., Liakos, I., Cappello, V., Gemmi, M., Athanassiou, A., Mazzolai, B., and Mattoli, V. (2013). effects of cerium oxide nanoparticles on PC12 neuronal-like cells: proliferation, differentiation, and dopamine secretion. *Pharmaceutical Research*, 30(8), 2133-2145.
- Clarke, P. G. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and Embryology*, 181(3), 195-213.
- Clementi, M. E., Pani, G., Sampaolese, B., and Tringali, G. (2018). Punicalagin reduces H₂O₂-induced cytotoxicity and apoptosis in PC12 cells by modulating the levels of reactive oxygen species. *Nutritional Neuroscience*, 21(6), 447-454.
- Colurso, G. J., Nilson, J. E., and Vervoort, L. G. (2003). Quantitative assessment of DNA fragmentation and beta-amyloid deposition in insular cortex and midfrontal gyrus from patients with Alzheimer's Disease. *Life Sciences*, 73(14), 1795-1803.
- Cook, N. C., and Samman, S. (1996). Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(2), 66-76.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195-1214.

- Corona, C., Pensalfini, A., Frazzini, V., and Sensi, S. L. (2011). New therapeutic targets in Alzheimer's Disease: Brain deregulation of calcium and zinc. *Cell Death and Disease*, 2(6), e176
- Culmsee, C., Zhu, C., Landshamer, S., Becattini, B., Wagner, E., Pellecchia, M., Blomgren, K., Plesnila, N. (2005). Apoptosis-inducing factor triggered by poly (ADP ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *Journal of Neuroscience*, 25(44), 10262-10272.
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), 49-63.
- Çetin, E. S. (2010). *Asmada hücre süspansiyon kültürleri ile sekonder metabolit üretimi üzerine araştırmalar*, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 3-19.
- Dai, J., and Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- Dai, X. J., Li, N., Yu, L., Chen, Z. Y., Hua, R., Qin, X., and Zhang, Y. M. (2015). Activation of BV-2 microglia by lipopolysaccharide triggers an inflammatory reaction in pc12 Cell Apoptosis Through A Toll-like Receptor 4-dependent pathway. *Cell Stress and Chaperones*, 20(2), 321-331.
- Dalton, D. K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I. S., Bradley, A., and Stewart, T. A. (1993). Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science*, 259(5102), 1739-1742.
- Davis, P. H., Cullen, J., Coode, M. J. E., and Hedge, I. C. (1965). Materials for a flora of Turkey: X. *Notes Royal Bot. Gard. Edinburgh*, 26(2), 165-201.
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G. D., Mitchison, T. J., Moskowitz, M. A., Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*, 1(2), 112.
- Dehay, B., Bové, J., Rodríguez-Muela, N., Perier, C., Recasens, A., Boya, P., and Vila, M. (2010). Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, 30(37), 12535-12544.
- Demirci, S., Kutluhan, S., Nazıroğlu, M., Uğuz, A. C., Yürekli, V. A., and Demirci, K. (2013). Effects of selenium and topiramate on cytosolic Ca²⁺ influx and oxidative stress in neuronal PC12 cells. *Neurochemical Research*, 38(1), 90-97.
- Dey, A., Bhattacharya, R., Mukherjee, A., and Pandey, D. K. (2017). Natural products against Alzheimer's disease: Pharmaco-therapeutics and biotechnological interventions. *Biotechnology Advances*, 35(2), 178-216.
- Dichter, M. A., Tischler, A. S., and Greene, L. A. (1977). Nerve growth factor-induced increase in electrical excitability and acetylcholine sensitivity of a rat pheochromocytoma cell line. *Nature*, 268(5620), 501-504.

- Díez-Revuelta, N., Velasco, S., André, S., Kaltner, H., Kübler, D., Gabius, H. J., and Abad-Rodríguez, J. (2010). Phosphorylation of adhesion-and growth-regulatory human galectin-3 leads to the induction of axonal branching by local membrane L1 and ERM redistribution. *Journal of Cell Science*, 123(5), 671-681.
- Dirscherl, K., Karlstetter, M., Ebert, S., Kraus, D., Hlawatsch, J., Walczak, Y., Moehle, C., Fuchshofer, R., and Langmann, T. (2010). Luteolin triggers global changes in the microglial transcriptome leading to a unique anti-inflammatory and neuroprotective phenotype. *Journal of Neuroinflammation*, 7(1), 3.
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., and Morrison III, B. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149(5), 1060-1072.
- Dobson, C. M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature*, 426(6968), 884.
- Dobson, C. M. (2006). Protein aggregation and its consequences for human disease. *Protein and Peptide Letters*, 13(3), 219-227.
- Dodson, M. W., and Guo, M. (2007). Pink1, Parkin, DJ-1 and Mitochondrial dysfunction in Parkinson's Disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 17(3), 331-337.
- Doncheva, T., Kostova, N., Yordanova, G., Saadi, H., Akrib, F., Dimitrov, D., and Philipov, S. (2014). Comparison of alkaloid profile from *Glaucium corniculatum* (Papaveraceae) of Algerian and Bulgarian Origin. *Biochemical Systematics and Ecology*, 56, 278-280.
- Dong, X. Q., Du, Q., Yu, W. H., Zhang, Z. Y., Zhu, Q., Che, Z. H., Chen, F., Wang, H., and Chen, J. (2013). Anti-inflammatory effects of oxymatrine through inhibition of nuclear factor- κ b and mitogen-activated protein kinase activation in lipopolysaccharide-induced BV-2 microglia cells. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 12(1), 165.
- Doti, N., Reuther, C., Scognamiglio, P. L., Dolga, A. M., Plesnila, N., Ruvo, M., and Culmsee, C. (2015). Inhibition of the AIF/CypA complex protects against intrinsic death pathways induced by oxidative stress. *Cell Death and Disease*, 5(1), e993.
- Doughari, J. H. (2012). Phytochemicals: extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents. In *Phytochemicals-A global perspective of their role in nutrition and health*. InTech.1-32.
- Du, H., Guo, L., Fang, F., Chen, D., Sosunov, A. A., McKhann, G. M., Yan, Y., Wang, C., Zhang, H., Molkentin, J. D., Gunn-Moore, F. J., Vonsattel, J. P., Arancio, O., Chen, J. X., Yan, S. D. (2008). Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nature medicine*, 14(10), 1097-1105.
- Dunn, C. (2016). Huntington's Disease--A Review. *The Kabod*, 2(2), 9.
- Durães, F., Pinto, M., and Sousa, E. (2018). Old drugs as new treatments for neurodegenerative diseases. *Pharmaceuticals*, 11(2), 44.

- Ehrt, S., Schnappinger, D., Bekiranov, S., Drenkow, J., Shi, S., Gingeras, T. R., Gaasterland, T., Schoolnik, G., and Nathan, C. (2001). Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon- γ and Mycobacterium tuberculosis: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *Journal of Experimental Medicine*, 194(8), 1123-1140.
- Ekegren, T., Grundström, E., Lindholm, D., and Aquilonius, S. M. (1999). Upregulation of Bax protein and increased dna degradation in als spinal cord motor neurons. *Acta Neurologica Scandinavica*, 100(5), 317-321.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., and Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Ericsson, A., Liu, C., Hart, R. P., and Sawchenko, P. E. (1995). Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: Distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. *Journal of Comparative Neurology*, 361(4), 681-698.
- Ericsson, C., Peredo, I., and Nistér, M. (2007). Optimized protein extraction from cryopreserved brain tissue samples. *Acta Oncologica*, 46(1), 10-20.
- Escudero, A. (1999). Factors controlling the establishment of *Helianthemum squamatum*, an endemic gypsophile of semi-arid Spain. *Journal of Ecology*, 87, 290-302.
- Escudero, A., Iriondo, J. M., Olano, J. M., Rubio, A., and Somolinos, R. C. (2000). Factors affecting establishment of a gypsophyte: the case of *Lepidium subulatum* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, 87(6), 861-871.
- Espallergues, J., Galvan, L., Sabatier, F., Rana-Poussine, V., Maurice, T., and Chatonnet, A. (2010). Behavioral phenotyping of heterozygous acetylcholinesterase knockout (AChE+/-) mice showed no memory enhancement but hyposensitivity to amnesic drugs. *Behavioural Brain Research*. 206(2), 263-273.
- Essa, M. M., Vijayan, R. K., Castellano-Gonzalez, G., Memon, M. A., Braidly, N., and Guillemín, G. J. (2012). Neuroprotective effect of natural products against Alzheimer's disease. *Neurochemical Research*, 37(9), 1829-1842.
- Estus, S., Tucker, H. M., Van Rooyen, C., Wright, S., Brigham, E. F., Wogulis, M., and Rydel, R. E. (1997). Aggregated amyloid- β protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction. *Journal of Neuroscience*, 17(20), 7736-7745.
- Ethuin, F., Delarche, C., Benslama, S., Gougerot-Pocidalo, M. A., Jacob, L., and Chollet-Martin, S. (2001). Interleukin-12 increases interleukin 8 production and release by human polymorphonuclear neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 70(3), 439-446.
- Evans, M. D., and Cooke, M. S. (2004). Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bioessays*, 26(5), 533-542.
- Fader, A. J., Johnson, P. E., and Dohanich, G. P. (1999). Estrogen improves working but not reference memory and prevents amnesic effects of scopolamine on a radial-arm maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 62(4), 711-717.

- Fargo, K., and Bleiler, L. (2014). Alzheimer's association report 2014 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia*, 10(2), e47-e92.
- Farlow, M. R. and Hake, A. M. (2001). New concepts in the drug therapy of Alzheimer's Disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2(12), 1975-1983.
- Farooqui, A. A. (2010). *Neurochemical aspects of neurotraumatic and neurodegenerative diseases* (First edition). USD: Springer Science and Business Media, 393.
- Farooqui, A. A. and Farooqui, T. (2016). Biochemical aspects of n-6 and n-3 fatty acid-derived lipid mediators in the brain. In R. R. Watson and F. D. Meester (Eds.), *Handbook of Lipids in Human Function*. Academic Press and AOCS Press: USA, 457-474.
- Farrer, M. J. (2006). Genetics of Parkinson Disease: paradigm shifts and future prospects. *Nature Reviews Genetics*, 7(4), 306-318.
- Fattorusso, E. and Tagliatela-Scafati, O. (Editors.). (2008). *Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis, and biology*. New York: John Wiley and Sons, 1-24.
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., and De Laurenzi, V. (2012). Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*, 4(5), 330-349.
- Fearnley, J. M. and Lees, A. J. (1991). Ageing and Parkinson's Disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*, 114(5), 2283-2301.
- Feng, Y., Xia, Y., Yu, G., Shu, X., Ge, H., Zeng, K., Wang, J., and Wang, X. (2013). Cleavage of GSK-3 β by calpain counteracts the inhibitory effect of Ser9 phosphorylation on GSK-3 β activity Induced by H₂O₂. *Journal of Neurochemistry*, 126(2), 234-242.
- Ferrari, C. C., Godoy, M. C. P., Tarelli, R., Chertoff, M., Depino, A. M., and Pitossi, F. J. (2006). Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1 β in the substantia nigra. *Neurobiology of Disease*, 24(1), 183-193.
- Fleten, K. G., Flørenes, V. A., Prasmickaite, L., Hill, O., Sykora, J., Mælandsmo, G. M., and Engesæter, B. (2016). hvTRA, a novel TRAIL receptor agonist, induces apoptosis and sustained growth retardation in melanoma. *Cell Death Discovery*, 2, 16081.
- Flusberg, D. A. and Sorger, P. K. (2015). Surviving apoptosis: life–death signaling in single cells. *Trends in Cell Biology*, 25(8), 446-458.
- Forloni, G., Bugiani, O., Tagliavini, F., and Salmona, M. (1996). Apoptosis-Mediated neurotoxicity induced by β -amyloid and PrP fragments. *Molecular and Chemical Neuropathology*, 28(1-3), 163-171.
- Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M., and Wilcock, G. K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's Disease: A review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 66(2), 137-147.
- Fricker, M., Tolkovsky, A. M., Borutaite, V., Coleman, M., and Brown, G. C. (2018). Neuronal cell death. *Physiological Reviews*, 98(2), 813-880.

- Friedlander, R. M. (2003). Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *New England Journal of Medicine*, 348(14), 1365-1375.
- Fu, X., Zhang, J., Guo, L., Xu, Y., Sun, L., Wang, S., Feng, Y., Gou, L., Zhang, L., and Liu, Y. (2014). Protective role of luteolin against cognitive dysfunction induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 126, 122-130.
- Fuentealba, J., and Saez-Orellana, F. (2014). Neuroactive alkaloids that modulate the neuronal nicotinic receptor and provide neuroprotection in an Alzheimer's disease model: the case of Teline monspessulana. *Neural Regeneration Research*, 9(21), 1880.
- Gadano, A. B., Gumi, A. A., Carballo, M. A. (2006). Argentine folk medicine: genotoxic effects of Chenopodiaceae family. *Journal of Ethnopharmacology*, 103, 246-251.
- Galluzzi, L., Kepp, O., and Kroemer, G. (2016). Mitochondrial regulation of cell death: A phylogenetically conserved control. *Microbial Cell*, 3(3), 101-108.
- Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*, 14:1237-43.
- Gamba, P., Testa, G., Gargiulo, S., Staurengi, E., Poli, G., and Leonarduzzi, G. (2015). Oxidized cholesterol as the driving force behind the development of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7(119), 1-21.
- Gambi, F., Reale, M., Iarlori, C., Salone, A., Toma, L., Paladini, C., De Luca, G., Feliciani, C., Salvatore, M., Salerno, R., Theoharides, T. C., Conti, P., Exton, M., and Gambi, D., (2004). Alzheimer patients treated with an AChE inhibitor show higher IL-4 and lower IL-1 β levels and expression in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 24(3), 314-321.
- Gan, P., Zhang, L., Chen, Y., Zhang, Y., Zhang, F., Zhou, X., Zhang, X., Gao, B., Zhen, X., Zhang, J., and Zheng, L. T. (2015). Anti-inflammatory effects of glaucocalyxin B in microglia cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 128(1), 35-46.
- Gandhi, S. and Wood, N. W. (2005). Molecular Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Human Molecular Genetics*, 14(18), 2749-2755.
- Gao, H. M., Jiang, J., Wilson, B., Zhang, W., Hong, J. S., and Liu, B. (2002). Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 81(6), 1285-1297.
- Garcia-Ratés, S., Lewis, M., Worrall, R., and Greenfield, S. (2013). Additive toxicity of β -amyloid by a novel bioactive peptide *in vitro*: possible implications for Alzheimer's Disease. *PloS One*, 8(2), 54864.
- Garcimartín, A., López-Oliva, M. E., González, M. P., Sánchez-Muniz, F. J., and Benedí, J. (2017). hydrogen peroxide modifies both activity and isoforms of acetylcholinesterase in human neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Redox Biology*, 12, 719-726.

- Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L. J. D., and Singla, A. K. (2001). Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Research*, 15(8), 655-669.
- Gasparini, L., Ongini, E., and Wenk, G. (2004). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Alzheimer's disease: old and new mechanisms of action. *Journal of Neurochemistry*, 91(3), 521-536.
- Gendelman, H. E. (2002). Neural immunity: Friend or foe?. *Journal of Neurovirology*. 8(6), 474-479.
- Getman, D. K., Eubanks, J. H., Camp, S., Evans, G. A., and Taylor, P. (1992). The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7. *American Journal of Human Genetics*, 51(1), 170-177.
- Ghasemzadeh, A. and Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(31), 6697-6703.
- Gibert, B. and Mehlen, P. (2015). Dependence receptors and cancer: addiction to trophic ligands. *Cancer Research*, 75(24), 5171-5175.
- Gillespie, R., Mullan, J., and Harrison, L. (2014). Managing Medications: The role of informal caregivers of older adults and people living with dementia. a review of the literature. *Journal of Clinical Nursing*, 23(23-24), 3296-3308.
- Girdhar, S., Girdhar, A., Verma, S. K., Lather, V., and Pandita, D. (2015). Plant derived alkaloids in major neurodegenerative diseases: from animal models to clinical trials. *Journal of Medical Research*, 1(3), 91-100.
- Goetz, C., Stebbins, G., Chung, K., Nicholas, A., Hauser, R., Stacy, M., and Shannon, K. (2017). Topiramate as an adjunct to amantadine in the treatment of dyskinesia in Parkinson's Disease (P1. 018). *Neurology*, 88(16), P1-018.
- Goktas, F. M., Sahin, B., and Yigitarslan, S. (2015). Production of sterilizing agents from *Calendula officinalis* extracts optimized by response surface methodology. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2015,1-7.
- Gómez-Isla, T., Price, J. L., McKeel Jr, D. W., Morris, J. C., Growdon, J. H., and Hyman, B. T. (1996). profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, 16(14), 4491-4500.
- Gong, H. S., Guo, Y., Tian, C., Xie, W. L., Shi, Q., Zhang, J., Chen, C., Liu, Y., and Dong, X. P. (2012). Reduction of protein kinase MARK4 in the brains of experimental scrapie rodents and human prion disease correlates with deposits of PrPSc. *International Journal of Molecular Medicine*, 30(3), 569-578.
- Gonzalez-Scarano, F., and Baltuch, G. (1999). Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annual Review of Neuroscience*, 22(1), 219-240.
- Gopinath, K., and Sudhandiran, G. (2012). Naringin modulates oxidative stress and inflammation in 3-nitropropionic acid-induced neurodegeneration through the

- activation of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 signalling pathway. *Neuroscience*, 227, 134-143.
- Gordon, S. (2003). Do macrophage innate immune receptors enhance atherogenesis? *Developmental Cell*, 5(5), 666-668.
- Gozuacik, D., and Kimchi, A. (2007). Autophagy and cell death. *Current Topics in Developmental Biology*, 78, 217-245.
- Greene, L. A., and Tischler, A. S. (1976). Establishment of A noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(7), 2424-2428.
- Gruol, D. L., and Nelson, T. E. (1997). Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. *Molecular Neurobiology*, 15(3), 307-339.
- Guo, S., Yan, J., Yang, T., Yang, X., Bezard, E., and Zhao, B. (2007). Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease through inhibition of ROS-NO pathway. *Biological Psychiatry*, 62(12), 1353-1362.
- Gurung, R. B., Kim, E. H., Oh, T. J., and Sohng, J. K. (2013). Enzymatic synthesis of apigenin glucosides by glucosyltransferase (YjiC) from *Bacillus licheniformis* DSM 13. *Molecules and Cells*, 36(4), 355-361.
- Gürer, R. (2005). *İdiopatik Parkinson hastalığı etyopatogenezinde seruloplazminin yeri ve proton mr spektroskopisi ile verifikasyonu*, Uzmanlık Tezi, TC Sağlık Bakanlığı, Göztepe Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, Nöroloji Kliniği, İstanbul, 1-16.
- Hagenaars, S. P., Radaković, R., Crockford, C., Fawns-Ritchie, C., Harris, S. E., Gale, C. R., and Deary, I. (2018). Genetic risk for neurodegenerative disorders, and its overlap with cognitive ability and physical function. *PloS One*, 13(6), 1-26.
- Hakemi-Vala, M., Mehrara, M., Pourramezan, M., Asgarpanah, J., Rahimifard, N., Khoshnood, S., and Heidary, M. (2017). Comparison the antimicrobial effects of the flowering aerial parts of *Glaucium vitellinum* Boiss. and Buhse and *Gaillonia aucheri* Jaub. And Spach. *Novelty in Biomedicine*, 5, 24-29.
- Halestrap, A. P., and Richardson, A. P. (2015). The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 78, 129-141.
- Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., and Moilanen, E. (2007). Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of Inflammation*, 2007(4), 1-10.
- Hampton, M. B., and Orrenius, S. (1997). Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Letters*, 414(3), 552-556.

- Han, J., Lin, H., and Huang, W. (2011). Modulating gut microbiota as an anti-diabetic mechanism of berberine. *Medical Science Monitor*, 17(7), 164–167.
- Han, Q., Yuan, Q., Meng, X., Huo, J., Bao, Y., and Xie, G. (2017). 6-Shogaol attenuates LPS-induced inflammation in BV2 microglia cells by activating PPAR- γ . *Oncotarget*, 8(26), 42001.
- Hanisch, U. K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 40(2), 140-155.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Saito, I., Okano, H., and Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441(7095), 885.
- Harborne, J. B., and Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
- Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580), 353-356.
- Harel, M., Schalk, I., Ehret-Sabatier, L., Bouet, F., Goeldner, M., Hirth, C., Axelsen, P. H., Silman, I., and Sussman, J. L. (1993). Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(19), 9031-9035.
- Hartl, F. U., and Hayer-Hartl, M. (2009). Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nature Structural and Molecular Biology*, 16(6), 574-581.
- Hartley, A., Stone, J. M., Heron, C., Cooper, J. M., and Schapira, A. H. V. (1994). Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PC12 cells: relevance to Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry*, 63(5), 1987-1990.
- Hartmann, A., Mouatt-Prigent, A., Faucheux, B. A., Agid, Y., and Hirsch, E. C. (2002). FADD: A Link Between TNF Family Receptors and Caspases in Parkinson's Disease. *Neurology*, 58(2), 308-310.
- Hartmann, A., Troadec, J. D., Hunot, S., Kikly, K., Faucheux, B. A., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Agid, Y., and Hirsch, E. C. (2001). Caspase-8 is an effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's Disease, but pathway inhibition results in neuronal necrosis. *Journal of Neuroscience*, 21(7), 2247-2255.
- Harun, A., Vidyadaran, S., Lim, S. M., Cole, A. L., and Ramasamy, K. (2015). Malaysian endophytic fungal extracts-induced anti-inflammation in lipopolysaccharide-activated BV-2 microglia is associated with attenuation of NO Production and, IL-6 and TNF- α expression. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 166.
- Heneka, M. T. (2006). Inflammation in Alzheimer's Disease. *Clinical Neuroscience Research*, 6(5), 247-260.
- Herkenham, M., Lee, H. Y., and Baker, R. A. (1998). Temporal and spatial patterns of c-fos mRNA induced by intravenous interleukin-1: A cascade of non-neuronal cellular activation at the blood-brain barrier. *Journal of Comparative Neurology*, 400(2), 175-196.

- Hernandez, F., Nido, J. D., Avila, J., and Villanueva, N. (2009). GSK3 inhibitors and disease. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 9(9), 1024-1029.
- Hernandez, M. F., Falé, P. L., Araújo, M. E. M., and Serralheiro, M. L. M. (2010). Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of the water extracts of several *Hypericum* species. *Food Chemistry*, 120(4), 1076-1082.
- Hesse, M., (2002). *Alkaloids: Nature's Curse or Blessing?* (First edition). Zürich: John Wiley and Sons, 1-413.
- Ho, N., Myers, M. P., Douglass, T. G., Zhang, J. G., Delgado, C., Driggers, L., Callahan, L. L., VanDeusen, G., Pham, J. T., Bhakta, N., Ge, L., and Judas, M. R. (2009). Molecular mechanisms of paraptosis induction: implications for a non-genetically modified tumor vaccine. *PloS One*, 4(2), 4631.
- Hooper, N. M. (2005). Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein. *Biochemical Society Transactions*, 33(2): 335–338.
- Horvath, R. J., Nutile-McMenemy, N., Alkaitis, M. S., and DeLeo, J. A. (2008). Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine, and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures. *Journal of Neurochemistry*, 107(2), 557-569.
- Houghton, P. J. and Howes, M. J. (2005). Natural products and derivatives affecting neurotransmission relevant to Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neurosignals*, 14(1–2), 6–22.
- Houghton, P. J., Ren, Y., and Howes, M. J. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports*, 23(2), 181-199.
- Howes, R. M. J. and Houghton, J. P. (2012). Ethnobotanical treatment strategies against Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 9(1), 67-85.
- Hsiao, H. Y. and Chern, Y. (2010). Targeting glial cells to elucidate the pathogenesis of Huntington's Disease. *Molecular Neurobiology*, 41(2-3), 248-255.
- Hu, D. N., Bi, M., Zhang, D. Y., Ye, F., McCormick, S. A., and Chan, C. C. (2014). Constitutive and LPS-induced expression of MCP-1 and IL-8 by human uveal melanocytes *in vitro* and relevant signal pathways. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 55(9), 5760-5769.
- Hu, H., Li, Z., Zhu, X., Lin, R., Lin, J., Peng, J., Tao, J., and Chen, L. (2013). gua lou gui zhi decoction suppresses LPS-induced activation of the TLR4/NF- κ B pathway in BV-2 murine microglial cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 31(6), 1327-1332.
- Huang, B. R., Chang, P. C., Yeh, W. L., Lee, C. H., Tsai, C. F., Lin, C., Lin, H. Y., Liu, Y. S., Wu, C. Y. J., Ko, P. Y., Huang, S. S., Hsu, H. C., and Lu, D. Y. (2014). Anti-neuroinflammatory effects of the calcium channel blocker nifedipine on microglial cells: implications for neuroprotection. *PloS One*, 9(3), 1-10.

- Huang, C., Lin, Y., Su, H., and Ye, D. (2015). Forsythiaside protects against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis in PC12 Cell. *Neurochemical Research*, 40(1), 27-35.
- Huang, S. M., Tsai, S. Y., Lin, J. A., Wu, C. H., and Yen, G. C. (2012). Cytoprotective effects of hesperetin and hesperidin against amyloid β -induced impairment of glucose transport through downregulation of neuronal autophagy. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56(4), 601-609.
- Huang, X., Lee, B., Johnson, G., Naleway, J., Guzikowski, A., Dai, W., and Darzynkiewicz, Z. (2005). Novel assay utilizing fluorochrome-tagged physostigmine (Ph-F) to in situ detect active acetylcholinesterase (AChE) induced during apoptosis. *Cell Cycle*. 4(1), 140-147.
- Huo, Y., Rangarajan, P., Ling, E. A., and Dheen, S. T. (2011). Dexamethasone inhibits the Nox-dependent ROS production via suppression of MKP-1-dependent MAPK pathways in activated microglia. *BMC Neuroscience*, 12(1), 49.
- Huppertz, B., Frank, H. G., and Kaufmann, P. (1999). The apoptosis cascade—morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anatomy and Embryology*. 200(1), 1-18.
- Hussain, G., Zhang, L., Rasul, A., Anwar, H., Sohail, M. U., Razaq, A., Aziz, N., Shabbir, A., Ali, M., and Sun, T. (2018). Role of plant-derived flavonoids and their mechanism in attenuation of Alzheimer's and Parkinson's Diseases: An Update of Recent Data. *Molecules*, 23(4), 814.
- Ince, P. G., Highley, J. R., Kirby, J., Wharton, S. B., Takahashi, H., Strong, M. J., and Shaw, P. J. (2011). Molecular pathology and genetic advances in amyotrophic lateral sclerosis: an emerging molecular pathway and the significance of glial pathology. *Acta Neuropathologica*, 122(6), 657-671.
- Ishige, K., Schubert, D., and Sagara, Y. (2001). Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(4), 433-446.
- Israilov, I. A., Karimova, S. U., Denisenko, O. N., Yunusov, M. S., Murav'eva, D. A., and Yunusov, S. Y. (1983). Alkaloids of *Glaucium corniculatum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 19(6), 714-716.
- İnternet 1: Türkiye'de 600 bin aile Alzheimer hastalığı ile mücadele ediyor. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Ft24.com.tr%2Fhaber%2Fturkiyede-600-bin-aile-alzheimer-hastaligi-ile-mucadele-ediyor%2C360718&date=2018-09-10>, Son Erişim Tarihi: 10.09.2018.
- İnternet 2: World Population Prospects: The 2017 Revision. 018-09-10. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.un.org%2Fdevelopment%2Fdesa%2Fpublications%2Fworld-population-prospects-the-2017-revision.html&date=2018-09-10>, Son Erişim Tarihi: 10.09.2018.
- İnternet 3: Türkiye'de Parkinson hastalığı sıklığında ciddi oranda artış bekleniyor. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.medikalakademi.co>

m.tr%2Fturkiyede-parkinson-hastaligi-sikliginda-ciddi-oranda-artist-bekleniyor&date=2018-09-10, Son Erişim Tarihi: 10.09.2018.

