



**T.C.
GAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**BITKİSEL KÖKENLİ BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN ANTI-
ALZHEIMER ETKİLERİNİN *IN VITRO*, *IN VIVO* VE *IN SILICO*
YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

TUĞBA UÇAR AKYÜREK

FARMAKOĞNOZİ ANABİLİM DALI

MAYIS 2024



BİTKİSEL KÖKENLİ BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN ANTI-ALZHEIMER ETKİLERİNİN *IN VITRO*, *IN VIVO* VE *IN SILICO* YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

Tuğba UÇAR AKYÜREK

**DOKTORA TEZİ
FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MAYIS 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık 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.

Tuğba UÇAR AKYÜREK

27/05/2024

BİTKİSEL KÖKENLİ BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN ANTI-ALZHEIMER ETKİLERİNİN *IN VITRO*,
IN VIVO VE *IN SILICO* YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Tuğba UÇAR AKYÜREK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mayıs 2024

ÖZET

Bu tez çalışmasında, bitkilerde bulunan 38 adet fenolik bileşiğin Alzheimer hastalığına (AH) karşı etkileri *in vitro*, *in vivo*, *in silico* ve hücre kültürü deneysel yöntemleri yanı sıra AH ile ilişkili genler üzerinde de araştırılmıştır. *In vitro* yöntemle yapılan ilk taramaya göre, rozmarinik asit, gallik asit, kersetin, *trans-resveratrol*, oleuropein, fisetin, epigallokateşin gallat (EGCG) ve 3-hidroksitirozol kolinesteraz (asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz) enzim inhibitörü olarak en etkili fenolik bileşikler olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, EGCG, kersetin, rozmarinik asit, *trans-resveratrol* ve oleuropein, β -sekretaz enzim inhibitörü olarak da etkili bulunmuştur. Bunun yanında, bileşiklerin demir iyonu şelasyon etki, demir-indirgeme antioksidan gücü (FRAP), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve bakır-indirgeme antioksidan gücü (CUPRAC) gibi yöntemlerle antioksidan kapasiteleri araştırılmış ve enzim inhibitörü olarak etkili bulunan fenolik bileşiklerin yüksek antioksidan etki gösterdiği tespit edilmiştir. Daha sonra, en etkili olduğu tespit edilen bileşiklerden seçilenler farelerde pasif kaçınma, sirke sineği olarak bilinen *Drosophila melanogaster*'de nöroprotektif etki modeli ve zebra balığı (*Danio rerio*) davranış modelleri gibi *in vivo* yöntemlerle test edilmiş ve 3-hidroksitirozol, EGCG, oleuropein, gallik asit ve rozmarinik asitin olumlu etki gösterdiği tespit edilmiştir. *In vitro* ve *in vivo* deney modellerinde etkili oldukları belirlenen fenolik bileşiklerin nöroprotektif etkileri, moleküler modelleme ve PASS yazılım programında biyolojik ve sitotoksik aktivite tahminleri gibi *in silico* yöntemlerle de değerlendirilmiştir. Bunun yanında, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolyum bromür (MTT) ve Alamar Blue yöntemleri ile SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattında seçilen bileşiklerin sitotoksitesinin değerlendirildiği çalışmalarda, özellikle rozmarinik asit ve 3-hidroksitirozol en düşük sitotoksiteyi göstermiştir. Ayrıca, AH patolojisinde yer alan düzensiz gen ifadelerinden yola çıkarak fenolik bileşiklerin bazı ilişkili genler üzerindeki gen ifade düzeyi değişimleri test edilmiştir. Fenolik bileşiklerin anti-Alzheimer etkiyi sağlamadaki rolünün ilk defa bu kadar çok yöntem ile mukayeseli olarak araştırıldığı tez çalışmamızda, 3-hidroksitirozol, EGCG, oleuropein, gallik asit, rozmarinik asit ve kersetin ümit verici nöroprotektif bileşikler olarak öne çıkmaktadır.

Bilim Kodu : 1017
Anahtar Kelimeler : Alzheimer hastalığı, fenolik bileşik, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, pasif kaçınma, antioksidan, gen ekspresyonu, MTT, Alamar Blue
Sayfa Adedi : 167
Danışman : Prof. Dr. İlkay ERDOĞAN ORHAN

INVESTIGATION ON ANTI-ALZHEIMER EFFECT OF SEVERAL PHENOLIC COMPOUNDS OF
PLANT ORIGIN USING *IN VITRO*, *IN VIVO* AND *IN SILICO* EXPERIMENTAL MODELS

(Ph. D. Thesis)

Tuğba UÇAR AKYÜREK

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

May 2024

ABSTRACT

In this thesis study, the effects of 38 phenolic compounds commonly found in plants against Alzheimer's disease (AD) were investigated by *in vitro*, *in vivo*, *in silico*, and cell culture experimental methods, as well as on AD-related genes. According to the first screening performed by *in vitro* method, rosmarinic acid, gallic acid, quercetin, *trans*-resveratrol, oleuropein, fisetin, epigallocatechin gallate (EGCG), and 3-hydroxytyrosol were determined to be the most effective phenolic compounds as cholinesterase (acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase) enzyme inhibitors. Additionally, EGCG, quercetin, rosmarinic acid, *trans*-resveratrol, and oleuropein were also found to be effective as β -secretase enzyme inhibitors. In addition, the antioxidant capacities of the compounds were investigated by methods such as iron ion chelation effect, iron-reduction antioxidant power (FRAP), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), and copper-reduction antioxidant power (CUPRAC) and it was determined that phenolic compounds, found to be effective as enzyme inhibitors, displayed high antioxidant effect. Then, selected compounds found to be the most effective were tested with the *in vivo* methods such as passive avoidance test in mice, neuroprotective effect model in *Drosophila melanogaster* known as the fruit fly, and behavioral models in zebrafish (*Danio rerio*). 3-Hydroxytyrosol, EGCG, oleuropein, gallic acid, and rosmarinic acid were determined to exert positive results. The neuroprotective effects of phenolic compounds, which were determined to be effective in our *in vitro* and *in vivo* experimental models, were further evaluated using *in silico* methods such as molecular docking and biological and cytotoxic activity predictions in the PASS software program, where the positive results were obtained. In addition, in the studies evaluating cytotoxicity in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line using MTT and Alamar Blue methods, rosmarinic acid and 3-hydroxytyrosol, in particular, exhibited the lowest cytotoxicity. Furthermore, based on the irregular gene expressions involved in AD pathology, the gene expression level changes of phenolic compounds on some related genes were tested. To conclude, in the study, in which the role of phenolic compounds in providing the anti-Alzheimer effect was investigated comparatively with many methods for the first time, 3-hydroxytyrosol, EGCG, oleuropein, gallic acid, rosmarinic acid and quercetin stand out as promising neuroprotective compounds against AD.

Science Code : 1017
Key Words : Alzheimer's disease, phenolic compound, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, passive avoidance, antioxidant, gene expression, MTT, Alamar Blue
Page Number : 167
Supervisor : Prof. Dr. İlkey ERDOĞAN ORHAN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimine başlamam konusunda beni teşvik eden, tez konumun belirlenmesinde ve tez çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, maddi ve manevi desteğini üzerimden eksik etmeyen, her zaman örnek aldığım ve sürekli iletişimimi sürdürüleceğim değerli hocam Prof. Dr. İlkyay ERDOĞAN ORHAN'a tüm emekleri için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen Tez İzleme Komitesi (TİK) üyesi hocalarım Prof. Dr. Mustafa ASLAN ve Prof. Dr. Yasemin DÜNDAR ile Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Esra AKKOL'a ve diğer öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasındaki yardımları ve destekleri için Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesinden Prof. Dr. İpek SÜNTAR, Prof. Dr. Mürşide Ayşe DEMİREL ve Prof. Dr. Fatma Sezer ŞENOL DENİZ ile Farmakognozi Anabilim Dalı araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hücre kültürü yöntemi ve *in silico* toksisite analizleri ve moleküler kenetlenme deneylerimde yardımlarını esirgemeyen Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi öğretim üyeleri Prof. Dr. Gökçen EREN ve Doç. Dr. Esra EMERCE'ye teşekkürü borç bilirim.

Danio rerio ve *Drosophila melanogaster* üzerinde *in vivo* çalışmaları gerçekleştirmemde yardımcı olan Iasi Alexandru Ioan Cuza Üniversitesi (Romanya), Biyoloji Bölümünden Sayın Prof. Dr. Lucian HRITCU ile Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünden Sayın Dr. Güzin EMECEN ile doktora öğrencileri Memet GÖZÜBÖYÜK ve Gülnur İPEK'e çok teşekkür ederim. Gen ekspresyonu çalışmalarımın destekleri için Abdullah Gül Üniversitesi, Yaşam ve Doğa Bilimleri Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Alaattin ŞEN ile Arş. Gör. Büşra ACAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince sevgi ve desteğiyle hayatımı kolaylaştıran değerli eşim Mustafa AKYÜREK'e, varlığıyla hayatımı daha anlamlı kılan kızım İpek AKYÜREK'e, hayatımın her döneminde olduğu gibi bu süreçte de desteklerini esirgemeyip her zaman yanımda olan annem ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın bir kısmını 02/2019-31 kodlu proje ile destekleyen Gazi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET ..	iv
ABSTRACT ..	v
TEŞEKKÜR ..	vi
İÇİNDEKİLER ..	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ ..	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ ..	xii
RESİMLERİN LİSTESİ ..	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR ..	xv
1. GİRİŞ ..	1
2. GENEL BİLGİLER ..	7
2.1. Alzheimer Hastalığı ..	7
2.1.1. Semptomlar ..	7
2.1.2. Epidemiyoloji ..	7
2.1.3. Risk faktörleri ..	7
2.1.4. Genetik etiyoloji ..	8
2.1.5. Patolojik bulgular ..	8
2.1.6. Tedavi yaklaşımları ..	10
2.2. Fenolik Bileşikler ..	15
2.2.1. Genel özellikler ..	15
2.2.2. Biyosentez ve sınıflandırma ..	16
2.2.3. İzolasyon ..	17
2.2.4. Kan beyin bariyeri geçebilme özellikleri ..	17
2.3. Bitkisel Kaynaklı Fenolik Bileşiklerin Nöroprotektif Etkileri ..	19

Sayfa

2.3.1. Fenolik bileşikler ile yapılan AChE, BChE ve BACE1 enzim inhibisyonuna ait çalışmalar.....	19
2.3.2. Fenolik bileşikler ile yapılan antioksidan aktivite çalışmaları.....	23
2.3.3. Fenolik bileşikler ile yapılan in vivo nöroprotektif etki tayinine ait çalışmalar.....	30
2.3.4. Fenolik bileşiklerin AChE, BChE ve BACE1 enzimleriyle moleküler modellemesine ait çalışmalar.....	35
2.3.5. Fenolik bileşiklerin sitotoksitelerine ait çalışmalar.....	39
2.3.6. Fenolik bileşiklerin AH ile ilişkilendirilen genler üzerindeki etkilerine ait çalışmalar.....	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	45
3.1. Gereç.....	45
3.2. Yöntemler.....	51
3.2.1. In vitro yöntemler.....	51
3.2.2. In vivo yöntemler.....	60
3.2.3. In silico yöntemler.....	71
4. BULGULAR.....	73
4.1. AChE ve BChE Enzim İnhibisyonuna Ait Bulgular.....	73
4.2. BACE1 İnhibisyonuna Ait Bulgular.....	75
4.3. Demir İyonu-Şelasyon Etki Tayinine Ait Bulgular.....	76
4.4. FRAP Tayinine Ait Bulgular.....	78
4.5. DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Tayinine Ait Bulgular.....	80
4.6. CUPRAC Tayinine Ait Bulgular.....	82
4.7. Hücre Kültürü Yöntemiyle Sitotoksitate Tayinine Ait Bulgular.....	84
4.7.1. MTT yöntemiyle elde edilen sitotoksik aktivite tayinine ait bulgular.....	84

Sayfa

4.7.2. Alamar Blue yöntemiyle elde edilen sitotoksik aktivite tayinine ait bulgular.....	85
4.8. Real Time-PCR Yöntemiyle Ekspresyon Analizine Ait Bulgular.....	87
4.9. Antiamnezik Aktivite Tayinine Ait Bulgular	89
4.10. Drosophila melanogaster Nöroprotektif Etki Modeliyle Aktivite Tayinine Ait Bulgular.....	90
4.11. Zebra Balığı Davranış Modelleriyle Nöroprotektif Etki Tayinine Ait Bulgular ..	92
4.11.1. Fenolik bileşiklerin yeni tank dalış (YTT) testinde kaygı benzeri davranışlar üzerine etkisi.....	92
4.11.2. Fenolik bileşiklerin Y-labirent testinde hafıza ve yeniliğe tepki üzerindeki etkileri	94
4.11.3. Fenolik bileşiklerin yeni nesne tanıma testinde tanıma belleği üzerindeki etkileri	95
4.12. In Silico Biyolojik Aktivite Tayinine Ait Bulgular.....	96
4.13. In Silico Toksikite Tayinine Ait Bulgular	104
4.14. Moleküler Modelleme Çalışmalarına Ait Bulgular.....	107
4.14.1. AChE ile gerçekleştirilen moleküler modelleme çalışmalarına ait bulgular.....	107
4.14.2. BChE ile gerçekleştirilen moleküler modelleme çalışmalarına ait bulgular.....	110
4.14.3. BACE1 ile gerçekleştirilen moleküler modelleme çalışmalarına ait bulgular.....	112
5. TARTIŞMA.....	115
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	127
KAYNAKLAR.....	129
ÖZGEÇMİŞ	165

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1.1. AH tedavisinde kullanılan bazı sentetik ve doğal kökenli kolinesteraz inhibitörleri ile NMDA reseptör antagonisti	2
Çizelge 2.1. Bazı fenolik bileşiklerin KBB'ni geçebilme özellikleri	18
Çizelge 2.2. DPPH radikal süpürme yöntemiyle fenolik bileşikler üzerinde yapılan antioksidan aktivite çalışmalarına örnekler	25
Çizelge 2.3. Bazı fenolik bileşiklerin AChE ve BChE enzimleriyle moleküler modellemesine ait bağlanma enerjileri (Alam ve diğerleri 2018)	37
Çizelge 2.4. Bazı fenolik bileşiklerin AChE ve BChE enzimleriyle moleküler kenetlenmesine ait bağlanma enerjileri (Madeswaran, 2017).....	38
Çizelge 2.5. Bazı fenolik bileşiklerin SH-SY5Y hücrelerinde A β ₄₂ , bakır- A β ₄₂ ve L-DOPA- A β ₄₂ -kaynaklı toksisiteye karşı nöroprotektif etkileri (Omar ve diğerleri 2018b).....	39
Çizelge 3.1. Tez çalışması için seçilen bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin kimyasal yapı ve sınıfları	45
Çizelge 3.2. Gene özgü primer dizileri ve primer yapışma sıcaklıkları	60
Çizelge 3.3. 72 saat/yaştaki Drosophila melanogaster larvalarının beslendiği fenolik bileşik ve pozitif kontrol konsantrasyonları	64
Çizelge 4.1. Fenolik bileşiklerin AChE ve BChE inhibitör etkileri (% İnhibisyon \pm S.S. ^a , 1 mM final konsantrasyon)	74
Çizelge 4.2. AChE'a karşı fenolik bileşikler ve galantaminin IC ₅₀ değerleri.....	75
Çizelge 4.3. Seçilen fenolik bileşiklerin 1 mM final konsantrasyonda BACE-1 inhibitör etkileri	76
Çizelge 4.4. Fenolik bileşiklerin demir iyonu-şelasyon etkileri (% Şelasyon \pm S.S. ^a)	77
Çizelge 4.5. Fenolik bileşiklerin 10 mM stok konsantrasyonda FRAP değerleri	79
Çizelge 4.6. Fenolik bileşiklerin 10 mM stok konsantrasyonda DPPH radikal süpürücü etkileri	81
Çizelge 4.7. Fenolik bileşiklerin 10 mM stok konsantrasyonda CUPRAC değerleri	83

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.8. Fenolik bileşiklerin SH-SY5Y hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksosite değerlendirmesine ait IC ₅₀ değerleri	84
Çizelge 4.9. Fenolik bileşiklerin SH-SY5Y hücrelerinde Alamar Blue yöntemiyle sitotoksosite değerlendirmesine ait IC ₀₈ değerleri	86
Çizelge 4.10. Gallik asit, rozmarinik asit, kersetin ve EGCG'nin genler üzerindeki fold regülasyon değerleri	88
Çizelge 4.11. Fisetin, 3-hidroksitirozol, oleuropein ve trans-resveratrolün genler üzerindeki fold regülasyon değerleri	88
Çizelge 4.12. Pasif kaçınma testinde deney gruplarına enjekte edilen doz, ağırlık ortalamaları, 1. ve 2. gün karanlık bölmeye geçiş süreleri [Ortalama (dk) ± S.S.] ve istatistiksel analiz sonuçları.....	90
Çizelge 4.13. Seçilen doğal kaynaklı bileşiklerin AH'na karşı potansiyel biyolojik aktivite tahminleri	97
Çizelge 4.14. Seçilen fenolik bileşiklerin insanlarda oluşturabileceği potansiyel toksik veya advers etki tahminleri	105

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Alzheimer hastalığında nörofibriler dejenerasyona yol açan olay dizisi (Klafki ve diğerleri 2016'dan Türkçe'ye çevrilmiştir)	10
Şekil 2.2. AChE enzimine ait temsili aktif bölge (Dvir ve diğerleri 2010'dan Türkçe'ye çevrilmiştir)	12
Şekil 2.3. APP bölünmesi, A β agregasyonu ve senil plakların oluşumu (Keske, 2023) ...	14
Şekil 3.1. Ellman Yöntemi kimyasal reaksiyon mekanizması (Ali-Shtayeh ve diğerleri 2014'ten Türkçe'ye çevrilmiştir)	52
Şekil 4.1. Kersetin, oleuropein, gallik asit, epigallokateşin gallat, rozmarinik asit, 3-hidroksitirozole ait MTT yöntemiyle elde edilen sitotoksisite sonuçları	85
Şekil 4.2. Kersetin, rozmarinik asit, gallik asit ve EGCG'e ait Alamar Blue yöntemiyle elde edilen sitotoksisite sonuçları	86
Şekil 4.3. Fisetin, oleuropein, 3-hidroksitirozol vve <i>trans</i> -resveratrole ait Alamar Blue yöntemiyle elde edilen sitotoksisite sonuçları	87
Şekil 4.4. Kontrol grubuna kıyasla fenolik bileşiklerin genler üzerindeki fold regülasyon değerleri	89
Şekil 4.5. Pasif kaçınma testinde deney gruplarına göre 1. ve 2. gün karanlık bölmeye geçiş süreleri ve istatistiksel analiz sonuçları.....	90
Şekil 4.6. Seçilen fenolik bileşikler, pozitif ve negatif kontrollerin <i>Drosophila melanogaster</i> nöroprotektif etki modelinde AChE aktivite ölçümüne ait (V_{max}) değerleri.....	91
Şekil 4.7. Seçilen fenolik bileşikler, pozitif ve negatif kontrollerin <i>Drosophila melanogaster</i> nöroprotektif etki modelinde BChE aktivite ölçümüne ait (V_{max}) değerleri.....	91
Şekil 4.8. Fenolik bileşikler (3 μ g/L) kaygı durumunu azaltmış ve yeni tank dalış testinde (YTT) hareket kabiliyetini etkilemiştir. Kaygı benzeri davranış: farklı gruplarda üst bölgede geçirilen süre ve üst/alt oranında geçirilen süre; Hareket: Zebra balığının farklı gruplarda tankta kat ettiği toplam mesafe (m) ve hız (m/s). Değerler: ortalama \pm S.S. (n = 10). EG - epigallokateşin gallat; FS – fisetin; OP – oleuropein; RA - rozmarinik asit; KK – kersetin; 3HT - 3-hidroksitirozol; GA - gallik asit; RV – <i>trans</i> -resveratrol.....	93