İnternet 4: Türkiye’de ALS MNH Hastalığı. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.als.org.tr%2Fturkiye-de-als-mnh-hastaligi&date=2018-09-10>, Son Erişim Tarihi: 10.09.2018.

İnternet 5: Citron, M.. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2018-09-10. URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.nature.com%2Fnrn%2Fjournal%2Fv5%2Fn9%2Ffig_tab%2Fnrn1495_F3.html&date=2018-09-10, Son Erişim Tarihi: 10.09.2018.

İnternet 6: Featured Research IN THE LAB: Francesca Bartolini, PhD. *Nature Reviews Neuroscience*. 2018-09-10. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.cumc.columbia.edu%2Fdept%2Ftaub%2Fres-featured-4-2015.html&date=2018-09-10>, Son Erişim Tarihi: 10.09.2018.

İnternet 7: Alkaloids. *Nature Reviews Neuroscience*. 2018-09-10. URL: http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.chemicalbook.com%2FProductCatalog_EN%2F2322-4.htm&date=2018-09-10, Son Erişim Tarihi: 10.09.2018.

İnternet 8: Why is methanol generally used as a first solvent for extraction purpose to look for bioactives in medicinal plants?. *Nature Reviews Neuroscience*. 2018-09-10. URL: http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fpost%2FWhy_is_methanol_generally_used_as_a_first_solvent_for_extraction_purpose_to_look_for_bioactives_in_medicinal_plants&date=2018-09-10, Son Erişim Tarihi: 10.09.2018.

Jana, P. (2012). *Screening of alkaloidal plants for antioxidant and anticholinesterase activity in vitro*, Doctoral Thesis, II. Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Prague, 40.

Jang, K. J., Kim, H. K., Han, M. H., Oh, Y. N., Yoon, H. M., Chung, Y. H., Kim, G. Y., Hwang, H., J., Kim, B. W., and Choi, Y. H. (2013). Anti-inflammatory effects of saponins derived from the roots of *Platycodon grandiflorus* in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 31(6), 1357-1366.

Jeger, R. V. (2013). Mens sana in corpore sano revisited. *European Heart Journal*, 34(33), 2580–2581.

Jellinger, K. A. (2009). Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *Journal of Neural Transmission*, 116(9), 1111-1162.

Jeon, S. J., Kwon, K. J., Shin, S., Lee, S. H., Rhee, S. Y., Han, S. H., Lee, J., Kim, H. Y., Cheong, J. H., Ryu, J. H., Min, B. S., Ko, K. H., Shin, C. Y. (2009). Inhibitory effects of *Coptis japonica* alkaloids on the LPS-induced activation of BV-2 microglial cells. *Biomolecules and Therapeutics*, 17(1), 70-78.

- Jeong, S. (2017). Molecular and cellular basis of neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Molecules and Cells*, 40(9), 613.
- Ji, H. F., and Shen, L. (2012). Molecular basis of inhibitory activities of berberine against pathogenic enzymes in Alzheimer's disease. *The Scientific World Journal*, 10, 1-4.
- Jiang, B., Liu, J. H., Bao, Y. M., and An, L. J. (2003). Hydrogen peroxide-induced apoptosis in pc12 cells and the protective effect of puerarin. *Cell Biology International*, 27(12), 1025-1031.
- Jiang, B., Liu, J. H., Bao, Y. M., and An, L. J. (2004). Catalpol inhibits apoptosis in hydrogen peroxide-induced PC12 cells by preventing cytochrome c release and inactivating of caspase cascade. *Toxicon*, 43(1), 53-59.
- Jiang, F., Gao, R., Liu, H., Zhao, D., Xu, P., Zhang, L., and Qian, X. (2016). Neuroprotective effect of hyperoside on human PC12 cells against the oxidative damage. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 9(5), 5176-5183.
- Jiang, H., Zhang, J., Zhu, H., Li, H., and Zhang, X. (2007). Nerve growth factor prevents the apoptosis-associated increase in acetylcholinesterase activity after hydrogen peroxide treatment by activating Akt. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(1), 46-56.
- Jimoh, F., Adedapo, A., Aliero, A., and Afolayan, A. (2010). Polyphenolic and biological activities of leaves extracts of *Argemone subfusiformis* (Papaveraceae) and *Urtica urens* (Urticaceae). *Revista de Biología Tropical*, 58(4), 1517-1531.
- Jin, Q. H., He, H. Y., Shi, Y. F., Lu, H., and Zhang, X. J. (2004). Overexpression of acetylcholinesterase inhibited cell proliferation and promoted apoptosis in NRK cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25, 1013-1021.
- Jing, P., Jin, Q., Wu, J., and Zhang, X. J. (2008). GSK3 β mediates the induced expression of synaptic acetylcholinesterase during apoptosis. *Journal of Neurochemistry*, 104(2), 409-419.
- Jones, S. E., and Jomary, C. (2002). Clusterin. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 34(5), 427-431.
- Jung, K. H., Kim, M. J., Ha, E., Uhm, Y. K., Kim, H. K., Chung, J. H., and Yim, S. V. (2006). Suppressive Effect of *Punica granatum* on the production of tumor necrosis factor (Tnf) in BV-2 microglial cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(6), 1258-1261.
- Jung, W. K., Lee, D. Y., Park, C., Choi, Y. H., Choi, I., Park, S. G., Seo, S. K., Lee, S. W., Yea, S. S., Ahn, S. C., Lee, C. M., Park, W. S., Ko, J. H., and Choi, I. W. (2010). Cilostazol is Anti-inflammatory in BV-2 Microglial cells by inactivating nuclear factor-kappab and inhibiting mitogen-activated protein kinases. *British Journal of Pharmacology*, 159(6), 1274-1285.
- Jung, W., Yu, O., Lau, S. M. C., O'Keefe, D. P., Odell, J., Fader, G., and McGonigle, B. (2000). Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nature Biotechnology*, 18(2), 208-212.

- Kapur, S., Agid, O., Mizrahi, R., and Li, M. (2006). How antipsychotics work—from receptors to reality. *NeuroRx*, 3(1), 10-21.
- Karol, S., Ayvalı, C. ve Suludere, Z. (2000). *Hücre Biyolojisi* (Dördüncü Baskı). Türkiye: Öğün Matbaacılık, 187.
- Kasugai, S., Hasegawa, N., and Ogura, H. (1990). A simple *in vitro* cytotoxicity test using the MTT (3-(4, 5) Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyl Tetrazolium Bromide) colorimetric assay: analysis of eugenol toxicity on dental pulp cells (RPC-C2A). *The Japanese Journal of Pharmacology*, 52(1), 95-100.
- Kaufmann, W. E., Worley, P. F., Taylor, C. V., Bremer, M., and Isakson, P. C. (1997). Cyclooxygenase-2 expression during rat neocortical development and in rett syndrome. *Brain and Development*, 19(1), 25-34.
- Kelly, N. H., Schimenti, J. C., Ross, F. P., and van der Meulen, M. C. (2014). A Method for isolating high quality RNA from mouse cortical and cancellous bone. *Bone*, 68, 1-5.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A Basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257.
- Khatoon, S. (2017). Research article a novel histological approach for identification of alkaloid bearing plants. *International Journal of Botany*, 13(1): 28-36.
- Kılıç, F. M., Yıldız, K., ve Kılıç, M. (2018). Türkiye’de yayılış gösteren bazı *Glaucium mill.*(*Papaveraceae*) taksonlarının habitat özellikleri. *Turkish Journal of Life Sciences*. 3(2), 255-262.
- Kiechle, T., Dedeoglu, A., Kubilus, J., Kowall, N. W., Beal, M. F., Friedlander, R. M., Hersch, S. M., and Ferrante, R. J. (2002). Cytochrome c and caspase-9 expression in Huntington’s Disease. *Neuromolecular Medicine*, 1(3), 183-195.
- Kim, E. K., and Choi, E. J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in Human Diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1802(4), 396-405.
- Kim, H. G., Ju, M. S., Ha, S. K., Lee, H., Lee, H., Kim, S. Y., and Oh, M. S. (2012). Acacetin protects dopaminergic cells against 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced neuroinflammation in vitro and in vivo. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(8), 1287-1294.
- Kim, J. B., Han, A. R., Park, E. Y., Kim, J. Y., Cho, W., Lee, J., Seo, E. K., and Lee, K. T. (2007). Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by Poncirin Through the NF- κ B inactivation in RAW 264.7 macrophage cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(12), 2345-2351.
- Kim, J., Basak, J. M., and Holtzman, D. M. (2009). The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*, 63(3), 287-303.

- Kim, S. R., Hwang, S. Y., Jang, Y. P., Park, M. J., Markelonis, G. J., Oh, T. H., and Kim, Y. C. (1999). Protopine from *Corydalis ternata* has anticholinesterase and anti-amnesic activities. *Planta Medica*, 65(03), 218-221.
- Kim, S. Y., Bae, S., Choi, K. H., and An, S. (2011). Hydrogen peroxide controls Akt Activity via ubiquitination/degradation pathways. *Oncology Reports*, 26(6), 1561-1566.
- Kim, S., Lee, M. S., Lee, B., Gwon, W. G., Joung, E. J., Yoon, N. Y., and Kim, H. R. (2014). Anti-inflammatory effects of sargachromenol-rich ethanolic extract of *Myagropsis myagroides* on lipopolysaccharide-stimulated BV-2 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 231.
- Kintsurashvili, L. G. and Vachnadze, V. Y. (2000). Alkaloids of *Glaucium corniculatum* and *G. flavum* growing in Georgia. *Chemistry of Natural Compounds*, 36(2), 225-226.
- Knapp, L. T., and Klann, E. (2000). Superoxide-induced stimulation of protein kinase C via thiol modification and modulation of zinc content. *Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 24136-24145.
- Koca, N., ve Karadeniz, F. (2003). Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 16, 32-37.
- Koçancı, F. G., Hamamcıoğlu and Aslim, B. (2017). Neuroprotective effects of rutin and quercetin flavonoids in *Glaucium corniculatum* methanol and water extracts. *International Journal of Secondary Metabolite*, 4(3), 85-93.
- Koçancı, F. G., and Aslim, B. (2016). Structure and functions of acetylcholinesterase and acetylcholinesterase inhibitory activity of plants. *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*, 6(1), 19-35.
- Kolb, D. K. and Brown, J. B. (1955). Low temperature solubilities of fatty acids in selected organic solvents. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 32(6), 357-361.
- Koltai, T. (2014). Clusterin: a key player in cancer chemoresistance and its inhibition. *OncoTargets and Therapy*, 7, 447-456.
- Koopman, W. J., Willems, P. H., and Smeitink, J. A. (2012). Monogenic mitochondrial disorders. *New England Journal of Medicine*, 366(12), 1132-1141.
- Kossmann, T., Hans, V., Imhof, H. G., Trentz, O., and Morganti-Kossmann, M. C. (1996). Interleukin-6 released in human cerebrospinal fluid following traumatic brain injury may trigger nerve growth factor production in astrocytes. *Brain Research*, 713(1-2), 143-152.
- Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A., Piacentini, M., Nagata, S., and Melino, G. (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation*, 12(12), 1463-1467.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M.,

- Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 3-11.
- Ktistakis, N. T., Tooze, S. A. (2016). Digesting the expanding mechanisms of autophagy. *Trends Cell Biol*, 26, 624–635.
- Kulkarni, S. K. and Dhir, A. (2010). Berberine: a plant alkaloid with therapeutic potential for central nervous system disorders. *Phytotherapy Research*, 24(3), 317–324.
- Kumar, A., Chen, S. H., Kadiiska, M. B., Hong, J. S., Zielonka, J., Kalyanaraman, B., and Mason, R. P. (2014). Inducible nitric oxide synthase is key to peroxynitrite-mediated, LPS-induced protein radical formation in murine microglial BV-2 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 73, 51-59.
- Kumar, G. P. and Khanum, F. (2012). Neuroprotective potential of phytochemicals. *Pharmacognosy Reviews*, 6(12), 81.
- Kuzhandaivel, A., Nistri, A., and Mladinic, M. (2010). Kainate-mediated excitotoxicity induces neuronal death in the rat spinal cord in vitro via a PARP-1 dependent cell death pathway (Parthanatos). *Cellular and Molecular Neurobiology*, 30(7), 1001-1012.
- Larsen, B., Mau, K., Padilla, M., and Enciso, R. (2017). NMDA Receptor antagonists for the treatment of neuropathic pain compared to placebo: A systematic review and meta-analysis. *Open Journal of Dentistry and Oral Medicine*, 5(4), 59-71.
- Lau, C. W., Yao, X. Q., Chen, Z. Y., Ko, W. H., Huang, Y. (2001). Cardiovascular actions of berberine. *Cardiovascular Drug Reviews*, (19)3, 234–244.
- Lavrik, I. N., and Krammer, P. H. (2012). Regulation of CD95/Fas Signaling at the DISC. *Cell Death and Differentiation*, 19(1), 36-41.
- Lee, J. H., Cheon, Y. H., Woo, R. S., Song, D. Y., Moon, C., and Baik, T. K. (2012). Evidence of early involvement of apoptosis inducing factor-induced neuronal death in Alzheimer brain. *Anatomy and Cell Biology*, 45(1), 26-37.
- Lee, S. Y., Ju, M. K., Jeon, H. M., Jeong, E. K., Lee, Y. J., Kim, C. H., Park, H. G., Han, S. I., and Kang, H. S. (2018). Regulation of tumor progression by programmed necrosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1, 1-28.
- Lee, Y. B., Nagai, A., and Kim, S. U. (2002). Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *Journal of Neuroscience Research*, 69(1), 94-103.
- Lei, E., Vacy, K., and Boon, W. C. (2016). Fatty acids and their therapeutic potential in neurological disorders. *Neurochemistry International*, 95, 75-84.
- Lei, L., Wang, J., Zhang, Z., Zhang, H., Chen, H., and Cai, D. (2013). Lipopolysaccharide-induced apoptosis in a murine intestinal endocrine cell line by modulation of Bcl-2, Bax and caspase-3. *Molecular Medicine Reports*, 8(6), 1649-1654.