Şekil	Sayfa
Şekil 4.9. Fenolik bileşikler (3 µg/L), Y-labirent testinde hafızayı ve hareket kabiliyetini iyileştirmiştir. Bellek: farklı gruplarda spontan değişim %'si; her bir kolda geçirilen süre (toplam sürenin yüzdesi); Hareket: Zebra balığının farklı gruplarda tankta kat ettiği toplam mesafe (m) ve farklı gruplarda zebra balığının tankta dönüş açısı. Değerler: ortalama ± S.S. (n = 10). EG - epigallokateşin gallat; FS – fisetin; OP – oleuropein; RA - rozmarinik asit; KK – kersetin; 3HT - 3-hidroksitirozol; GA - gallik asit; RV – <i>trans</i> -resveratrol ...	95
Şekil4.10. Fenolik bileşikler (3 µg/L), YNT testindeki tercih yüzdesini iyileştirmiştir. Değerler: ortalama ± S.S. (n = 10). EG - epigallokateşin gallat; FS – fisetin; OP – oleuropein; RA - rozmarinik asit; KK – kersetin; 3HT - 3-hidroksitirozol; GA - gallik asit; RV – <i>trans</i> -resveratrol	96
Şekil 4.11. İnsan AChE aktif bölgesinde (PDB kodu: 4EY7) kersetin (A), oleuropein (B), rozmarinik asit (C), 3-hidroksitirozol (D), gallik asit (E) ve EGCG (F) için belirlenen bağlantı konformasyonları.....	109
Şekil 4.12. İnsan BChE aktif bölgesinde (PDB kodu: 4TPK) kersetin (A), oleuropein (B), rozmarinik asit (C), 3-hidroksitirozol (D), gallik asit (E) ve EGCG (F) için belirlenen bağlantı konformasyonları.....	112
Şekil 4.13. İnsan BACE1 aktif bölgesinde (PDB kodu: 2WJO) rozmarinik asit (A), EGCG (B), oleuropein (C), kersetin (D), gallik asit (E) ve 3-hidroksitirozol (F) için belirlenen bağlantı konformasyonları.....	114

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Antiamnezik aktivite tayininde kullanılmak üzere gruplara ayrılmış erkek Swiss albino fareler	62
Resim 3.2. Pasif kaçınma testi düzeneği	62
Resim 3.3. Fenolik bileşikler ile beslenmiş 5-7 günlük dişi ve erkek bireyler	64
Resim 3.4. Üçüncü evre larvaların ince gözenekli metal elekte yıkanması	65
Resim 3.5. Üçüncü evre larvaların fenolik bileşiklerin iki konsantrasyonu ile hazırlanan besiyerinde pupa evresine kadar beslendiği tüpler	65
Resim 3.6. Enzim kaynağı olarak kullanılan, steril tüplere konulmuş süpernatantlar....	66
Resim 3.7. Yeni tank dalgı testi düzeneği	68
Resim 3.8. Y-Labirent testi düzeneği.....	69
Resim 3.9. Yeni nesne tanıma testi düzeneği	70
Resim 4.1. In vitro kolinesteraz enzim inhibisyonu tayini	75

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
°	Dönüş açısı
°C	Santigrad derece
Å	Armstrong
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
kg	Kilogram
<i>Kkal</i>	Kilokalori
L	Litre
M	Molarite
m	Metre
m/s	Hız
mA	Miliamper
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
pH	Potansiyel hidrojen
rpm	Revolution <i>per</i> minute (1 dakika içerisinde gerçekleştirilen devir sayısı)

sn	Saniye
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol

Kısaltmalar

Açıklamalar

ABCA7	ATP Binding Cassette Subfamily A Member 7 (ATP Bağlayıcı Kaset Alt Ailesi A Üyesi 7)
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
ADAM 10	A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (A disintegrin ve metalloproteinaz alanı içeren protein 10)
AH	Alzheimer hastalığı
ALS	Amyotrofik lateral skleroz
ANOVA	Analysis of variance (Varyans analizi)
APH1	Anterior pharynx-defective 1 (Ön yutak defektif-1)
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amiloid prekürsör protein
Aβ	β -Amiloid plak
Aβ42	Amiloid β_{42}
BACE1	β -Site amyloid precursor protein cleaving enzyme (β -sekretaz enzimi)
BChE	Bütirilkolinesteraz
BHA	Bütihidroksianisol

BHT	Bütilhidroksitoluen
BIN1	Bridging integrator-1 (Köprüleme entegratörü 1)
CCL5	Chemokine C-C (motif) ligant 5 [Kemokin C-C (motif) ligant 5]
CD2AP	CD2-associated protein (CD2-ilişkili protein)
CD33	Sialic acid binding Ig-like lectin 3 (Sialik asit-bağlayıcı immüoglobulin-lektin 3)
cDNA	Complementary DNA (Tamamlayıcı DNA)
ChAT	Kolin asetiltransferaz
CLU	Clusterin (Klusterin)
COX-2	Cyclooxygenase-2 (Siklooksijenaz-2)
CR1	Kompleman reseptörü tip 1 (Complement receptor type 1)
CUPRAC	Copper-reducing antioxidant power (Bakır-indirgeme antioksidan gücü)
CXCL13	C-X-C motif chemokine ligand 13 (C-X-C motifli kemokin ligant 13)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DON	Deoksinivalenol
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
DTNB	5,5'-Ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit
EC₅₀	Half-maximal effective concentration (% 50 Etki gözlenen konsantrasyon)
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EGCG	Epigallokateşin gallat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Enzim-bağlantılı immünosorbent deneyi)
FBS	Fetal bovine serum (Fetal sığır serumu)

FDA	Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
FRAP	Ferric-reducing antioxidant power (Demir-indirgeme antioksidan gücü)
FRET	Fluorescence resonance energy transfer (Floresans rezonans enerji transferi)
HeLa	Servikal epitelyal karsinom hücre hattı
HH	Huntington hastalığı
HL-60	Akut miyeloblastik lösemi
IARC	International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı)
IC₀₈	% 8 İnhibisyon gözlenen konsantrasyon
IC₅₀	Half-maximal inhibitory concentration (% 50 İnhibisyon gözlenen konsantrasyon)
IFD	Induced fit docking (İndüklenmiş uyum kenetlenmesi)
IL	İnterlökin
<i>i.p.</i>	İntroperitoneal
<i>i.v.</i>	İntravenöz
K-562	Kronik miyelojenik lösemi
KBB	Kan beyin bariyeri
LPS	Lipopolisakkarit
MCF-7	Meme adenokarsinomu
MDA	Malondialdehit
MMP9	Matriks metalloproteinaz-9 (Matrix metalloproteinases 9)
MNA	Multilevel neighborhoods of atoms (Atomların çok düzeyli komşulukları)
MS	Multipl skleroz

MSS	Merkezi sinir sistemi
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolyum bromür
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NF-κB	Nükleer faktör kappa b
NMDA	<i>N</i> -Metil-D-aspartat
OPLS-3	Optimized potential for liquid simulations (Sıvı simülasyonları için optimize potansiyel)
<i>p.o.</i>	<i>Per oral</i>
P_a	Aktif olma olasılığı
PAS	Periferik anyonik bölge
PASS	Prediction of activity spectra for substances (Maddeler için aktivite spektrumlarının tahmini)
PDB	Protein data bank (Protein veri bankası)
PH	Parkinson hastalığı
PICALM	Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein (Fosfatidilinositol bağlayıcı klatrin montaj proteini)
P_i	İnaktif olma olasılığı
PLGA-PEG	Polilaktik-ko-glikolik asit-poliyeten glikol
PSEN	Presenilin
<i>P-tau</i>	Phosphorylated tau (Fosforillenmiş tau)
PTZ	Pentilentetrazol
RMSD	Root-mean-square deviation (Kök-ortalama-kare sapması)
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reactive oxygen species (Reaktif oksijen türleri)

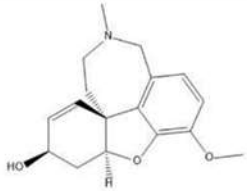
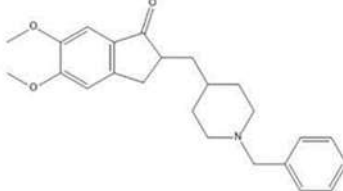
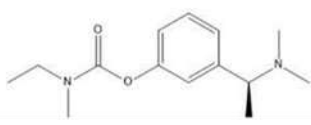
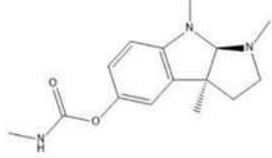
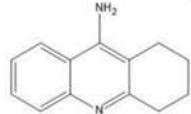
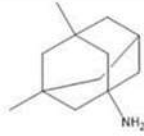
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu)
s.c.	Subkütan
S.S.	Standart sapma
sAPPβ	β -Amyloid precursor protein (β -amiloit öncü proteini)
SAR	Structure-activity relationship (Yapı-aktivite ilişkisi)
SHAM	Kontrol grubu
SH-SY5Y	SK-N-SH hücrelerinden elde edilen insan nöroblastoma hücre hattı
SK-N-SH	İnsan nöroblastoma hücre hattı
SORL1	Sortilin-related receptor 1 (Sortilin-ilişkili reseptör 1)
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity (Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite)
Tg	Transgenic (Transjenik)
TN	Tanıdık nesne
TNF-α	Tümör nekroz faktör- α
UV	Ultraviyole
V_{max}	Maksimum hız
XP	Extra precision (Ekstra hassasiyet)
YN	Yeni nesne
YNT	Yeni nesne tanıma testi
YTT	Yeni tank dalış testi

1. GİRİŞ

İnsan fizyolojisi açısından bakıldığında, fenolik bileşiklerin antioksidan, anti-enflamatuvar, antiproliferatif ve yaşlanma karşıtı gibi etkilerle vücuttaki savunma yanıtlarında önemli bir rolü vardır ve oksidatif stresin yönetilmesi yoluyla nörodejeneratif hastalıklar, kanser, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok kronik rahatsızlığın görülme sıklığını azaltacak potansiyele sahiptirler (Anantharaju ve diğerleri 2016; Crozier ve diğerleri 2009; Dai ve Mumper, 2010; Działo ve diğerleri 2016; Jacobo-Velázquez ve Cisneros-Zevallos, 2017; Lin ve diğerleri 2016). Bitkilerde bulunan en önemli ve geniş kimyasal gruplardan biri olan fenolik bileşiklerle ilgili dünyada uzun yıllardır pre-klinik ve klinik düzeyde yoğun araştırmalar sürdürülmekte olup, etki mekanizmaları fizyolojik, patofizyolojik ve moleküler yollar üzerinden de açıklanmaya çalışılmaktadır. Alzheimer hastalığı (AH), Parkinson hastalığı (PH), multipl skleroz (MS), amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve Huntington hastalığı (HH) gibi kademeli nöron kaybı, atrofi ve karmaşık patofizyolojiler ile karakterize hastalıkların tümünde nörodejenerasyon gözlenmektedir (Dugger ve Dickson, 2017). Özellikle yaşlı nüfusta sık rastlanan, ilerleyici bir hastalık olan AH, demansın en yaygın türüdür ve bu hastalığa karşı henüz bir tedavi mevcut değildir (Niu ve diğerleri 2017). Hastalığın semptomlarını gidermeye yönelik uygulanan tedaviler içerisinde en kabul gören teori, asetilkolinesteraz (AChE) enzimi tarafından hidroliz edilen asetilkolinin miktarındaki azalma sebebiyle gözlenen patolojinin düzeltilmesini hedefleyen kolinerjik hipotezdir (Anand ve Singh, 2013; Saxena ve Dubey, 2019). Kolinerjik sistemde AH ile ilişkili bir diğer enzim olan bütirikolinesterazın (BChE) β -amiloit plaklarda birikmesi sonucu oluşturduğu patolojinin düzeltilmesi de hastalığın tedavisinde diğer bir hedefdir (Darvesh, 2016; Xing ve diğerleri 2021). AH için kabul edilen diğer teori de amiloit hipotezi olmakla birlikte; bu mekanizma üzerinden semptomların giderilmesine veya tedavisine yönelik uzun yıllar herhangi bir ilaç geliştirilememiştir (Gouras ve diğerleri 2015; Paroni ve diğerleri 2019). Ancak, 2021 ve 2023 yıllarında sırasıyla, Aducanumab ve Lecanemab isimli iki anti-amiloit monoklonal antikör Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından onay almıştır (Wu ve diğerleri 2023). Ayrıca, beyinde bakır, çinko, alüminyum ve demir gibi geçiş metallerinin dengesizliğine bağlı bozulmalar AH'na sebep olmaktadır ve bu sebeple metal şelasyonun da tedavi potansiyeli olduğu düşünülmektedir (Das ve diğerleri

2021; Singh ve diğeri 2022b). Sonuç olarak, AH tedavisinde klinikte en çok reçete edilen ilaç grubu donepezil, rivastigmin ve galantamin gibi hafif ve orta dereceli semptomları gidermede kullanılan kolinesteraz inhibitörlerinin yanında, orta ve şiddetli semptomları gidermeye yönelik *N*-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonisti olan memantindir (Çizelge 1.1.) (Dou ve diğeri 2018; Guo ve diğeri 2020).

Çizelge 1.1. AH tedavisinde kullanılan bazı sentetik ve doğal kökenli kolinesteraz inhibitörleri ile NMDA reseptör antagonistin kimyasal yapıları

Galantamin	Donepezil
	
Rivastigmin	Fizostigmin
	
Takrin	Memantin
	

AH'na karşı kullanılan doğal kaynaklı ilk kolinesteraz inhibitörü olan fizostigmin, *Physostigma venenosum* Balf. (Kalabar baklası) adlı bitkiden elde edilen bir alkaloid olup, yeni nesil inhibitörlerin tasarlanmasında öncü bir yapısal model olmuştur (Çizelge 1.1). Klinikte kullanılan kolinesteraz inhibitörü bir ilaç etken maddesi olan rivastigmin, fizostigminden hareketle geliştirilmiş sentetik bir alkaloidtir (Mohs ve diğeri 1985; Pinho ve diğeri 2013). Amaryllidaceae familyasına mensup *Galanthus woronowii* Losinsk. gibi bazı bitki türlerinden izole edilen ve güçlü bir kolinesteraz inhibitörü olan galantamin, AH'da nörolojik dejenerasyon sürecini yavaşlatmak için klinikte kullanılan, doğal kaynaklı en son nesil ilaç etken maddesidir (Heinrich ve Teoh, 2004; Naguy ve diğeri 2022). Flavonoid türevleri arasında izoflavonlar ve flavonların kolinesteraz inhibisyonunda güçlü, ksantonların ise daha zayıf bileşikler olduğu; diğer yandan kinonlar ve stilbenler üzerinde bu açıdan daha az sayıda çalışma bulunduğu vurgulanmıştır (Pinho ve diğeri 2013). Bu

örneklerden yola çıkarak, doğal kaynaklardan elde edilen bileşiklerin AH tedavisinde potansiyeli olduğu ve umut vaat ettiği öngörülmektedir.

Bu sebeple “Bitkisel kökenli bazı fenolik bileşiklerin anti-Alzheimer etkilerinin *in vitro*, *in vivo* ve *in silico* yöntemlerle incelenmesi” başlıklı tezimiz kapsamında, daha önceki çalışmalarla nörodejeneratif hastalıklara karşı farklı mekanizmalarla olumlu etkileri bildirilen ve tıbbi bitkilerde yaygın olarak bulunması nedeniyle seçilen 38 adet fenolik bileşiğin (Çizelge 3.1.) *in vitro*, *in vivo* ve *in silico* deneysel yöntemlerin kombinasyonu ile nöroprotektif etkileri araştırılmak üzere seçilmiştir. AH'nın tedavisinde en fazla reçetelenen ilaç grubu olan kolinesteraz inhibitörleri esas alınarak, ön tarama kapsamına alınan bu bileşiklerin kolinesterazlara (AChE ve BChE) karşı inhibitör etkileri ilk önce *in vitro* yöntem ile test edilmiştir (Ellman ve diğerleri 1961; Saxena ve Dubey, 2019; Sharma, 2019). Bunun yanında, yüksek kolinesteraz inhibisyonu gösteren bileşiklerin, beta amiloit (β -amyloid, A β) proteinlerin oluşumunda yer alan, “memapsin 2” olarak da bilinen β -sekretaz (β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme, BACE1) enzimine karşı etkisi de *in vitro* yöntemle tayin edilmiştir (Youn ve diğerleri 2016).

Diğer yandan, Alzheimer hastalarının beyinlerinde intranöronal düzeyde demir başta olmak üzere yüksek oranda metal birikimine bağlı nörotoksisite tespit edildiğinden, fenolik bileşiklerin demir iyonu şelasyon etkisi, demir-indirgeme antioksidan gücü (ferric-reducing antioxidant power, FRAP) ve bakır-indirgeme antioksidan gücü (copper-reducing antioxidant power, CUPRAC) de *in vitro* olarak tayin edilmiştir. Ayrıca, tez çalışmamızda seçilen fenolik bileşiklerin genel antioksidan aktivitesi, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal süpürücü tayini yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmamızda, özellikle ön taramamızda *in vitro* yöntemlerde en etkili olduğu tespit edilen fenolik bileşiklerden seçilenler, *in vivo* deney modellerinde test edilmiştir. Yüksek inhibitör etkiye sahip olduğu belirlenen fenolik bileşikler, “sirke sineği” olarak bilinen *Drosophila melanogaster* modelinde *in vivo* olarak test edilmiştir. Genomu 2000 yılında dizilenen ilk kompleks organizma olan *D. melanogaster*, insan genomuyla yüksek oranda homoloji göstermesi ve çok sayıda ortak gene sahip olması, insan biyolojisi ve hastalık süreçlerinin incelenmesi ve özellikle nörodejeneratif hastalıklar için iyi bir model organizma

olması, kısa hayat döngüsüne sahip olması ve diğer birçok model organizmaya göre yüksek yavru sayısıyla çalışma imkânı vermesinden dolayı, tez çalışmamızın amacı açısından uygun bir model olarak seçilmiştir (Lee ve diğerleri 2014; McGurk ve diğerleri 2015). Ayrıca, tezimizde aktif inhibitör olduğu tespit edilen 5 adet fenolik bileşiğin anti-amnezik etkisi, AH için bir diğer *in vivo* model olan pasif kaçınma testinde skopolamin-nedenli amnezi oluşturulan farelerde test edilmiştir. Pasif kaçınma testi, merkezi sinir sistemi (MSS) ile ilgili bozuklukların kemirgen modellerinde hafıza ve öğrenmeyi değerlendirmek için kullanıldığı bir testtir (Jänicke ve Coper, 1996). Tez çalışmamızda seçilen fenolik bileşiklere uygulanan üçüncü *in vivo* deney modeli de zebra balığı (*Danio rerio*) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Zebra balığı, AH'nda mutasyona uğrayan genlere ortolog olan genlere sahiptir. Bu genlere bağlı özelliklerin kemirgen modellerinde gözlenmezken zebra balığında gözlenmesi, AH araştırmalarında zebra balığını giderek daha yaygın bir model haline getirmiştir (Newman ve diğerleri 2014).

Tezimizde, enzim inhibitör etkili fenolik bileşiklerin nöroprotektif etkileri *in silico* deneysel modellerle de incelenmiştir. Bileşiklerin potansiyel biyolojik aktiviteleri ve insandaki olası toksik etkilerinin tahmini *in silico* yöntemle, maddeler için aktivite spektrumlarının tahmini (prediction of activity spectra for substances, PASS) programı kullanılarak değerlendirilmiştir. PASS yazılımı 4000'den fazla farmakolojik etki ve biyokimyasal mekanizmanın tahmininde bileşiğin kimyasal yapısını temel alarak tahminde bulunmaktadır (Filimonov ve diğerleri 2014). Son zamanlarda sentetik ve doğal kökenli öncü biyoaktif moleküllerin protein-ligant ilişkilerinin moleküler düzeyde incelenmesinde *in silico* yöntemlerin önem kazanmasıyla tez gereçlerimizi oluşturan inhibitör etkili fenolik bileşiklerin etkinlikleri moleküler modelleme (molecular docking) yöntemiyle AChE, BChE ve β -sekretaz enzimlerinin aktif bölgelerindeki protein-ligant etkileşimleri simüle edilerek değerlendirilmiştir.

In vitro ve *in vivo* deney modellerimizde etkili oldukları belirlenen fenolik bileşikler, nöroprotektif etki için SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı hücrelerinde de test edilmiştir. Fenolik bileşiklerin hücre canlılığı ve sitotoksik özelliklerinin değerlendirilmesi 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ve Alamar Blue yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, AH'nın, birden fazla beyin bölgesinde, binlerce genin düzensiz

ifadesini içeren bir hastalık olması nedeniyle, tezimizde AH ile ilişkilendirilen bazı genler üzerinde seçilen fenolik bileşiklerin gen ifade düzeylerindeki etkileri araştırılmıştır.