- Leonard, B. E. and Myint, A. (2006). Changes in the immune system in depression and dementia: causal or coincidental effects? *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 8(2), 163-174.
- Lev, N., Melamed, E., and Offen, D. (2003). Apoptosis and Parkinson's Disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27(2), 245-250.
- Levi, A., Eldridge, J. D. and Paterson, B. M. (1985). Molecular cloning of a gene sequence regulated by nerve growth factor. *Science*, 229(4711), 393-395.
- Li, C. and Jackson, R. M. (2002). Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 282(2), C227-C241.
- Li, P. A., Kristián, T., He, Q. P., and Siesjö, B. K. (2000). Cyclosporin A enhances survival, ameliorates brain damage, and prevents secondary mitochondrial dysfunction after a 30-minute period of transient cerebral ischemia. *Experimental Neurology*, 165(1), 153-163.
- Li, P., and Li, Z. (2015). Neuroprotective effect of paeoniflorin on H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells by modulation of reactive oxygen species and the inflammatory response. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 9(5), 1768-1772.
- Li, Y., Liu, L., Kang, J., Sheng, J. G., Barger, S. W., Mrak, R. E., and Griffin, W. S. T. (2000). Neuronal–glial Interactions Mediated by Interleukin-1 Enhance Neuronal Acetylcholinesterase Activity and mRNA Expression. *Journal of Neuroscience*, 20(1), 149-155.
- Li, Y., Yang, X., Ma, C., Qiao, J., and Zhang, C. (2008). Necroptosis contributes to the NMDA-induced excitotoxicity in rat's cultured cortical neurons. *Neuroscience Letters*, 447(2-3), 120-123.
- Lin, A. M., Chyi, B. Y., Wu, L. Y., Hwang, L. S., and Ho, L. T. (1998). The antioxidative property of green tea against iron-induced oxidative stress in rat. *Chinese Journal of Physiology*, 41(4), 189-194.
- Lin, C. C., Tsai, P., Sun, H. Y., Hsu, M. C., Lee, J. C., Wu, I. C., Tsao, C. W., Chang, T. T., and Young, K. C. (2014a). Apolipoprotein J, a glucose-upregulated molecular chaperone, stabilizes core and NS5A to promote infectious hepatitis C virus virion production. *Journal of Hepatology*, 61(5), 984-993.
- Lin, J. Y., and Tang, C. Y. (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, 101(1), 140-147.
- Lin, T. Y., Huang, W. J., Wu, C. C., Lu, C. W., and Wang, S. J. (2014b). Acacetin inhibits glutamate release and prevents kainic acid-induced neurotoxicity in rats. *PLoS One*, 9(2), 1-10.
- Ling, Z., Gayle, D. A., Ma, S. Y., Lipton, J. W., Tong, C. W., Hong, J. S., and Carvey, P. M. (2002). In utero bacterial endotoxin exposure causes loss of tyrosine hydroxylase neurons in the postnatal rat midbrain. *Movement Disorders*, 17(1), 116-124.

- Ling, Z., Zhu, Y., wai Tong, C., Snyder, J. A., Lipton, J. W., and Carvey, P. M. (2006). Progressive dopamine neuron loss following supra-nigral lipopolysaccharide (LPS) infusion into rats exposed to LPS prenatally. *Experimental neurology*, 199(2), 499-512.
- Lipton, S. A., and Rosenberg, P. A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New England Journal of Medicine*, 330(9), 613-622.
- Liu, E. Y., Xu, M. L., Jin, Y., Wu, Q., Dong, T. T., and Tsim, K. W. (2018a). Genistein, a Phytoestrogen in Soybean, Induces the Expression of acetylcholinesterase via G protein-coupled receptor 30 in PC12 cells. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11(59), 1-11.
- Liu, M., Xu, Y., Han, X., Liang, C., Yin, L., Xu, L., Qi, Y., Zhao, Y., Peng, J., and Sun, C. (2014). Potent effects of flavonoid-rich extract from *Rosa laevigata* michx fruit against hydrogen peroxide-induced damage in PC12 cells via attenuation of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Molecules*, 19(8), 11816-11832.
- Liu, W. Z., Huang, B. W., You, W. J., Hu, P., Wang, X. H., Zhang, J. Y., Xu, X. B., Zhang, Z. Y., Pan, B. X., and Zhang, W. H. (2018b). Harmine enhances GABAergic transmission onto basoamygdala projection neurons in mice. *Brain Research Bulletin*, 137, 294-300.
- Liu, X., Xu, K., Yan, M., Wang, Y., and Zheng, X. (2010). Protective effects of galantamine against A β -induced PC12 cell apoptosis by preventing mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Neurochemistry International*, 57(5), 588-599.
- Lleo, A., Greenberg, S., and Growdon, J. (2006). Current pharmacotherapy for Alzheimer's Disease. *Annual Review of Medicine*, 57, 513-533.
- Loane, D. J., and Byrnes, K. R. (2010). Role of Microglia in Neurotrauma. *Neurotherapeutics*, 7(4), 366-377.
- Loizzo, M. R., Tundis, R., Menichini, F., and Menichini, F. (2008). Natural products and their derivatives as cholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative disorders: an update. *Current Medicinal Chemistry*, 15(12), 1209-1228.
- Long-Smith, C. M., Sullivan, A. M., and Nolan, Y. M. (2009). The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's Disease. *Progress in Neurobiology*, 89(3), 277-287.
- Lu, D. Y., Tang, C. H., Liou, H. C., Teng, C. M., Jeng, K. C., Kuo, S. C., Lee, F. Y., and Fu, W. M. (2007). YC-1 attenuates LPS-induced proinflammatory responses and activation of Nuclear Factor- κ B in Microglia. *British Journal of Pharmacology*, 151(3), 396-405.
- Lu, P., Kamboj, A., Gibson, S. B., and Anderson, C. M. (2014). Poly (ADP-ribose) polymerase-1 causes mitochondrial damage and neuron death mediated by Bnip3. *Journal of Neuroscience*, 34(48), 15975-15987.

- Lukhele, S. T. (2015). *Crude extracts of solvents isolated from cannabis sativa plant extracts inhibit growth and induce apoptosis in cervical cancer cells*, Master Thesis, University of the Witwatersrand, Faculty of Science, Johannesburg, 57-65.
- Lv, R., Du, L., Lu, C., Wu, J., Ding, M., Wang, C., Mao, N., and Shi, Z. (2017). Allicin protects against H₂O₂-induced apoptosis of PC12 cells via the mitochondrial pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(3), 2053-2059.
- Ma, S., Liu, X., Xun, Q., and Zhang, X. (2014). Neuroprotective effect of Ginkgolide K against H₂O₂-induced PC12 cell cytotoxicity by ameliorating mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37(2), 217-225.
- Ma, W., Yuan, L., Yu, H., Ding, B., Xi, Y., Feng, J., and Xiao, R. (2010). Genistein as a neuroprotective antioxidant attenuates redox imbalance induced by β -amyloid peptides 25–35 in PC12 cells. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 28(4), 289-295.
- Magalingam, K. B., Radhakrishnan, A. K., and Haleagrahara, N. (2015). Protective mechanisms of flavonoids in Parkinson's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1, 1-14.
- Mahmood, T., and Yang, P. C. (2012). Western Blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429-434.
- Mandavilli, B. S., Boldogh, I., and Van Houten, B. (2005). 3-nitropropionic acid-induced hydrogen peroxide, mitochondrial DNA damage, and cell death are attenuated by Bcl-2 overexpression in PC12 cells. *Molecular Brain Research*, 133(2), 215-223.
- Mandegary, A., Soodi, M., Sharififar, F., and Ahmadi, S. (2014). Anticholinesterase, antioxidant, and neuroprotective effects of tripleurospermum disciforme and dracocephalum multicaule. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 5(3), 162-166.
- Mandemakers, W., Morais, V. A., and De Strooper, B. (2007). A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases. *Journal of Cell Science*, 120(10), 1707-1716.
- Mandir, A. S., Poitras, M. F., Berliner, A. R., Herring, W. J., Guastella, D. B., Feldman, A., Poirier, G. G., Wang, Z. Q., Dawson, V. L. (2000). NMDA but not non-NMDA excitotoxicity is mediated by Poly (ADP-ribose) polymerase. *Journal of Neuroscience*, 20(21), 8005-8011.
- Mandir, A. S., Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Wang, Z. Q., Simbulan-Rosenthal, C. M., Smulson, M. E., Hoffman, B. E., Guastella, D. B., Dawson, V. L., Dawson, T. M. (1999). Poly (ADP-ribose) polymerase activation mediates 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), 5774-5779.
- Manske, R. H. F. (Ed). (1960). *The alkaloids: chemistry and physiology*, New York: Elsevier, 393.

- Marin, P., Sajdl, V., Kapor, S., and Tatić, B. (1989). Fatty acid composition of seeds of the Papaveraceae and Fumariaceae. *Phytochemistry*, 28(1), 133-137.
- Martinez, A. and Perez, D. I. (2008). GSK-3 inhibitors: a ray of hope for the treatment of Alzheimer's disease? *Journal of Alzheimer's Disease*, 15(2), 181-191.
- Maruyama, H., Morino, H., Ito, H., Izumi, Y., Kato, H., Watanabe, Kinoshita, Y., Kamada, M., Nodera, H., Suzuki, H., Komure, O., Matsuura, S., Kobatake, K., Morimoto, N., Abe, K., Suzuki, N., Aoki, M., Kawata, A., Hirai, T., Kato, T., Ogasawara, K., Hirano, A., Takumi, T., Kusaka, H., Hagiwara, K., Kaji, R., Kawakami, H. Y. (2010). Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 465(7295), 223.
- McCombe, A. P., and Henderson, D. R. (2011). the role of immune and inflammatory mechanisms in ALS. *Current Molecular Medicine*, 11(3), 246-254.
- McGeer, P. L., and McGeer, E. G. (2002). Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*, 26(4), 459-470.
- McNaull, B. B. A., Todd, S., McGuinness, B., and Passmore, A. P. (2010). Inflammation and anti-inflammatory strategies for Alzheimer's Disease—A mini-review. *Gerontology*, 56(1), 3-14.
- Mehler, M. F. and Gokhan, S. (2000). Mechanisms underlying neural cell death in neurodegenerative diseases: alterations of a developmentally-mediated cellular rheostat. *Trends in Neurosciences*, 23(12), 599-605.
- Mehlhorn, G., Hollborn, M., and Schliebs, R. (2000). Induction of cytokines in glial cells surrounding cortical β -amyloid plaques in transgenic Tg2576 mice with alzheimer pathology. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 18(4-5), 423-431.
- Mehta, M., Adem, A., and Sabbagh, M. (2012). New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimer's disease*, 1, 1-8.
- Mendis, E., Kim, M. M., Rajapakse, N., and Kim, S. K. (2008). Sulfated glucosamine inhibits oxidation of biomolecules in cells via a mechanism involving intracellular free radical scavenging. *European Journal of Pharmacology*, 579(1-3), 74-85.
- Messeha, S. S., Zarmouh, N. O., Mendonca, P., Kolta, M. G., and Soliman, K. F. (2017). The attenuating effects of plumbagin on pro-inflammatory cytokine expression in LPS-activated BV-2 microglial cells. *Journal of neuroimmunology*, 313, 129-137.
- Meydani, M. (2001). Antioxidants and cognitive function. *Nutrition Reviews*, 59(8), 75-82.
- Meyer, S. E. (1986). The ecology of gypsophile endemism in the eastern Mojave Desert. *Ecology*, 67(5), 1303-1313.
- Milatovic, D., Zaja-Milatovic, S., and Gupta, R. C. (2014). Biomarkers of oxidative/nitrosative stress and neurotoxicity., In R. C. Gupta (Ed.), *Biomarkers in Toxicology*. USA:Elsiver, 863-881.

- Mitchell, I. J., Lawson, S., Moser, B., Laidlaw, S. M., Cooper, A. J., Walkinshaw, G., and Waters, C. M. (1994). glutamate-induced apoptosis results in a loss of striatal neurons in the Parkinsonian Rat. *Neuroscience*, 63(1), 1-5.
- Mitchell, P. J., Hanson, J. C., Quets-Nguyen, A. T., Bergeron, M., and Smith, R. C. (2007). A Quantitative Method for Analysis of In Vitro Neurite Outgrowth. *Journal of Neuroscience Methods*, 164(2), 350-362.
- Mochizuki, H. (2007). Gene Therapy for Parkinson's Disease. *Expert Reviews Neurotherapy*, 7(8), 957-960.
- Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Mizuno, Y., Narabayashi, H., Riederer, P., and Nagatsu, T. (1996). The soluble form of fas molecule is elevated in parkinsonian brain tissues. *Neuroscience Letters*, 220(3), 195-198.
- Mogi, M., Harada, M., Riederer, P., Narabayashi, H., Fujita, K., and Nagatsu, T. (1994). Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neuroscience Letters*, 165(1-2), 208-210.
- Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Komure, O., Kuno, S., Ichinose, H., Negatsu, T. (2000). Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. *Journal of Neural Transmission*, 107(3), 335-341.
- Mohandas, E., Rajmohan, V., and Raghunath, B. (2009). Neurobiology of Alzheimer's Disease. *Indian Journal of Psychiatry*, 51(1), 55-61.
- Mollataghi, A., Coudiere, E., Hadi, A. H. A., Mukhtar, M. R., Awang, K., Litaudon, M., and Ata, A. (2012). Anti-acetylcholinesterase, anti- α -glucosidase, anti-leishmanial and anti-fungal activities of chemical constituents of *Beilschmiedia* species. *Fitoterapia*, 83(2), 298-302.
- Molochkina, E. M., Zorina, O. M., Fatkullina, L. D., Goloschapov, A. N., and Burlakova, E. B. (2005). H₂O₂ modifies membrane structure and activity of acetylcholinesterase. *Chemico-biological Interactions*. 157, 401-404.
- Morgan, M. J., Kim, Y. S., and Liu, Z. G. (2008). TNF α and Reactive oxygen species in necrotic cell death. *Cell Research*, 18(3), 343-349.
- Morteza-Semnani, K., Saeedi, M., and Hamidian, M. (2004). Anti-inflammatory and analgesic activity of the topical preparation of *Glaucium grandiflorum*. *Fitoterapia*, 75(2), 123-129.
- Morteza-Semnani, K., Saeedi, M., Hamidian, M., Vafamehr, H., and Dehpour, A. R. (2002). Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Glaucium grandiflorum* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 80(2-3), 181-186.
- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.