Sonuç olarak, doktora tez çalışmamızda bitkilerde yaygın bulunmaları nedeniyle seçilen fenolik bileşiklerin anti-Alzheimer etkilerine yönelik yapılmış çeşitli çalışmalar olmasına rağmen, tezimizde uygulanan *in vitro*, *in vivo*, *in silico* ve hücre kültürü yöntemlerinin yanı sıra AH ile ilişkili genler üzerindeki etkilerine dayalı moleküler mekanizmaları kümülatif ve mukayeseli olarak ilk defa tez çalışmamızda gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

2.1.1. Semptomlar

Yüksek konsantrasyonda reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin, hücre ölümü ve serebral redoks homeostazını bozarak AH, MS, PH, ALS ve HH gibi birçok nörodejeneratif bozukluğu içeren MSS bozukluklarına sebep olduğu bilinmektedir (Khadka ve diğerleri 2020; Waşık ve Antkiewicz-Michaluk, 2017). Nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilen ve özellikle AH'nın ayırt edici özelliği olarak kabul edilen nöroenflamasyon, MSS'de yer alan özel bir bağışıklık tepkisidir (Fuster-Matanzo ve diğerleri 2013). AH, kronik, nörodejeneratif ve ilerleyici bir hastalık olup, esas olarak kolinerjik kaybın yanında üç grup semptom ile kategorize edilmektedir. İlk kategori, azalmış entellektüel koordinasyon yeteneği ve dil problemleri, hafıza ve planlama kaybı gibi semptomları içeren bilişsel işlev bozuklukları; ikinci kategori, depresyon, halüsinasyon, psikiyatrik ve davranışsal ajitasyon gibi bilişsel olmayan semptomları ve üçüncü kategori, yemek yemek, giyinmek, alışveriş veya araba kullanmak gibi günlük aktiviteleri yerine getirmedeki sorunlar ile ilgili semptomları içerir. AH, hafıza kayıpları gibi hafif semptomlarla başlayıp, kademeli olarak şiddetlenebilir ve demansın en yaygın tipidir (Burns ve Iliffe, 2009).

2.1.2. Epidemiyoloji

AH'nın dünya çapında yaklaşık 416 milyon insanı etkilediği ve % 70 oranında tanı konulabildiği tahmin edilmekte; insidansının 50 yaş ve sonrasında % 22 seviyesinden hızla yükseldiği, özellikle ileri yaş ve ileri hastalık evrelerinde kadınları % 54 oranda daha fazla etkilediği belirlenmiştir (Gustavsson ve diğerleri 2022). AH'dan etkilenen insan sayısının her 20 yılda bir, 2'ye katlanarak artacağı öngörülmektedir (Prince ve diğerleri 2015).

2.1.3. Risk faktörleri

AH için temel risk faktörü olarak yaş görülmektedir. Bunun yanında, genetik yatkınlık, vücut-kitle indeksi yüksekliği, diyabet, tansiyon yüksekliği, sigara bağımlılığı ve serebrovasküler

hastalıklar gibi vasküler faktörler; düşük eğitim düzeyi, zihinsel, sosyal ve fiziksel aktivite yönünden fakir yaşam tarzı gibi psikososyal faktörler; vitamin B12, folat ve antioksidanlardan fakir beslenme; toksinler ve elektromanyetik alanlara mesleki maruziyet, travmatik kafa yaralanmaları, hormon replasman tedavisi ile depresyon gibi faktörler de AH hastalığı için risk faktörü kabul edilmektedir (Blennow ve diğerleri 2006; Qiu ve diğerleri 2022; Querfurth ve LaFerla, 2010).

2.1.4. Genetik etiyoloji

AH büyük oranda sporadik bir temelde ortaya çıkarken, düşük oranda ailesel kaynaklıdır. Ailesel kaynaklı AH'nın, presenilin 1 (*PSEN1*), presenilin 2 (*PSEN2*) ve amiloit öncü proteini (amyloid precursor protein, *APP*) genlerinde ortaya çıkan mutasyonlar sonucu oluştuğu; sporadik kaynaklı AH'dan ise büyük oranda apolipoprotein E (*APOE*) ϵ 4 alelinin sorumlu olduğu, ancak çevresel faktörlerin de rol oynadığı bir mekanizmayla ortaya çıktığı gösterilmiştir (Blennow ve diğerleri 2006; Qiu ve diğerleri 2022).

2.1.5. Patolojik bulgular

Multifaktöryel ve progresif bir nörodejeneratif hastalık olan AH'nın patofizyolojisi son derece karışıktır ve henüz tamamen aydınlatılamamıştır. Ancak yaşlanmış beyinde yanlış katlanmış proteinlerin zamanla birikmesi sonucu oluşan protein agregasyonu, mitokondriyal disfonksiyon sonucu oluşan serbest radikaller, intranöronal düzeyde aşırı metal birikimi, beyaz ve gri cevher lezyonları, inme ve iskemik rahatsızlıkların enflamatuvar ve oksidatif stresle karakterize sinaptik disfonksiyona ve bilişsel süreçlerde bozulmaya neden olduğu düşünülmektedir (Bush, 2013; Duyckaerts ve diğerleri 2009; Y. Li ve diğerleri 2017; Querfurth ve LaFerla, 2010). Gri cevherde " β -amiloit peptit ($A\beta$)" olarak adlandırılan senil plaklar ve tau proteinin hiperfosforile formu olan nörofibril yumaklar, AH'nın ayırt edici belirteçleridir (Gouras ve diğerleri 2015; Querfurth ve LaFerla, 2010).

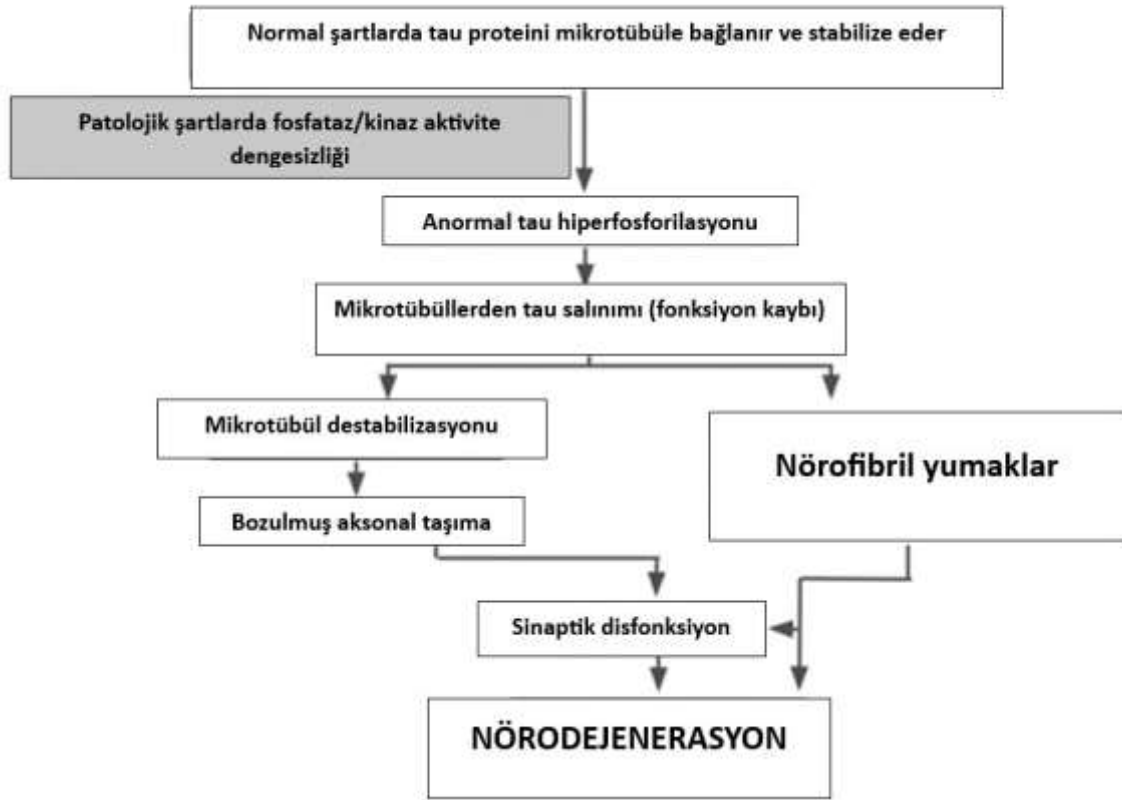
AH patolojisini açıklamada ilk ortaya çıkan hipotez, kolinerjik hipotezdir ve beyinde asetilkolin (ACh) içeren nöronlardaki işlev bozukluklarının ilerleyen yaş ve AH hastalarında gözlenen bilişsel gerilemeye katkı sunduğu öne sürülmüştür (Terry ve Buccafusco, 2003). Alzheimer hastalarının bazal ön beyinindeki kolinerjik nöronlarda meydana gelen kayıp ve

ACh seviyelerindeki düşüşün AChE, BChE, asetilkolin transferaz (ChAT) aktiviteleri ile ilgili olduğu vurgulanmıştır (Francis ve diğerleri 1999).

AH'nın patolojisini açıklamada geçerli bir diğer hipotez ise amiloit kaskad teorisi. Genel olarak A β plakların üretimi ve atılımı arasındaki dengesizlik sonucu oluştuğu, örneğin ailesel AH'da artmış A β üretimi, sporadik AH'da ise azalmış A β atılımının görüldüğü ifade edilmiştir (Blennow ve diğerleri 2006; Gouras ve diğerleri 2015; Paroni ve diğerleri 2019).

Tau patolojisinin ise yavaş geliştiği ve nörofibril yumaklar halinde nöron gövdesinde, nörofibril iplik halinde dentritlerde ve senil plak halinde aksonlarda gözlenebildiği vurgulanmıştır (Dugger ve Dickson, 2017; Duyckaerts ve diğerleri 2009; Querfurth ve LaFerla, 2010).

AH'nda nörofibriler dejenerasyona yol açan faktörlerin (Şekil 2.1.), patolojik koşullar altında kinaz ve fosfataz aktivitelerinde bir dengesizlik sonucu tau proteininin anormal hiperfosforilasyonu ile ortaya çıktığı kabul edilmektedir. Nörofibril yumaklar, bağlanmamış tau proteinlerinin birikmesi, ayrıca hiperfosforile tau proteininin salınmasıyla kararsız hale gelen mikrotübüllerin sinaptik işlev bozukluğu ve dejenerasyona sebep olmasıyla oluşabilmektedir. Sonuç olarak, hiperfosforile ve/veya kümelenmiş tau türlerinin nörotoksik etkilere sahip olduğu vurgulanmıştır (Klafki ve diğerleri 2006).



Şekil 2.1. AH’nda nörofibriler dejenerasyona yol açan mekanizma (Klafki ve diğerleri 2016’dan Türkçe’ye çevrilmiştir)

Tespit edilen bir diğer patoloji, özellikle bakır, çinko, alüminyum ve demir gibi geçiş metallere A β plaklarda birikip, beyin homeostazını bozarak AH’na sebebiyet vermesidir. Metal dengesinde meydana gelen bozulmalar genellikle yüksek protein agregasyonu, MSS’nde azalan enzimatik aktivite ve oksidatif stresle ilişkili olarak nörotoksositeye yol açmaktadır (Bush, 2013; Das ve diğerleri 2021; Y. Li ve diğerleri 2017).

Klinik açıdan AH değerlendirildiğinde ise patolojik bulgular; lezyonların tipine (yalnızca plak ve yumak ağırlıklı), nedene (genetik veya sporadik), başlangıç tipine (fokal başlangıç) ve ilişkili lezyonlara (Lewy cisimcikleri, hipokampal skleroz, vasküler lezyonlar, arjilofilik tahıl hastalığı) göre tanımlanmaktadır (Duyckaerts ve diğerleri 2009).

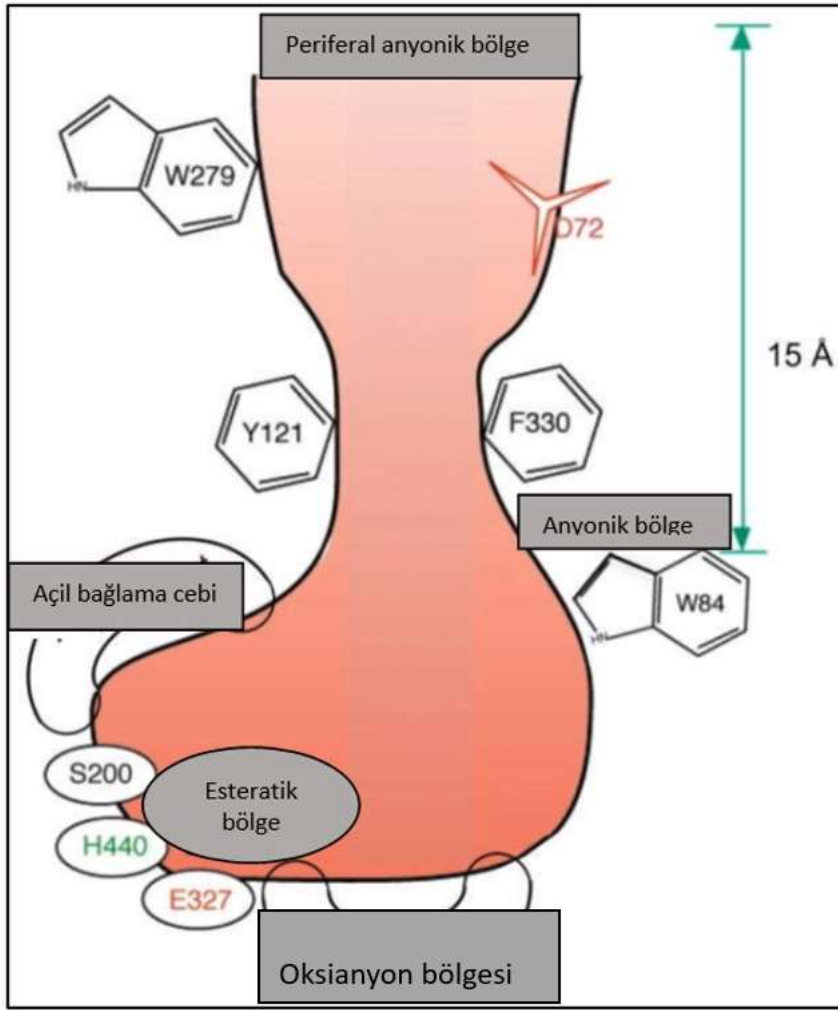
2.1.6. Tedavi yaklaşımları

AH tedavisinde klinik olarak kullanılan ilaçların çoğunun hedefinde bir nörotransmitter olan ACh’i hidroliz eden enzim olan AChE yer almaktadır. Ancak bu ilaçlar yalnızca semptomatik

tedavi sağlamaktadır (Anand ve Singh, 2013; Mangialasche ve diğeri 2010; Saxena ve Dubey, 2019). Yukarıda da bahsedildiği gibi, AH'da kolinerjik hipotezden sonra kabul gören diğeri hipotez olan amiloit kaskad hipotezi ile ilişkili mekanizma üzerinden yakın zamanda geliştirilen monoklonal antikor tedavileri bulunmakla birlikte, rivastigmin (Exelon®), donepezil (Aricept®) ve galantamin (Reminyl®) gibi kolinesteraz enzim inhibitörleri başta olmak üzere; NMDA reseptör antagonisti olan memantin (Ebixa®) klinik tedavide reçetelenen ilaç etken maddelerini oluşturmaktadır (Dou ve diğeri 2018; Guo ve diğeri 2020; Wu ve diğeri 2023). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, AChE'ı hedef alan farklı stratejiler geliştirmek ve BChE, β -sekretaz, A β , tau proteini, metallerin antioksidan özellikleri gibi diğeri hedeflere odaklanılsa da anti-Alzheimer etkili sentetik ve doğal kaynaklı moleküllerin keşfinde halen ilk *in vitro* hedef kolinesteraz inhibisyonu olarak kabul görmektedir (Darvesh, 2016; Das ve diğeri 2021; Ghosh ve Osswald, 2014; Haas, 2012; Moussa, 2017; Murray ve diğeri 2013; Panek ve diğeri 2017; Saxena ve Dubey, 2019; Singh ve diğeri 2022b; Xing ve diğeri 2021).

Kolinesteraz inhibitörleri

Kolin esterlerinin hidrolizini gerçekleştiren kolinesterazlar hidrolaz sınıfı enzimlerdir. En iyi bilinen üyesi olan AChE, kolinerjik sistemde katyonik bir nörotransmitter olan ACh'i, kolin ve asetata hidroliz etmektedir (Çat, 2019). AChE enziminde ACh hidrolizinin meydana geldiği esteratik bölge (açıl bölgesi ve kolin bağlama alt bölgesi) ve periferik anyonik bölge (periferik anionic site, PAS) olmak üzere iki aktif merkez bulunmaktadır (Şekil 2.2.). Esteratik bölgede Ser200, His440 ve Glu327 kodlu aminoasit birimlerinden oluşan katalitik üçlü yer almaktadır (Atay, 2014). Esteratik bölgede ester hidrolizi olurken, PAS'ta, AChE'nin boyun kısmında, yani A β peptit ile etkileşime girdiği yerde, ACh kuarterner amonyum atomuyla etkileşime girerek kolinerjik nöron bozulması ve plakların oluşumuna sebep olur (Pohanka, 2011).



Şekil 2.2. AChE enzimine ait temsili aktif bölge (Dvir ve diğerleri 2010'dan Türkçe'ye çevrilmiştir)

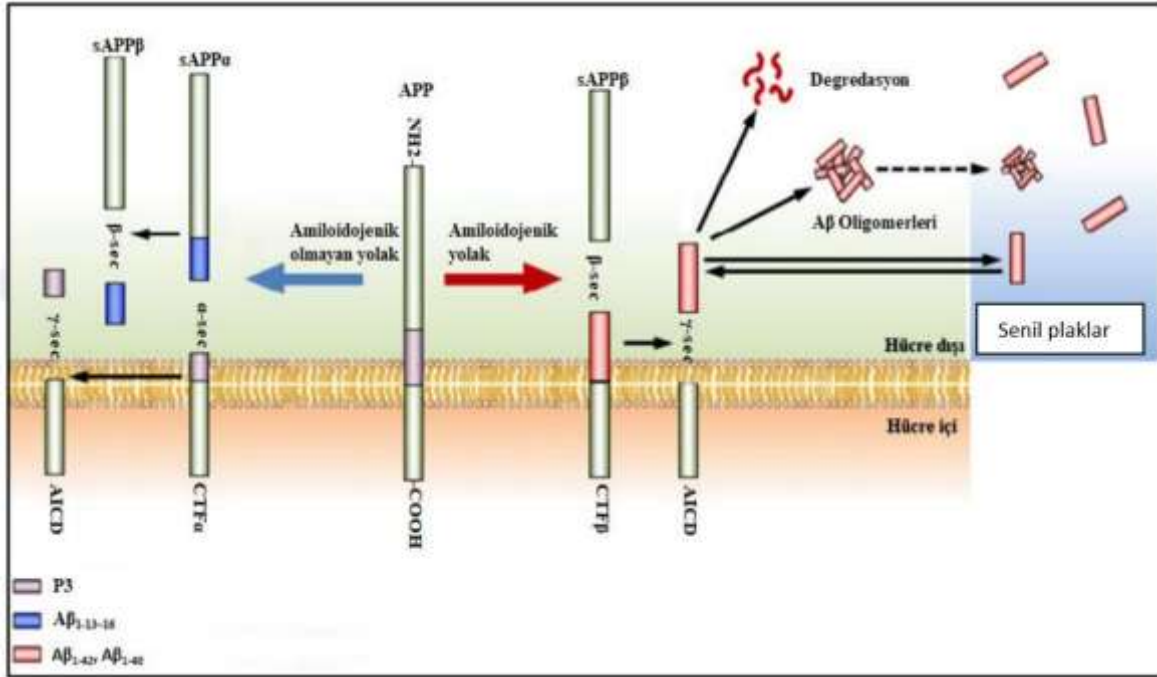
BChE, ACh'i çok daha yavaş hidroliz etmektedir ve AChE ile karşılaştırıldığında benzer bir kimyasal yapıya sahip olsalar da substrat özgüllükleri farklıdır (Masson ve Lockridge, 2010). BChE ile ilgili erken dönemde yapılan çalışmalar, bu enzimin rolü hakkında yeterli veri sağlayamamış olsa da Broomfield ve diğerlerinin (1991) BChE'nin nöronlar üzerindeki etkisini kanıtlayan çalışması büyük ilgi uyandırmıştır (Lockridge, 2015). Ayrıca, nörodejeneratif hastalıkların mekanizma çalışmalarında bir araç olması, dayanıklılığından dolayı farmasötik hedef olarak kullanılma potansiyeli ve ilerlemiş AH hastalarının beyinlerindeki plaklarda yüksek miktarda bulunmalarından dolayı ACh seviyesini artırması, BChE'ı çok yönlü bir hedef konumuna getirmiştir (Gómez-Ramos ve Moran, 1997; Q. Li ve diğerleri 2017). Dünya çapında orta şiddette ve ilerlemiş AH tedavisi için klinik onaya sahip kolinesteraz inhibitörleri rivastigmin, donepezil ve galantamindir (Scheltens ve diğerleri 2021).