- Mu, X., He, J., Anderson, D. W., Springer, J. E., and Trojanowski, J. Q. (1996). Altered expression of Bcl-2 and Bax mRNA in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord motor neurons. *Annals of Neurology*, 40(3), 379-386.
- Mufson, E. J., Counts, S. E., Perez, S. E., and Ginsberg, S. D. (2008). Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 8(11), 1703-1718.
- Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M., and Houghton, P. J. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14(4), 289-300.
- Murayama, S., Mori, H., Ihara, Y., Bouldin, T. W., Suzuki, K., and Tomonaga, M. (1990). Immunocytochemical and ultrastructural studies of lower motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 27(2), 137-148.
- Murray, A. P., Faraoni, M. B., Castro, M. J., Alza, N. P., and Cavallaro, V. (2013). Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's Disease Therapy. *Current Neuropharmacology*, 11(4), 388-413.
- Murugan, R. and Parimelazhagan, T. (2014). Comparative evaluation of different extraction methods for antioxidant and anti-inflammatory properties from *Osbeckia parvifolia* Arn.—An *in vitro* approach. *Journal of King Saud University-Science*, 26(4), 267-275.
- Myers, R. H. (2004). Huntington's disease genetics. *NeuroRx*, 1(2), 255-262.
- Nagatsu, T. and Sawada, M. (2005). Inflammatory Process in Parkinson's Disease: Role for Cytokines. *Current Pharmaceutical Design*, 11(8), 999-1016.
- Nair, V. D., Olanow, W., and Sealfon, S. C. (2003) Activation of phosphoinositide 3-kinase by D2 receptor prevents apoptosis in dopaminergic cell lines. *Biochemical Journal*, 373(1), 25-32.
- Nakamura, T., and Lipton, S. A. (2007). Molecular mechanisms of nitrosative stress-mediated protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(13), 1609-1620.
- Napoli, I., and Neumann, H. (2010). Protective effects of microglia in multiple sclerosis. *Experimental Neurology*, 225(1), 24-28.
- Nedel, F., Conde, M. C. M., Oliveira, I. O. D., Tarquinio, S. B. C., and Demarco, F. F. (2009). Comparison between DNA obtained from Buccal cells of the upper and lower gutter area. *Brazilian Dental Journal*, 20(4), 275-278.
- Neher, J. J., Neniskyte, U., Hornik, T., and Brown, G. C. (2014). Inhibition of UDP/P2Y6 purinergic signaling prevents phagocytosis of viable neurons by activated microglia *in vitro* and *in vivo*. *Glia*, 62(9), 1463-1475.
- Neher, J. J., Neniskyte, U., Zhao, J. W., Bal-Price, A., Tolkovsky, A. M., and Brown, G. C. (2011). Inhibition of microglial phagocytosis is sufficient to prevent inflammatory neuronal death. *The Journal of Immunology*, 186(8), 4973-4983.

- Ngo, T. V., Scarlett, C. J., Bowyer, M. C., Ngo, P. D., and Vuong, Q. V. (2017). Impact of different extraction solvents on bioactive compounds and antioxidant capacity from the root of *Salacia chinensis* L. *Journal of Food Quality*, 1, 1-8.
- Nicholls, D. G., and Budd, S. L. (1998). Mitochondria and neuronal glutamate excitotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1366(1-2), 97-112.
- Nimse, S. B., and Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Rsc Advances*, 5(35), 27986-28006.
- Nizamlıoğlu, N. M. and Nas, S. (2010). Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5(1), 20-35.
- Nizri, E., Hamra-Amitay, Y., Sicsic, C., Lavon, I., and Brenner, T. (2006). Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: a new role for acetylcholinesterase inhibitors. *Neuropharmacology*. 50(5), 540-547.
- Nosseri, C., Coppola, S., and Ghibelli, L. (1994). Possible involvement of poly (ADP-ribose) polymerase in triggering stress-induced apoptosis. *Experimental Cell Research*, 212(2), 367-373.
- Novak, V., Dolejš, L., and Slavik, J. (1972). Alkaloids of the *Papaveraceae*. XLVIII.(-)-Stylopine methohydroxide, a new alkaloid from *Glaucium corniculatum* CURT. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 37(10), 3346-3349
- Oh, Y. T., Lee, J. Y., Lee, J., Lee, J. H., Kim, J. E., Ha, J., and Kang, I. (2010). Oleamide suppresses lipopolysaccharide-induced expression of iNOS and COX-2 through inhibition of NF- κ B activation in BV2 murine microglial cells. *Neuroscience Letters*, 474(3), 148-153.
- Ohsumi, Y. (2014). Historical landmarks of autophagy research. *Cell Research*, 24(1), 9.
- Oka, A., Itoh, M., and Takashima, S. (1999). The early induction of cyclooxygenase 2 associated with neurofibrillary degeneration in brains of patients with fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Neuropediatrics*, 30(01), 34-37.
- Oke-Altuntas, F., Aslim, B., Duman, H., Gulpinar, A. R., and Kartal, M. (2015). The relative contributions of chlorogenic acid and rutin to antioxidant activities of two endemic *P. rangos* (*Umbelliferae*) species (*P. heynia* and *P. denticulata*). *Journal of Food Biochemistry*, 39(4), 409-416.
- O'Lague, P. H., and Huttner, S. L. (1980). Physiological and morphological studies of rat pheochromocytoma cells (PC12) chemically fused and grown in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(3), 1701-1705.
- Olajide, O. A., Bhatia, H. S., de Oliveira, A. C., Wright, C. W., and Fiebich, B. L. (2013). Inhibition of neuroinflammation in LPS-activated microglia by cryptolepine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1, 1-10.
- Oldfors, A. and Tulinus, M. (2007). Mitochondrial encephalomyopathies. In F. Mastaglia and D. Hilton –Jones (Eds.), *Handbook of clinical Neurology*. Elseiver, 125-165.

- Onda, M. and Takahashi, H. (1989). Protopine alkaloids. In A. Brossi (Ed.), *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*. First Edition. New York: Academic Press, 25, 181-209.
- Orhan, I., Sener, B., Choudhary, M. I., and Khalid, A. (2004). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(1), 57-60.
- Orlowska, A., Perera, P. T., Al Kobaisi, M., Dias, A., Nguyen, H. K. D., Ghanaati, S., BAulin, V., Crawford, R. J., and Ivanova, E. P. (2017). The effect of coatings and nerve growth factor on attachment and differentiation of pheochromocytoma cells. *Materials*, 11(1), 60.
- Othman, S. B. and Yabe, T. (2015). Use of hydrogen peroxide and peroxy radicals to induce oxidative stress in neuronal cells. *Reviews in Agricultural Science*, 3, 40-45.
- Pallast, S., Arai, K., Pekcec, A., Yigitkanli, K., Yu, Z., Wang, X., Lo, E. H., and Van Leyen, K. (2010). Increased nuclear apoptosis-inducing factor after transient focal ischemia: a 12/15-lipoxygenase-dependent organelle damage pathway. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 30(6), 1157-1167.
- Parhiz, H., Roohbakhsh, A., Soltani, F., Rezaee, R., and Iranshahi, M. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytotherapy Research*, 29(3), 323-331.
- Park, E. H. and Eun, C. (1989). Effect of papaverine on acetylcholinesterase in rat brain. *Archives of Pharmacal Research*, 12(1), 34-38.
- Park, S. E., Jeong, S. H., Yee, S. B., Kim, T. H., Soung, Y. H., Ha, N. C., Kim, N. D., Park, J., Bae, H. R., Park, B. S., Lee, H. J., and Yoo, Y. H. (2008). Interactions of acetylcholinesterase with caveolin-1 and subsequently with cytochrome c are required for apoptosome formation. *Carcinogenesis*, 29(4), 729-737.
- Park, S. E., Sapkota, K., Kim, S., Kim, H., and Kim, S. J. (2011). Kaempferol acts through mitogen-activated protein kinases and protein kinase B/AKT to elicit protection in a model of neuroinflammation in BV-2 microglial cells. *British Journal of Pharmacology*, 164(3), 1008-1025.
- Parkinson Study Group. (2004). Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *New England Journal of Medicine*, 351(24), 2498-2508.
- Patil, S. P., Jain, P. D., Sancheti, J. S., Ghumatkar, P. J., Tambe, R., and Sathaye, S. (2014). Neuroprotective and neurotrophic effects of apigenin and luteolin in MPTP induced parkinsonism in mice. *Neuropharmacology*, 86, 192-202.
- Paulus, G. L. and Xavier, R. J. (2015). Autophagy and checkpoints for intracellular pathogen defense. *Current Opinion in Gastroenterology*, 31(1), 14-23.
- Pearl, P. L. (2018). GABA: no longer the faithful neurotransmitter. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 60, 732-740.

- Pera, M., Camps, P., Muñoz-Torrero, D., Perez, B., Badia, A., and Guillen, M. V. C. (2013). Undifferentiated and differentiated PC12 cells protected by huprines against injury induced by hydrogen peroxide. *PLoS One*, 8(9), e74344.
- Petrova, T. V., Akama, K. T., and Van Eldik, L. J. (1999). Selective modulation of BV-2 microglial activation by prostaglandin E2 differential effects on endotoxin-stimulated cytokine induction. *Journal of Biological Chemistry*, 274(40), 28823-28827.
- Pfaffl, M. W., and Hageleit, M. (2001). Validities of mRNA quantification using recombinant rna and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters*, 23(4), 275-282.
- Phillipson, J. D., Gray, A. I., Askari, A. A., and Khalil, A. A. (1981). Alkaloids from Iraqi species of *Papaveraceae*. *Journal of Natural Products*, 44(3), 296-307.
- Piemontese, L. (2017). New approaches for prevention and treatment of Alzheimer's disease: a fascinating challenge. *Neural Regeneration Research*, 12(3), 405-406.
- Pihán, P., Carreras-Sureda, A., and Hetz, C. (2017). BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise. *Cell Death and Differentiation*, 24(9), 1478-1487.
- Pillay, R., Maharaj, D. S., Daniel, S., and Daya, S. (2003). Acetylcholine reduces cyanide-induced superoxide anion generation and lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27(1), 61-64.
- Platz, E. A., Yegnasubramanian, S., Liu, J. O., Chong, C. R., Shim, J. S., Kenfield, S. A., Stampfer, M. J., Willett, W. C., Giovannucci, E., Nelson, W. G. (2011). A novel two-stage, transdisciplinary study identifies digoxin as a possible drug for prostate cancer treatment. *Cancer Discovery*, 1(1), 68-77.
- Post, S. G. (1999). Future scenarios for the prevention and delay of alzheimer disease onset in high-risk groups: An ethical perspective. *American Journal of Preventive Medicine*, 16(2), 105-110.
- Preininger, V. (1985). Chemotaxonomy of the *Papaveraceae* alkaloids. In J. D. Phillipson, M. F. Roberts, M. H. Zenk (Eds.), *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 23-37.
- Price, J. L., Ko, A. I., Wade, M. J., Tsou, S. K., McKeel, D. W., and Morris, J. C. (2001). Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer Disease. *Archives of Neurology*, 58(9), 1395-1402.
- Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G. C., Wu, Y., and Prina, A. M. (2015). The global impact of dementia. An analysis of prevalence, incidence, costs and trends. Alzheimer's Disease International, World Alzheimer Report 2015, London, 1-87.
- Prokop, S., Miller, K. R., and Heppner, F. L. (2013). Microglia actions in Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathologica*, 126(4), 461-477.

- Prusiner, S. B. (2001). Neurodegenerative diseases and prions. *New England Journal of Medicine*, 344(20), 1516-1526.
- Przedborski, S. and Ischiropoulos, H. (2005). Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, 7(5-6), 685-693.
- Pu, F., Mishima, K., Irie, K., Motohashi, K., Tanaka, Y., Orito, K., Egawa, T., Kitamura, Y., Egashira, N., Iwasaki, K., and Fujiwara, M. (2007). Neuroprotective effects of quercetin and rutin on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, 104(4), 329-334.
- Quintanilla, R. A., Orellana, D. I., González-Billault, C., and Maccioni, R. B. (2004). Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Experimental Cell Research*, 295(1), 245-257.
- Rabizadeh, S., Gralla, E. B., Borchelt, D. R., Gwinn, R., Valentine, J. S., Sisodia, S., Wong, M., Lee, H., and Bredesen, D. E. (1995). Mutations associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis convert superoxide dismutase from an antiapoptotic gene to a proapoptotic gene: Studies in yeast and neural cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(7), 3024-3028.
- Rahman, M. M., Ichiyanagi, T., Komiyama, T., Sato, S., and Konishi, T. (2008). Effects of anthocyanins on psychological stress-induced oxidative stress and neurotransmitter status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7545-7550.
- Ralston, A. W., and Hoerr, C. W. (1942). The solubilities of the normal saturated fatty acids. *The Journal of Organic Chemistry*, 7(6), 546-555.
- Ramírez-Jarquín, U. N., and Tapia, R. (2017). Chronic GABAergic blockade in the spinal cord *in vivo* induces motor alterations and neurodegeneration. *Neuropharmacology*, 117, 85-92.
- Rascol, O., Goetz, C., Koller, W., Poewe, W., and Sampaio, C. (2002). Treatment interventions for Parkinson's disease: an evidence based assessment. *The Lancet*, 359(9317), 1589-1598.
- Recio, M. C., Andujar, I. L., and Rios, J. (2012). Anti-inflammatory agents from plants: progress and potential. *Current Medicinal Chemistry*, 19(14), 2088-2103.
- Reed, J. C. (2000). Mechanisms of apoptosis. *The American Journal of Pathology*. 157(5), 1415-1430.
- Reeve, A., Simcox, E., and Turnbull, D. (2014). Ageing and Parkinson's disease: Why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing Research Reviews*, 14, 19-30.
- Reitz, C., Brayne, C., and Mayeux, R. (2011). Epidemiology of Alzheimer Disease. *Nature Reviews Neurology*, 7(3), 137-152.

- Remichkova, M., Dimitrova, P., Philipov, S., and Ivanovska, N. (2009). Toll-like receptor-mediated anti-inflammatory action of glaucine and oxoglucine. *Fitoterapia*, 80(7), 411-414.
- Rendeiro, C., Vauzour, D., Rattray, M., Waffo-Tégou, P., Mérillon, J. M., Butler, L. T., Williams, C. M., and Spencer, J. P. (2013). Dietary levels of pure flavonoids improve spatial memory performance and increase hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *PloS One*, 8(5), e63535.
- Rieger, F., Shelanski, M. L., and Greene, L. A. (1980). The effects of nerve growth factor on acetylcholinesterase and its multiple forms in cultures of rat PC12 pheochromocytoma cells: Increased total specific activity and appearance of the 16 S molecular form. *Developmental Biology*, 76(1), 238-243.
- Rock, R. B., Gekker, G., Hu, S., Sheng, W. S., Cheeran, M., Lokensgard, J. R., and Peterson, P. K. (2004). Role of microglia in central nervous system infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 942-964.
- Rogers, J., Webster, S., Lue, L. F., Brachova, L., Civin, W. H., Emmerling, M., Shivers, B., Walker, D., and McGeer, P. (1996). Inflammation and Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiology of Aging*, 17(5), 681-686.
- Rohn, T. T., Head, E., Nesse, W. H., Cotman, C. W., and Cribbs, D. H. (2001). Activation of caspase-8 in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiology of Disease*, 8(6), 1006-1016.
- Rohn, T. T., Rissman, R. A., Davis, M. C., Kim, Y. E., Cotman, C. W., and Head, E. (2002). Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiology of Disease*, 11(2), 341-354.
- Rohn, T. T., Vyas, V., Hernandez-Estrada, T., Nichol, K. E., Christie, L. A., and Head, E. (2008). Lack of pathology in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease after overexpression of the anti-apoptotic protein Bcl-2. *Journal of Neuroscience*, 28(12), 3051-3059.
- Roos, W. P., Thomas, A. D., and Kaina, B. (2016). DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nature Reviews Cancer*, 16(1), 20-33.
- Rosa, M. M., Ferreira, J. J., Coelho, M., Freire, R., and Sampaio, C. (2010). Prescribing patterns of antiparkinsonian agents in Europe. *Movement Disorders*, 25(8), 1053-1060.
- Rosenberry, T. L. (1975). Acetylcholinesterase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 43, 103-218.
- Rowland, J. P., Rigby, J., Harper, A. C., and Rowland, R. (2007). Cardiovascular monitoring with acetylcholinesterase inhibitors: A clinical protocol. *Advances in Psychiatric Treatment*, 13(3), 178-184.
- Rutledge, R. B., Lazzaro, S. C., Lau, B., Myers, C. E., Gluck, M. A., and Glimcher, P. W. (2009). Dopaminergic drugs modulate learning rates and perseveration in Parkinson's patients in a dynamic foraging task. *Journal of Neuroscience*, 29(48), 15104-15114.

- Sabogal-Guáqueta, A. M., Munoz-Manco, J. I., Ramírez-Pineda, J. R., Lamprea-Rodriguez, M., Osorio, E., and Cardona-Gómez, G. P. (2015). The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. *Neuropharmacology*, 93, 134-145.
- Saez, T. E., Pehar, M., Vargas, M., Barbeito, L., and Maccioni, R. B. (2004). Astrocytic nitric oxide triggers tau hyperphosphorylation in hippocampal Neurons. *In Vivo*, 18(3), 275-280.
- Said, A. M., Hung, W. Y., Zu, J. S., Hockberger, P., and Siddique, T. (2000). Increased reactive oxygen species in familial amyotrophic lateral sclerosis with mutations in SOD1. *Journal of The Neurological Sciences*, 176(2), 88-94.
- Saleh, N. A., Maksoud, S. A., El-hadidi, M. N., and Amer, W. M. (1987). A comparative study of flavonoids in some members of the Papaveraceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 15(6), 673-675.
- Salih, S. A., and Kim, H. R. (2014). Anti-inflammatory effect of an ethanolic extract of *Myagropsis yendoi* in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglia cells. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 17(1), 27-35.
- Sanchez, I., Xu, C. J., Juo, P., Kakizaka, A., Blenis, J., and Yuan, J. (1999). Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron*, 22(3), 623-633.
- Sansanwal, P., Li, L., and Sarwal, M. M. (2015). Inhibition of intracellular clusterin attenuates cell death in nephropathic cystinosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(3), 612-625.
- Santos, J. H., Hunakova, L., Chen, Y., Bortner, C., and Van Houten, B. (2002). Cell-sorting experiments link persistent mitochondrial DNA damage with loss of mitochondrial membrane potential and apoptotic cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 278(3), 1728-1734.
- Sargsyan, S. A., Monk, P. N., and Shaw, P. J. (2005). Microglia as potential contributors to motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia*, 51(4), 241-253.
- Sastre, M., Dewachter, I., Landreth, G. E., Willson, T. M., Klockgether, T., Van Leuven, F., and Heneka, M. T. (2003). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of β -secretase. *Journal of Neuroscience*, 23(30), 9796-9804.
- Sawada, M. (1999). Brain cytokine network and novel characteristics of microglia. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi= Japanese Journal of Ppsychopharmacology*, 19(4), 151-154.
- Saxena, A., Doctor, B. P., Qian, N., Kovach, I. M., Kozikowski, A. P., Pang, Y. P., Vellom, D. C., Radic, Z., Quinn, D., and Taylor, P. (1994). Identification of amino acid residues involved in the binding of Huperzine A to cholinesterases. *Protein Science*, 3(10), 1770-1778.

- Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008). Analyzing Real-time PCR Data by the Comparative C T Method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101-1108.
- Schroeter, H., Spencer, J. P., Catherine, R. E., and Williams, R. J. (2001). Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochemical Journal*, 358(3), 547-557.
- Schroeter, H., Williams, R. J., Matin, R., Iversen, L., and Rice-Evans, C. A. (2000). Phenolic antioxidants attenuate neuronal cell death following uptake of oxidized low-density lipoprotein. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(12), 1222-1233.
- Schumacher, M., Camp, S., Maulet, Y., Newton, M., MacPhee-Quigley, K., Taylor, S. S., Friedmann, T., and Taylor, P. (1986). Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from Its cDNA sequence. *Nature*, 319(6052), 407-409.
- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. 473(7347), 337–342.
- Schwartz, P. J., Blundon, J. A., and Adler, E. M. (2007). A biochemical assay for acetylcholinesterase activity in PC12 cells. *Science Signaling*, 2007(394), 1-8.
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. *Physiol Rev.* 81(2), 741–766.
- Serrano-Puebla, A., and Boya, P. (2016). Lysosomal membrane permeabilization in cell death: New evidence and implications for health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1371(1), 30-44.
- Shafiee, A., Ghanbarpour, A., and Aknlaghi, S. (1985). Alkaloids of *Papaveraceae*, XII. Alkaloids of *Glaucium corniculatum* subspecies *Reflactum*, population *pol-dokhtar*. *Journal of Natural Product*. 48(5), 855-856.
- Shah, R. S., Lee, H. G., Xiongwei, Z., Perry, G., Smith, M. A., and Castellani, R. J. (2008). Current approaches in the treatment of Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62(4), 199-207.
- Shang, X., Wang, D., Miao, X., Wang, Y., Zhang, J., Wang, X., Zhang, Y., and Pan, H. (2015). Antinociceptive and anti-tussive activities of the ethanol extract of the flowers of *Meconopsis punicea maxim*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 154.
- Shanmughapriya, S., Rajan, S., Hoffman, N. E., Higgins, A. M., Tomar, D., Nemani, N., Hines, K. J., Smith, D. J., Eguchi, A., Vallem, S., Shaikh, F., Cheung, M., Leonard, N. J., Stolakis, R. S., Wolfers, M. P., Ibeti, J., Chuprun, J. K., Jog, N. R., Houser, S. R., Koch, W. J., Elrod, J. W., Madesh, M. (2015). SPG7 is an essential and conserved component of the mitochondrial permeability transition pore. *Molecular Cell*, 60(1), 47-62.
- Sheikh, S., Haque, E., and Mir, S. S. (2013). Neurodegenerative diseases: multifactorial conformational diseases and their therapeutic interventions. *Journal of Neurodegenerative Diseases*, 1,1-8.

- Shen, Z. X. (2004). Brain cholinesterases: II. The molecular and cellular basis of Alzheimer's disease. *Medical Hypotheses*, 63(2), 308-321.
- Sherwin, B. B. (2000). Mild cognitive impairment: Potential pharmacological treatment options. *Journal of the American Geriatrics Society*, 48(4), 431-441.
- Shin, W. H., Park, S. J., and Kim, E. J. (2006). Protective effect of anthocyanins in middle cerebral artery occlusion and reperfusion model of cerebral ischemia in rats. *Life Sciences*, 79(2), 130-137.
- Sierra-Fonseca, J. A., Najera, O., Martinez-Jurado, J., Walker, E. M., Varela-Ramirez, A., Khan, A. M., Miranda, M., Lamango, N. S., and Roychowdhury, S. (2014). Nerve growth factor induces neurite outgrowth of PC12 cells by promoting G β -microtubule interaction. *BMC Neuroscience*, 15(1), 132.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Slater, A. F., Stefan, C., Nobel, I., and Orrenius, S. (1995). The Role of intracellular Oxidants in apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1271(1), 59-62.
- Sloley, B. D., Urichuk, L. J., Morley, P., Durkin, J., Shan, J. J., Pang, P. K. T., and Coutts, R. T. (2000). Identification of kaempferol as a monoamine oxidase inhibitor and potential neuroprotectant in extracts of *Ginkgo biloba* leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52(4), 451-459.
- Snitsarev, V., Andrej, A., and Rotella, D. P. (2013). Neuroprotective effects of EGCG on H₂O₂-and MPTP-stressed PC12 cells. *The FASEB Journal*, 27(1), 691-718.
- Sohanaki, H., Baluchnejadmojarad, T., Nikbakht, F., and Roghani, M. (2016). Pelargonidin improves passive avoidance task performance in a rat amyloid beta₂₅₋₃₅ model of Alzheimer's disease via estrogen receptor independent pathways. *Acta Medica Iranica*, 54(4), 245-250.
- Somers, S. M. and Johannot, L. (2008). Dietary flavonoid sources in Australian adults. *Nutrition and Cancer*, 60(4), 442-449.
- Sonee, M., Sum, T., Wang, C., and Mukherjee, S. K. (2004). The soy isoflavone, genistein, protects human cortical neuronal cells from oxidative stress. *Neurotoxicology*, 25(5), 885-891.
- Sonsalla, P. K. (1997). Drugs used in neurodegenerative disorders. In R. C. Charles and R. E. Stitzel (Eds.), *Modern Pharmacology With Clinical Applications*. Amsterdam: Elsevier, 364-373.
- Sourabie, T. S., Nikiema, J. B., and Nacoulma, O. G. (2014). Monographical survey of pharmacological potentials of *Argemone mexicana* L.(*Papaveraceae*), a plant of Burkina Faso Pharmacopeia: determination of antihepatotoxic and antipyretic activities. *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences*, 1, 1-10.

- Sourabie, T. S., Ouedraogo, N., Sawadogo, W. R., Nikema, J. B., Guissou, I. P., and Nacoulma, O. G. (2012). Biological evaluation of anti-inflammatory and analgesic activities of *Argemone mexicana* Linn.(*Papaveraceae*) aqueous leaf extract. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(9), 451-458.
- Soureshjan, E. H., and Heidari, M. (2014). *In vitro* variation in antibacterial activity plant extracts on *Glaucium elegans* and saffron (*Crocus sativus*). *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 9(3), 275-278.
- Spencer, J. P. (2008). Food for thought: the role of dietary flavonoids in enhancing human memory, learning and neuro-cognitive performance: Symposium on 'Diet and mental health'. *Proceedings of the Nutrition Society*, 67(2), 238-252.
- Spencer, J. P., Vafeiadou, K., Williams, R. J., and Vauzour, D. (2012). Neuroinflammation: modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Molecular Aspects of Medicine*, 33(1), 83-97.
- Sriram, K., Matheson, J. M., Benkovic, S. A., Miller, D. B., Luster, M. I., and O'Callaghan, J. P. (2002). Mice Deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: Implications for Parkinson's disease. *The FASEB Journal*, 16(11), 1474-1476.
- Sriram, K., Matheson, J. M., Benkovic, S. A., Miller, D. B., Luster, M. I., and O'Callaghan, J. P. (2006). Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: Role of TNF- α . *The FASEB Journal*, 20(6), 670-682.
- Sriwiriyan, S., Ninpesh, T., Sukpondma, Y., Nasomyon, T., and Graidist, P. (2014). Cytotoxicity screening of plants of genus piper in breast cancer cell lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(6), 921-928.
- Stadelmann, C., Deckwerth, T. L., Srinivasan, A., Bancher, C., Brück, W., Jellinger, K., and Lassmann, H. (1999). Activation of caspase-3 in single neurons and autophagic granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease: Evidence for apoptotic cell death. *The American journal of Pathology*, 155(5), 1459-1466.
- Stone, D. K., Reynolds, A. D., Mosley, R. L., and Gendelman, H. E. (2009). Innate and adaptive immunity for the pathobiology of Parkinson's disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11(9), 2151-2166.
- Suganuma, M., Okabe, S., Oniyama, M., Tada, Y., Ito, H., and Fujiki, H. (1998). Wide distribution of [3H](-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue. *Carcinogenesis*, 19(10), 1771-1776.
- Sureda, F. X., Junyent, F., Verdaguer, E., Auladell, C., Pelegri, C., Vilaplana, J., Folch, J., Maria Canudas, A., Beas Zarate, C., Pallas, M., and Camins, A. (2011). Antiapoptotic drugs: a therapeutic strategy for the prevention of neurodegenerative diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 17(3), 230-245.
- Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., and Silman, I. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253(5022), 872-879.