NMDA reseptör antagonistleri

Glutamat, beyindeki uyarıcı nörotransmitterlerden biri olup, demans ve AH patogeneğinde özellikle rol oynayan NMDA reseptörü dahil olmak üzere, bir dizi postsinaptik reseptörü uyarır (Farber ve diğerleri 1998; Fonnum, 1984; Orrego ve Villanueva, 1993; Shimizu ve diğerleri 2000). Glutamat tarafından aşırı uyarılan NMDA reseptörünün nöronal kalsiyum aşırı yüklenmesine yol açarak, nörodejeneratif bozukluklara sebep olduğu bilinmektedir (Lipton ve Rosenberg, 1994; Reisberg ve diğerleri 2003). Non-kompetitif bir NMDA reseptör antagonisti ve AH tedavisi için onaylanmış ilaçlardan biri olan memantin ise patolojik seviyelere ulaşmış glutamatın etkisini inhibe etmesiyle AH'nda terapötik değere sahip olduğu bildirilmiştir (Danysz ve diğerleri 2000; Montemitto ve diğerleri 2017; Sani ve diğerleri 2012; Scheltens ve diğerleri 2021). Memantin Alzheimer hastalarında günlük aktivitelerini geliştirdiği, hafızayı güçlendirdiği ve farkındalığı artırdığı doğrulanmıştır (Conway, 2020; Dias ve diğerleri 2007; Parsons ve diğerleri 2007).

β -Sekretaz (BACE1) inhibisyonu

BACE1, AH'nın hücre dışı amiloit plaklarında bulunan A β peptitlerinin üretiminde yer alan kilit enzimlerden biridir. Bu enzim, transmembran APP'nin proteolizi, A β sentezi ve birikmesinde rol oynayan bir aspartik proteazdır ve AH tedavisinde umut verici bir hedeftir (Ghosh ve Osswald, 2014). APP sırasıyla BACE1 ve γ -sekretaz tarafından parçalanarak çözünür ve A β öncü proteini (*sAPP β*) ve amiloit β_{42} (A β_{42}) peptit parçasını oluşturur. A β_{42} fragmanları daha sonra birikerek, AH'nda sıkça görülen senil plakları oluşturur (Şekil 2.3.). AH'nda bu zamana kadar BACE1'i kodlayan gende henüz bir mutasyon tanımlanmamıştır, ancak APP'deki tek bir kalıntı mutasyonu, BACE1 tarafından gerçekleştirilen proteolize karşı koruma sağladığı ve bunun da AH'nda BACE1'nin rol oynadığını kanıtlar niteliktedir (Moussa, 2017). BACE1 inhibisyonu; A β birikimini engelleyerek AH'nı önleyebileceğinden, hastalığın tedavisi için olası terapötik hedef olarak kabul edilmektedir (Ghosh ve diğerleri 2012).



Şekil 2.3. APP bölünmesi, Aβ agregasyonu ve senil plakların oluşumu (Keske, 2023)

Aβ agregasyonunun inhibisyonu

Aβ üretiminin modülasyonu, Aβ-agregasyon inhibisyonu veya Aβ immünoterapisi gibi seçenekler AH tedavisinde değerli yaklaşımlar olarak kabul edilmektedir (Mo ve diğerleri 2017; Pohanka, 2011). Aβ peptitler, AChE'nin periferik anyonik bölgesi ile etkileşime girerek plak oluşumu, dolayısıyla kolinerjik nöronlarda hasara yol açar; bu bölgenin inhibisyonu da Aβ agregasyonunu önlemesi nedeniyle AH'nda bir diğer tedavi yaklaşımıdır (Gouras ve diğerleri 2015; Panek ve diğerleri 2017; Paroni ve diğerleri 2019; Pohanka, 2011). Bu sebeple, AChE'nin periferik anyonik bölgesiyle etkileşen inhibitörlerin sadece AH'nın semptomlarını değil, aynı zamanda hastalığa sebep olan faktörlerin de ortadan kaldırılmasında etkili olacağı düşünülmektedir (Pohanka, 2011).

Tau protein agregasyonu inhibisyonu

AH'nda önemli nöropatolojik bulgulardan biri de mikrotübülle ilişkili hiperfosforile tau proteinin agregasyonu sonucu oluşan nörofibril lezyonlardır (Braak ve Braak, 1991). Tau proteininin fosforillenmesi mikrotübülleri stabilize eden normal bir biyolojik süreçken, artmış fosforilasyon, taunun mikrotübüllere bağlanmasını engelleyerek faaliyet göstermesini kısıtlamaktadır (Alonso ve diğerleri 1994; Bramblett ve diğerleri 1993;

Lindwall ve Cole, 1984). Ayrıca, fosfoproteinlerin fosforilasyonundan sorumlu kinaz ve fosfataz aktivitelerindeki bir dengesizliğin, tau proteini hiperfosforilasyonu, taunun mikrotübüllerden ayrılması, aksonal taşınımın bozulması ve nihayetinde nörodejenerasyona sebep olduğu öne sürülmüştür (Mandelkowitz ve Mandelkowitz, 1998).

Diğer terapötik yaklaşımlar

Metal şelasyonunun da AH tedavisinde etkili olabileceği öngörülmektedir (Das ve diğerleri 2021; Singh ve diğerleri 2022b). Ayrıca, antioksidan, anti-enflamatuvar ilaçların kronik kullanımı, mitokondriyal hasardan koruyucu yaklaşımlar ve hormon terapisi gibi seçenekler AH'nın ilerlemesini yavaşlatabilir. Ancak bu yaklaşımlar ile hastalığın tedavisinde bu zamana kadar tatmin edici bir sonuç sağlanamamıştır (Huang ve Mucke, 2012).

2.2. Fenolik Bileşikler

2.2.1. Genel özellikler

Bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin genellikle parazit, patojen saldırılarına ve ultraviyole radyasyona karşı savunma amacıyla üretildikleri bildirilmiştir (Dai ve Mumper, 2010). Fenolik bileşikler diyetimizin önemli bir parçasını oluşturmaktadır ve bu bileşiklerce zengin en önemli bitkisel diyet kaynakları; koyu renkli meyveler, sebzeler, baharatlar, sert kabuklu yemişler ve tohumlar olarak sıralanabilir (Anantharaju ve diğerleri 2016; Pérez-Jiménez ve diğerleri 2010). Fenolik bileşikler yönünden zengin beslenmenin kanser, diyabet, inme, cilt rahatsızlıkları, yaşlanma, kardiyovasküler hastalıklar ve özellikle oksidatif stresle bağlantılı hastalıkların önlenmesinde rol oynadığı epidemiyolojik çalışmalarla bildirilmiştir (Anantharaju ve diğerleri 2016; Crozier ve diğerleri 2009; Dai ve Mumper, 2010; De Souza ve diğerleri 2017; Dziatko ve diğerleri 2016; Jacobo-Velázquez ve Cisneros-Zevallos, 2017; Lin ve diğerleri 2016; Núñez-Sánchez ve diğerleri 2015; Parkinson ve Cicerale, 2016). Bunun yanında fenolik bileşiklerin dikkate değer nöroprotektif etkileri sayesinde nöroenflamasyon, AH, PH ve HH, ALS, iskemi, depresyon, epilepsi, beyin hasarı sonrası oluşan denge kaybı, görme ve işitme bozuklukları gibi birçok hastalıkta pozitif etkileri bulunmaktadır (Bhatt ve diğerleri 2015; Brezani ve diğerleri 2018; Cao ve diğerleri 2017;

Chen ve diğeri 2016; Coelho ve diğeri 2015; Daccache ve diğeri 2011; Farbood ve diğeri 2015; Hur ve diğeri 2001; Khatri ve Juvekar, 2016; Moghadas ve diğeri 2016; Moghaddam ve Zare, 2018; Ojha ve diğeri 2015; Pasban-Aliabadi ve diğeri 2013; St-Laurent-Thibault ve diğeri 2011; Szwajgier ve diğeri 2017; Weinreb ve diğeri 2004; Zeng ve diğeri 2011).

2.2.2. Biyosentez ve sınıflandırma

Fenolik bileşikler bir veya daha fazla aromatik halkaya, bir veya daha fazla hidroksil grubunun bağlanmasıyla oluşur (Dai ve Mumper, 2010). Fenolik bileşikler bitkilerde bulunan en önemli ve geniş sekonder metabolit gruplarından biridir ve birçok alt kimyasal grubu da içermektedir (Alu'datt ve diğeri 2017; Dai ve Mumper, 2010).

Bitkilerde fenolik asitlerin biyosentezi tirozin ve/veya fenilalanin adlı aromatik aminoasitlerin şikimat/fenilpropanoit yoluyla ve deaminasyon, hidroksilasyon ve metilasyon olmak üzere üç farklı yoldan gerçekleşebilir (Cheynier ve diğeri 2013; Maeda ve Dudareva, 2012). Kısaca, tirozin ve fenilalaninin deaminasyonu ile *p*-kumarik asit ve sinamik asit oluşur; etil zincirinin ayrılması ile de benzoik asit (C₆-C₁) oluşur. Tüm fenolik asitler yapısal olarak benzoik asit veya sinamik asitin hidroksillenmiş türevleridir (Al Jitan ve diğeri 2018).

Bugüne kadar bitkiler aleminde tanımlanan ve çeşitli kaynaklara göre yaklaşık sayısı 8000'den fazla olduğu bilinen fenolik bileşikler kimyasal yapılarına göre; başlıca flavonoidler, fenolik asitler, tanenler, lignanlar ve stilbenler olarak sınıflandırılabilir (Dai ve Mumper, 2010; Del Rio ve diğeri 2013). En yaygın polifenol olan flavonoid yapısı ise, 15 karbon atomundan ve A, B ve C olarak adlandırılan 3 halkadan (C₆-C₃-C₆) meydana gelen flavan çekirdeğinden oluşur ve C halkasında bulunan karbon atomu oksidasyon durumuna göre 6 ana alt gruba ayrılır: flavonlar, izoflavonlar, flavanoller, flavanonlar, flavonoller ve antosiyaninler (Dai ve Mumper, 2010).

2.2.3. İzolasyon

Fenolik bileşiklerin izolasyonu ve yapı aydınlatması için ekstraksiyon ilk ve önemli bir adımdır ve elde edilmek istenen fenolik bileşiğe göre farklı yöntem ve çözücüler kullanılmalıdır (Ignat ve diğerleri 2011). Fenolik bileşiklerde kullanılan ekstraksiyon yöntemleri; katı-sıvı ekstraksiyonu, sıvı-sıvı ekstraksiyonu, süper kritik akışkan ekstraksiyonu ve diğer ekstraksiyon metotları olmak üzere sınıflandırılabilir (Baydar ve diğerleri 2004; Bleve ve diğerleri 2008; Bucić-Kojić ve diğerleri 2007; Cong-Cong ve diğerleri 2017; Fredj ve Francois, 1990; Nahar ve Sarker, 2012; Palma ve Taylor, 1999). Basıncılı sıvı ekstraksiyonu, mikrodalga destekli ekstraksiyon, ultrason destekli ekstraksiyon da fenoliklerin elde edilmesinde kullanılan diğer ekstraksiyon yöntemleridir (Cong-Cong ve diğerleri 2017; Ignat ve diğerleri 2011; Yaman ve Kuleaşan, 2016).