- Suzuki, J., Fujii, T., Imao, T., Ishihara, K., Kuba, H., and Nagata, S. (2013). Calcium-dependent phospholipid scramblase activity of TMEM16 family members. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 13305–13316.
- Syad, A. N. and Devi, K. P. (2014). Botanicals: A Potential Source of New Therapies for Alzheimer's Disease. *Evolution*, 4, 11-26.
- Şahin, H. A. (2002). Asetilkolin, kolinesterazlar ve alzheimer hastalığı. *Demans Dergisi*, 2, 69-73.
- Şener, B. and Orhan, I. (2005). Discovery of drug candidates from some Turkish plants and conservation of biodiversity. *Pure and Applied Chemistry*, 77(1), 53-64.
- Tabet, N. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: Anti-inflammatories in acetylcholine clothing! *Age and Ageing*, 35(4), 336-338.
- Takeuchi, H., Jin, S., Wang, J., Zhang, G., Kawanokuchi, J., Kuno, R., Sonobe, Y., Mizuno, T., and Suzumura, A. (2006). Tumor necrosis factor- α induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *Journal of Biological Chemistry*, 281(30), 21362-21368.
- Tan, M. S., Tan, L., Jiang, T., Zhu, X. C., Wang, H. F., Jia, C. D., and Yu, J. T. (2014). Amyloid- β induces NLRP1-dependent neuronal pyroptosis in models of Alzheimer's disease. *Cell Death and Disease*, 5(8), 1-12.
- Tang, L. L., Wang, R., and Tang, X. C. (2005). Effects of huperzine A on secretion of nerve growth factor in cultured rat cortical astrocytes and neurite outgrowth in rat PC12 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26(6), 673.
- Tang, X. C. and Han, Y. F. (1999). Pharmacological profile of huperzine A, a novel acetylcholinesterase inhibitor from Chinese herb. *CNS Drug Reviews*, 5(3), 281-300.
- Tang, X. C., He, X. C., and Bai, D. L. (1999). Huperzine A: a novel acetylcholinesterase inhibitor. *Drugs of the Future*, 24(6), 647-664.
- Tao, F. Z., Shuangrong, C., and Lina, Q. (2015). Reactive oxygen species mediate abnormal tau phosphorylation in a zinc-induced model. *Journal of Neurological Sciences (Turkish)*, 32(1), 115-121.
- Tarozzi, A., Morroni, F., Hrelia, S., Angeloni, C., Marchesi, A., Cantelli-Forti, G., and Hrelia, P. (2007). Neuroprotective effects of anthocyanins and their in vivo metabolites in SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters*, 424(1), 36-40.
- Taşkıran, G. (2010). *Aspidosperma alkaloitlerinin temel iskeletinin sentezi için gerekli ara ürünlerin sentezi*, Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 3.
- Tatton, N. A. (2000). Increased caspase 3 and bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 166(1), 29-43.

- Tatton, N. A., and Kish, S. J. (1997). *In situ* detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-Methyl-4-Phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-treated mice Using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. *Neuroscience*, 77(4), 1037-1048.
- Tatton, N. A., Maclean-Fraser, A., Tatton, W. G., Perl, D. P., and Warren, C. O. (1998). A fluorescent double-labeling method to detect and confirm apoptotic nuclei in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 44(1), 42-48.
- Tatton, W. G., and Olanow, C. W. (1999). Apoptosis in neurodegenerative diseases: the role of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1410(2), 195-213.
- Taylor, P. (1991). The cholinesterases. *J Biol Chem*, 266(7), 4025-4028.
- Tedeschi, A., Nguyen, T., Steele, S. U., Feil, S., Naumann, U., Feil, R., and Di Giovanni, S. (2009). The tumor suppressor p53 transcriptionally regulates cGKI expression during neuronal maturation and is required for cGMP-dependent growth cone collapse. *Journal of Neuroscience*, 29(48), 15155-15160.
- Teismann, P., and Ferger, B. (2001). Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Synapse*, 39(2), 167-174.
- Thacker, P. D. (2003). Surprising discovery with Alzheimer's medication. *Drug Discovery Today*, 8(9), 379-380.
- Thomas, B., and Beal, M. F. (2007). Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics*, 16(2), 183-194.
- Thummayot, S., Tocharus, C., Suksamrarn, A., and Tocharus, J. (2016). Neuroprotective effects of cyanidin against A β -induced oxidative and ER stress in SK-N-SH cells. *Neurochemistry International*, 101, 15-21.
- Tochigi, M., Inoue, T., Suzuki-Karasaki, M., Ochiai, T., Ra, C., and Suzuki-Karasaki, Y. (2013). Hydrogen peroxide induces cell death in human TRAIL-resistant melanoma through intracellular superoxide generation. *International Journal of Oncology*, 42(3), 863-872.
- Toiber, D., Berson, A., Greenberg, D., Melamed-Book, N., Diamant, S., and Soreq, H. (2008). N-acetylcholinesterase-induced apoptosis in Alzheimer's disease. *PLoS One*, 3(9), 1-12.
- Tompkins, M. M., Basgall, E. J., Zamrini, E., and Hill, W. D. (1997). Apoptotic-like changes in Lewy-body-associated disorders and normal aging in substantia nigral neurons. *The American Journal of Pathology*, 150(1), 119-131.
- Trieu, V. N. and Uckun, F. M. (1999). Genistein is neuroprotective in murine models of familial amyotrophic lateral sclerosis and stroke. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 258(3), 685-688.

- Tuppo, E. E., and Arias, H. R. (2005). The role of inflammation in Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(2), 289-305.
- Tusi, S. K., Abraki, S. B., Amini, M., and Khodagholi, F. (2012). Modulation of H₂O₂-induced neurite outgrowth impairment and apoptosis in PC12 cells by a 1, 2, 4-triazine derivative. *Basic and Clinical Neuroscience*, 3(5), 49-60.
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., and Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7(1), 65-74.
- Ülger, Z., Yavuz, B. B., Halil, M., Cankurtaran, M., and Arioğul, S. (2009). Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan ilaçlar. *Akademik Geriatri Dergisi*, 1(1), 3-12.
- Valencia, A., Sapp, E., Kimm, J. S., McClory, H., Reeves, P. B., Alexander, J., Ansong, K. A., Masso, N., Frosch, M.P., Kegel, K. B., and Li, X. (2012). Elevated NADPH oxidase activity contributes to oxidative stress and cell death in Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, 22(6), 1112-1131.
- Van der Schyf, C. J. (2011). The use of multi-target drugs in the treatment of neurodegenerative diseases. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 4(3), 293-298.
- Van Houten, B., Woshner, V., and Santos, J. H. (2006). Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair*, 5(2), 145-152.
- Van Praag, H., Lucero, M. J., Yeo, G. W., Stecker, K., Heivand, N., Zhao, C., Yip, E., Afanador, M., Schroeter, H., Hammerstone, J., and Gage, F. H. (2007). Plant-derived flavanol (–) epicatechin enhances angiogenesis and retention of spatial memory in mice. *Journal of Neuroscience*, 27(22), 5869-5878.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of Real-time Quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), 1-12.
- Vauzour, D. (2017). Polyphenols and brain health. *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 24(2), 1-7.
- Venkatesan, R., Ji, E., and Kim, S. Y. (2015). Phytochemicals that regulate neurodegenerative disease by targeting neurotrophins: a comprehensive review. *BioMed Research International*, 1, 1-22.
- Verpoorte, R. (1998). Antimicrobially active alkaloids in alkaloids: biochemistry, ecology and medicinal applications. In M. F. Robert and M. Wink (Eds.), *Alkaloids*. Springer publication, 397-426.
- Vinayagam, M. M. Sadiq, A.M. (2015). Flavonoid naringin inhibits microglial activation and exerts neuroprotection against deltamethrin induced neurotoxicity through Nrf2/ARE signaling in the cortex and hippocampus of rats. *World Journal of Pharmaceutical Science*, 3, 2410-2426.

- Vis, J. C., Schipper, E., de Boer-van Huizen, R. T., Verbeek, M. M., de Waal, R. M., Wesseling, P., ten Donkelaar, H. J., and Kremer, B. (2005). Expression pattern of apoptosis-related markers in Huntington's disease. *Acta Neuropathologica*, 109(3), 321-328.
- Viswanath, V., Wu, Y., Boonplueang, R., Chen, S., Stevenson, F. F., Yantiri, F., Yang, L., Beal, M. F., and Andersen, J. K. (2001). Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, 21(24), 9519-9528.
- Vitale, I., Manic, G., De Maria, R., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2017). DNA damage in stem cells. *Molecular Cell*, 66(3), 306-319.
- Vonsattel, J. P., Myers, R. H., Stevens, T. J., Ferrante, R. J., Bird, E. D., and Richardson, E. P. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 44(6), 559-577.
- Waldron, R. T., and Rozengurt, E. (2000). Oxidative stress induces protein kinase D activation in intact cells involvement of Src and dependence on protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 17114-17121.
- Walker D, McGeer E and McGeer P. (1997). Involvement of inflammation and complement in Alzheimer's disease. In: J. Antel, G. Birnbaum and H. Härtung (Eds.), *Clinical Neuroimmunology*. Oxford, UK: Blackwell Scientific, 172–188.
- Wang, H., Yu, S. W., Koh, D. W., Lew, J., Coombs, C., Bowers, W., Federoff, H. J., Poirer, G. G., Dawson, T. M., and Dawson, V. L. (2004). Apoptosis-inducing factor substitutes for caspase executioners in NMDA-triggered excitotoxic neuronal death. *Journal of Neuroscience*, 24(48), 10963-10973.
- Wang, Q., Zhang, X., Chen, S., Zhang, X., Zhang, S., Youdium, M., and Le, W. (2011). Prevention of motor neuron degeneration by novel iron chelators in SOD1G93A transgenic mice of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegenerative Diseases*, 8(5), 310-321.
- Wang, X., Chen, S., Ma, G., Ye, M., and Lu, G. (2005). Genistein protects dopaminergic neurons by inhibiting microglial activation. *Neuroreport*, 16(3), 267-270.
- Wang, X., Wu, J., Yu, C., Tang, Y., Liu, J., Chen, H., Jin, B., Mei, Q., Cao, S., and Qin, D. (2017). Lychee seed saponins improve cognitive function and prevent neuronal injury via inhibiting neuronal apoptosis in a rat model of Alzheimer's disease. *Nutrients*, 9(2), 105.
- Wang, Y., Pan, W. L., Liang, W. C., Law, W. K., Tsz-Ming Ip, D., Ng, T. B., Miu-Yee Waye, M. and Chi-Cheong Wan, D. (2013). Acetylshikonin, a novel AChE inhibitor, inhibits apoptosis via upregulation of heme oxygenase-1 expression in SH-SY5Y cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(1), 1-11.
- Wellington, C. L., Ellerby, L. M., Gutekunst, C. A., Rogers, D., Warby, S., Graham, R. K., Loubser, O., van Raamsdonk, J., Singaraja, R., Yang, Y. Z., Gafni, J., Bredesen, D., Hersch, S. M., Leavitt, B. R., Roy, S., Nicholson, D. W., and Hayden, M. R. (2002).

- Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease. *Journal of Neuroscience*, 22(18), 7862-7872.
- Wellington, C. L., Singaraja, R., Ellerby, L., Savill, J., Roy, S., Leavitt, B., Cattaneo, E., Hackam, A., Sharp, A., Thornberry, N., Nicholson, D. W., Bredesen, D. E. and Hayden, M. R. (2000). Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(26), 19831-19838.
- Wesołowska, A., Grzeszczuk, M., Wilas, J., and Kulpa, D. (2016). Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of indole alkaloids isolated from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cultivated conventionally and derived from *in vitro* cultures. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 44(1), 100-106.
- West, M. J., Coleman, P. D., Flood, D. G., and Troncoso, J. C. (1994). Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *The Lancet*, 344(8925), 769-772.
- Willcox, J. K., Ash, S. L., and Catignani, G. L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 275-295.
- Williams, D. B., and Windebank, A. J. (1991). Motor neuron disease (Amyotrophic Lateral Sclerosis). In *Mayo Clinic Proceedings*, 66(1), 54-82.
- Williams, R. J., Spencer, J. P., and Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*, 36(7), 838-849.
- Willis, S. N, Fletcher, J. I., Kaufmann, T., van Delft M. F., Chen, L., Czabotar, P. E., Ierino, H., Lee, E. F., Fairlie, W. D, Bouillet, P., Strasser, A., Kluck, R. M., Adams, J. M., Huang, D. C. (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science*, 315, 856-859.
- Winner, B., Kohl, Z., and Gage, F. H. (2011). Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 33(6), 1139-1151.
- Wolfender, J. L., Rudaz, S., Hae Choi, Y., and Kyong Kim, H. (2013). Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. *Current Medicinal Chemistry*, 20(8), 1056-1090.
- Wollen, K. A. (2010). Alzheimer's Disease: The pros and cons of pharmaceutical, nutritional, botanical, and stimulatory therapies, with a discussion of treatment strategies from the perspective of patients and practitioners. *Alternative Medicine Review*, 15(3), 223-44.
- Wolozin, B., Iwasaki, K., Vito, P., Ganjei, J. K., Lacanà, E., Sunderland, T., Zhao, B., Kusiak, J. W., Wasco, W., and D'adamio, L. (1996). Participation of Presenilin 2 in apoptosis: Enhanced Basal Activity Conferred by an Alzheimer Mutation. *Science*, 274(5293), 1710-1713.
- Wong, M. L. and Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-88.

- World Health Organization. (2006). *Neurological disorders: public health challenges*. Switzerland: World Health Organization, 194.
- Wu, D. C., Ré, D. B., Nagai, M., Ischiropoulos, H., and Przedborski, S. (2006). The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(32), 12132-12137.
- Wu, F. J., Xue, Y., Liu, X. F., Xue, C. H., Wang, J. F., Du, L., Takahashi, K., and Wang, Y. M. (2014). The protective effect of eicosapentaenoic acid-enriched phospholipids from sea cucumber *Cucumaria frondosa* on oxidative stress in PC12 cells and SAMP8 mice. *Neurochemistry International*, 64, 9-17.
- Wu, Y., Shang, Y., Sun, S., Liang, H., and Liu, R. (2007). Erythropoietin prevents PC12 cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis via the Akt/GSK-3 β /caspase-3 mediated signaling pathway. *Apoptosis*, 12(8), 1365-1375.
- Xie, J., Jiang, H., Wan, Y. H., Du, A. Y., Guo, K. J., Liu, T., Ye, W. Y., Niu, X., Wu, J., Dong, X. Q., and Zhang, X. J. (2011). Induction of a 55 kDa acetylcholinesterase protein during apoptosis and its negative regulation by the Akt pathway. *Journal of Molecular Cell Biology*, 3(4), 250-259.
- Xu, H., Li, H., Qu, Y., Zheng, J., and Lu, J. (2014). High mobility group Box 1 release from cholangiocytes in patients with acute-on-chronic liver failure. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 8(4), 1178-1184.
- Xu, J., Ji, L. D., and Xu, L. H. (2006). Lead-induced apoptosis in PC12 cells: involvement of p53, Bcl-2 family and caspase-3. *Toxicology Letters*, 166(2), 160-167.
- Xu, W., Tan, L., and Yu, J. T. (2015). The role of PICALM in Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, 52(1), 399-413.
- Xu, X., Chua, C. C., Kong, J., Kostrzewa, R. M., Kumaraguru, U., Hamdy, R. C., and Chua, B. H. (2007). Necrostatin-1 protects against glutamate-induced glutathione depletion and caspase-independent cell death in HT-22 cells. *Journal of Neurochemistry*, 103(5), 2004-2014.
- Xue, J., Dong, J. H., Huang, G. D., Qu, X. F., Wu, G., and Dong, X. R. (2014). NF- κ B signaling modulates radiation-induced microglial activation. *Oncology Reports*, 31(6), 2555-2560.
- Yaksh, T. L., Dirig, D. M., and Malmberg, A. B. (1998). Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer investigation*, 16(7), 509-527.
- Yan, R. J., Yang, Y. F., Luo, Y. M., and Wu, C. Z. (2011). Inhibition of *Corydalis decumbens* alkaloids on hydrogen peroxide-induced apoptosis of PC12 cells through down-regulating caspase-3 expression. *Chinese Herbal Medicines*, 3(4), 294-300.
- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T., and Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21(1), 381-406.

- Yang, C. S., Lee, H. M., Lee, J. Y., Kim, J. A., Lee, S. J., Shin, D. M., Lee, Y. H., Lee, D. S., Benna, J. E., and Jo, E. K. (2007). Reactive Oxygen Species and p47phox activation are Essential for the *Mycobacterium tuberculosis*-induced pro-inflammatory response in murine microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 4(27), 1-16.
- Yang, L., He, H. Y., and Zhang, X. J. (2002). Increased expression of intranuclear AChE involved in apoptosis of SK-N-SH cells. *Neuroscience Research*, 42(4), 261-268.
- Yang, W. S., Kim, K. J., Gaschler, M. M., Patel, M., Shchepinov, M. S., and Stockwell, B. R. (2016). Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(34), 4966-4975.
- Yasojima, K., Tourtellotte, W. W., McGeer, E. G., and McGeer, P. L. (2001). Marked increase in Cyclooxygenase-2 in ALS spinal cord implications for therapy. *Neurology*, 57(6), 952-956.
- Yenari, M. A., Kauppinen, T. M., and Swanson, R. A. (2010). Microglial activation in stroke: Therapeutic targets. *Neurotherapeutics*, 7(4), 378-391.
- Yoshihara, T., Ishigaki, S., Yamamoto, M., Liang, Y., Niwa, I., Takeuchi, H., Doyu, M., and Sobue, G. (2002). Differential expression of inflammation-and apoptosis-related genes in spinal cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 80(1), 158-167.
- Young, K. D. (2006). The selective value of bacterial shape. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(3), 660-703.
- Yu, H. H., Kim, K. J., Cha, J. D., Kim, H. K., Lee, Y. E., Choi, N. Y., and You, Y. O. (2005). Antimicrobial activity of berberine alone and in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Food*, 8(4), 454-461.
- Yu, S. W., Wang, H., Poitras, M. F., Coombs, C., Bowers, W. J., Federoff, H. J., Poirier, G. G., Dawson, T. M., and Dawson, V. L. (2002). Mediation of poly (ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*, 297(5579), 259-263.
- Yu, W., Mechawar, N., Krantic, S., and Quirion, R. (2010). Evidence for the involvement of apoptosis-inducing factor-mediated caspase-independent neuronal death in Alzheimer disease. *The American Journal of Pathology*, 176(5), 2209-2218.
- Yu, X., Gao, X., Zhu, Z., Cao, Y., Zhang, Q., Tu, P., and Chai, X. (2014). Alkaloids from the tribe *Bocconieae* (*Papaveraceae*): A chemical and biological review. *Molecules*, 19(9), 13042-13060.
- Yuan, J., and Yankner, B. A. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 407(6805), 802-809.
- Zhang, J. Y., Jiang, H., Gao, W., Wu, J., Peng, K., Shi, Y. F., and Zhang, X. J. (2008). The JNK/AP1/ATF2 pathway is involved in H₂O₂-induced acetylcholinesterase expression during apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(9), 1435-1445.

- Zhang, W. H., Wang, X., Narayanan, M., Zhang, Y., Huo, C., Reed, J. C., and Friedlander, R. M. (2003). Fundamental role of the Rip2/caspase-1 pathway in hypoxia and ischemia-induced neuronal cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 16012-16017.
- Zhang, X. J., and Greenberg, D. S. (2012). Acetylcholinesterase involvement in apoptosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5(40), 1-6.
- Zhang, X. J., Yang, L., Zhao, Q., Caen, J. P., He, H. Y., Jin, Q. H., Guo, L. H., Alemany, M., Zhang, L. Y., and Shi, Y. F. (2002). Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. *Cell death and Differentiation*, 9(8), 790-800.
- Zhang, X., Wang, G., Gurley, E. C., and Zhou, H. (2014). Flavonoid apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in macrophages. *PLoS One*, 9(9), 1-18.
- Zhao, Y., Wu, Y., and Wang, M. (2015). Bioactive substances of plant origin. *Handbook of Food Chemistry*, 1-35.
- Zheng, W. X., Wang, F., Cao, X. L., Pan, H. Y., Liu, X. Y., Hu, X. M., and Sun, Y. Y. (2014). Baicalin protects PC-12 cells from oxidative stress induced by hydrogen peroxide via anti-apoptotic effects. *Brain Injury*, 28(2), 227-234.
- Zhou, Y., Su, Y., Li, B., Liu, F., Ryder, J. W., Wu, X., Gonzalez-DeWhitt, P. A., Gelfanova, V., Hale, J. E., May, P. C., Paul, S. M., and Ni, B. (2003). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs can lower amyloidogenic A β 42 by inhibiting Rho. *Science*, 302(5648), 1215-1217.
- Zhu, X. C., Yu, J. T., Jiang, T., Wang, P., Cao, L., and Tan, L. (2015). CR1 in Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, 51(2), 753-765.
- Zhu, Z., Rezhdo, O., Perrone, M., Bao, Z., Munir, A., Wang, J., Zhoua, H., and Shao, J. (2013). Magnetite nanoparticles doped photoresist derived carbon as a suitable substratum for nerve cell culture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 428-434.
- Ziegler, J. and Facchini, P. J. (2008). Alkaloid biosynthesis: Metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 735-769.
- Zilka, N., Kazmerova, Z., Jadhav, S., Neradil, P., Madari, A., Obetkova, D., Bugos O., and Novak, M. (2012). Who fans the flames of Alzheimer's disease brains? Misfolded tau on the crossroad of neurodegenerative and inflammatory pathways. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 47.
- Ziv, I., Melamed, E., Nardi, N., Luria, D., Achiron, A., Offen, D., and Barzilai, A. (1994). Dopamine induces apoptosis-like cell death in cultured chick sympathetic neurons—a possible novel pathogenetic mechanism in Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 170(1), 136-140.
- Zou, K., Li, Z., Zhang, Y., Zhang, H. Y., Li, B., Zhu, W. L., Shi, J. Y., Jia, Q., and Li, Y. M. (2017). Advances in the study of berberine and its derivatives: a focus on anti-

inflammatory and anti-tumor effects in the digestive system. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(2), 157-167.

Zou, Z., Liu, C., Che, C., and Huang, H. (2014). Clinical genetics of Alzheimer's disease. *BioMed Research International*, 1, 1-10.

Žuk, M., Kulma, A., Dymińska, L., Szołtysek, K., Prescha, A., Hanuza, J., and Szopa, J. (2011). Flavonoid engineering of flax potentiate its biotechnological application. *BMC Biotechnology*, 11(10), 1-19.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KOÇANCI, Fatma Gonca
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 23.04.1982, Borçka
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (506) 863 87 88
 e-mail : goncaok@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi / Biyoloji	Devam ediyor
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji	2008
Lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji	2004
Lise	Anıttepe Süper (YDA) Lisesi	2000

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2012-2017	Intecro Robotik, Otomasyon, Mühendislik A.Ş.	AR-Ge Sorumlusu
2011-2012	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD.	Biyolog
2007-2011	Bilkent Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	Biyolog

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Hamamcioglu, B., Kocanci, F. G., and Aslim, B. (2018). Phytochemical screening and evaluation of neuroprotective, anti-mutagenic and anti-genotoxic effects of Turkish endemic *Glaucium acutidentatum*. *South African Journal of Botany*, 117, 232-239.

Kocanci, F. G., Hamamcioglu, B., and Aslim, B. (2017). The anti-AChE and anti-proliferative Activities of *Glaucium acutidentatum* and *Glaucium corniculatum* Alkaloid Extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(08), 191-200.

Kocanci, F. G., Hamamcioglu, B., Aslim, B. (2017). Neuroprotective effects of rutin and quercetin flavonoids in *Glaucium corniculatum* methanol and water extracts. *International Journal of Secondary Metabolite*, 4(3), 85-93.

Koçancı, F. G. ve Aslım, B. (2017). Kalsinörin Mekanizması ve Kalsinörin İnhibitörlerinin Alzheimer Hastalığının Tedavisindeki Önemi (Kalsinörin ve Alzheimer Hastalığı). *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 24(4), 178-187.

Koçancı, F. G., and Aslım, B. (2016). Structure and Functions of Acetylcholinesterase and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Plants. *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*, 6(1), 19-35.

Sunumlar

Çınar, Ö., Özkavukcu, S., Aras, D., Boz, B., Koçancı, G., Can, A. (2011, Ekim), *Soğuşun Oosit Mayoz Mekiği Üzerine Etkilerinin İncelenmesi*. 3. Üreme Tıbbı Derneği Kongresinde sunuldu, Antalya.

Kocancı, F. G., Hamamcioglu, B., Aslım, B. (2017, May). *Neuroprotective effects of rutin and quercetin flavonoids in Glaucium corniculatum methanol and water extracts*. Paper presented at the First International Congress on Medical and Aromatic Plants, Konya.

Kocanci, F. G., Aslim, B. (2017, May). *Anti-AChE and Anti-proliferative Effects of Glaucium acutidentatum and Glaucium corniculatum Alkaloid Extracts*. 1. Uluslararası Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Kongresinde sunuldu, Konya.

Koçancı, G., Boz, B., Aras, D., Özkavukçu, S., Çınar, Ö., and Can, A. (2011, Ekim), *İnsan Ovositlerinin Taramalı Elektron Mikroskopu Takibinde HMDS ile Kurutulması Sonuçları*. 20. Ulusal Elektron Mikroskopu Kongresinde sunuldu, Kemer.

Projeler

Kanser İlaç Teknolojileri Projesi (KANİLTEK). Devlet Planlama Teşkilatı.

Karaciğer Kanserinin Epigenetik Analizi Projesi. TÜBİTAK. Proje kodu; 1001-109S191.

Mikrobiyolojik Ekim Prosesleri için Geliştirilen Robotik Sistemin (ROMES' in) Prototip İmalatı Projesi. Ankara Kalkınma Ajansı. Proje kodu; TR51/11/YEN/0132/021.

Nöral Hastalıklarda Alternatif Bir İlaç Adayı Olabilecek *Glaucium corniculatum* Alkaloid Ekstraktlarının Apoptoz, İnflamasyon ve Asetilkolinesteraz (AChE)'ı Baskılama Potansiyellerine Göre Etkilerinin Araştırılması. Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi. Proje kodu; BAP-05/2017-01.

Hobiler

Yüzme, seyahat, kitap okumak



GAZİ GELECEKTİR..