2.2.4. Kan beyin bariyeri geçebilme özellikleri

Biyoaktif bileşiklerin MSS'de nöroprotektif etkinliği, kan beyin bariyeri (KBB) gibi fiziksel bir engel nedeniyle sınırlıdır. Bu nedenle, iyi terapötik etkinliğe sahip birçok ilaç, düşük KBB geçirgenliği ve hedef beyin bölgesine ulaşabilen düşük terapötik konsantrasyonları nedeniyle nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde sınırlı etkiye sahiptir. Lipofiliklik, moleküler ağırlık, hidrojen donörü veya alıcısı olmak gibi çeşitli moleküler parametreler bileşiklerin KBB geçişini etkilemektedir (Sánchez-Martínez ve diğerleri 2022). Örneğin, Yang ve diğerleri (2023), flavonoidlerde hidrosil ve glikozit grupları arttıkça KBB gibi hidrofobik bir bariyerden geçişin azaldığı, dolayısıyla yüksek molekül ağırlığına sahip bileşiklerin bu geçişte dezavantaj oluşturduğunu tespit etmiştir. Birçok araştırma, fenolik bileşiklerin çoğunun KBB'ni geçebildiğini ve nöronal dejenerasyonu önleyebildiğini doğrulamıştır. Tez gereçlerimizi oluşturan fenolik bileşiklerin çoğunun KBB'ni geçebildiğine dair veriler literatürde bildirilmiştir (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Bazı fenolik bileşiklerin KBB'ni geçebilme özellikleri

Fenolik Bileşikler	KBB geçebilme özelliği	Referanslar
Gallik asit	Evet	(Feng ve diğerleri 2023)
Sirinjik asit	Evet	(Sánchez-Martínez ve diğerleri 2022)
Vanilik asit	Zayıf	(Sánchez-Martínez ve diğerleri 2022)
D-(-)-Kinik asit	Evet	(Sánchez-Martínez ve diğerleri 2022)
Elajik asit	Evet	(Sánchez-Martínez ve diğerleri 2022)
Kafeik asit	Evet	(Feng ve diğerleri 2023)
<i>p</i> -Kumarik asit	Zayıf	(Sánchez-Martínez ve diğerleri 2022)
<i>Trans</i> -Ferulik asit	Evet	(Feng ve diğerleri 2023)
Klorojenik asit	Evet	(Lee ve diğerleri 2021)
Rozmarinik asit	Evet	(Sánchez-Martínez ve diğerleri 2022)
<i>p</i> -Tirozol	Evet	(Gallardo-Fernandez ve diğerleri 2024)
3-Hidroksitirozol	Evet	(Gallardo-Fernandez ve diğerleri 2024)
Oleuropein	Evet	(R. Singh ve diğerleri 2023)
Apigenin	Evet	(Yang ve diğerleri 2014)
Luteolin	Evet	(Sawmiller ve diğerleri 2014)
Tangeretin	Evet	(Datla ve diğerleri 2001)
Trisin	Evet	(Jiang ve diğerleri 2012)
İzokersitrin	Zayıf	(Sánchez-Martínez ve diğerleri 2022)
Orientin	Zayıf	(Lam ve diğerleri 2016)
Viteksin	Evet	(Lima ve diğerleri 2018)
Hiperozit	Evet	(Song ve diğerleri 2023)
Fisetin	Evet	(He ve diğerleri 2018)
Kemferol	Evet	(Yang ve diğerleri 2014)
Kersetin	Evet	(Feng ve diğerleri 2023)
Mirisetin	Evet	(C. Wang ve diğerleri 2023)
Morin	Evet	(Khamchai ve diğerleri 2020)
Hesperetin	Evet	(Feng ve diğerleri 2023)
Naringin	Evet	(Jäger ve Saaby, 2011)
Taksifolin	Zayıf	(Inoue ve diğerleri 2019)
EGCG	Evet	(Feng ve diğerleri 2023)
Kateşin	Evet	(Jäger ve Saaby, 2011)
Daidzein	Evet	(Jäger ve Saaby, 2011)
Genistein	Evet	(Feng ve diğerleri 2023), (Jäger ve Saaby, 2011)
<i>Trans</i> -Resveratrol	Evet	(Feng ve diğerleri 2023), (Rege ve diğerleri 2014)
Pelargonidin	Evet	(Feng ve diğerleri 2023), (Jäger ve Saaby, 2011)
Amentoflavon	Evet	(Jäger ve Saaby, 2011)

2.3. Bitkisel Kaynaklı Fenolik Bileşiklerin Nöroprotektif Etkileri

2.3.1. Fenolik bileşikler ile yapılan AChE, BChE ve BACE1 enzim inhibisyonuna ait çalışmalar

Başta tıbbi ve aromatik bitkiler olmak üzere, doğal kaynaklardan elde edilen moleküller, AH'nın tedavisinde etkin ve düşük yan etki profili ile sentetik kolinesteraz inhibitörlerine umut verici bir alternatif olmuştur. Ancak kolinesteraz inhibitörü olan doğal moleküllerin çoğu (fizostigmin ve galantamin gibi) alkaloid sınıfından ve klinikte de kullanımı olan bileşikler olup, kolinesteraz inhibisyon potansiyeline sahip fenolik bileşikler ise daha geri planda kalmıştır. Bu nedenle etkin ve güvenilir AH tedavisi için doğal kaynaklara, özellikle fenolik bileşiklere olan ilgi oldukça artmış olup, bu alanda çok sayıda araştırma yapılmaktadır (Tamfu ve diğerleri 2021).

Örneğin, *Rosmarinus officinalis* L.'den (biberiye) elde edilen ekstraların, uçucu yağının ve rozmarinik asitin kolinesteraz inhibisyonunun değerlendirildiği bir çalışmada, rozmarinik asitin 1 mg/mL konsantrasyonda % $85,8 \pm 1,31$ BChE inhibisyonu ile referans ilaç olarak kullanılan galantaminden de (% $80,3 \pm 1,14$) yüksek inhibisyon gösterdiği bulunmuştur (Orhan ve diğerleri 2008). Bu değerler AChE inhibisyonu için % $47,3 \pm 1,05$ (galantamin/referans ilaç= % $99,8 \pm 0,31$) olarak bulunmuştur. Ancak bitkinin ekstraları 1 mg/mL konsantrasyonda AChE inhibisyonu göstermemiştir.

Ülkemizde genel olarak halk arasında "adaçayı" olarak bilinen *Salvia* türlerinin AH'ya karşı potansiyelini araştırmak üzere sekonder metabolitlerinin enzim inhibisyonunu değerlendiren bir çalışmada, 10 µg/mL dozda rozmarinik asitin AChE ve BChE'yi sırasıyla % $20,18 \pm 0,21$ ve % $42,76 \pm 0,32$ inhibe ederken, referans ilaç olarak kullanılan galantaminin % $76,08 \pm 0,39$ ve % $67,52 \pm 0,41$ oranda inhibe ettiği bulunmuştur (Kocakaya ve diğerleri 2020).

Paudel ve diğerlerinin (2020) yaptığı çalışmada, kafeik asit türevlerinin yapı-aktivite ilişkisi incelendiğinde hidroksil gruplarının BACE1 inhibisyonunu artırdığı ve kafeik asit ile ($IC_{50} = >$

200 µM) kıyaslandığında rozmarinik asitin BACE1 enzimini $IC_{50} = 29,77 \pm 0,70$ µM değeri ile daha güçlü inhibe ettiği tespit edilmiştir.

2020'de yapılan bir çalışmada (Nazir ve diğerleri 2020), gallik asit, klorojenik asit ve elajik asitin AChE ve BChE inhibisyon değerleri hesaplanmış ve referans ilaç olarak donepezil kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre, klorojenik asite ait AChE ve BChE inhibisyonu IC_{50} değerleri sırasıyla 31 µg/mL ve 32 µg/mL ile donepezile ($IC_{50} = 25$ µg/mL - 26 µg/mL) en yakın değer olarak kaydedilmiştir. Gallik asit ve elajik asite ait AChE ve BChE IC_{50} değerleri ise sırasıyla, 45 µg/mL - 83 µg/mL ve 59 µg/mL - 62 µg/mL olarak bildirilmiştir.

Omar ve diğerlerinin (2018a) çalışmasında, *Olea europaea* L. (zeytin) biyofenollerinden birisi olan kersetinin, BChE ($IC_{50} = 19,08$ µM) ve AChE ($IC_{50} = 55,44$ µM) enzimlerini dikkate değer şekilde inhibe ettiği ve referans ilaç olarak kullanılan galantamin için bu değerlerin sırasıyla $5,48 \pm 0,007$ µM ve $0,59 \pm 0,004$ µM olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada kersetin ve referans inhibitör epigallokateşin gallatın (EGCG) BACE1 inhibitör etkisi sırasıyla $IC_{50} = 0,55 \pm 0,24$ µM ve $IC_{50} = 96,26 \pm 0,04$ µM olarak kaydedilmiştir. Bu çalışmada, hidroksitirozol ($IC_{50} = 0,035 \pm 0,04$ µM) güçlü BACE1 inhibisyonu gösterirken, onu luteolin ($IC_{50} = 0,52 \pm 0,28$ µM), oleuropein ($IC_{50} = 2,76 \pm 0,23$ µM) ve kafeik asit ($IC_{50} = 16,67 \pm 0,03$ µM) takip etmiştir. 2018 yılında yapılan başka bir çalışmada (Cheng, 2018), kersetin $IC_{50} = 24,57$ µM BACE1 inhibisyonu ile referans inhibitör EGCG'ye ($IC_{50} = 13,13$ µM) yakın aktivite göstermiştir. Aynı çalışmada test edilen diğer fenolik bileşikler için BACE1 inhibisyonları sırasıyla; izokersitrin ($IC_{50} = 17,68$ µM), taksifolin ($IC_{50} = 25,28$ µM), morin ($IC_{50} = 31,42$ µM), fisetin ($IC_{50} = 33,8$ µM), mirisetin ($IC_{50} = 42,76$ µM), luteolin ($IC_{50} = 56,99$ µM), kemferol ($IC_{50} = 57,23$ µM), daidzein ($IC_{50} = 152,43$ µM), genistein ($IC_{50} = 201,86$ µM) ve kateşin ($IC_{50} = 448,95$ µM) olarak bildirilmiştir.

Birleşik Krallık'ta yapılan bir çalışmada (Okello ve Mather, 2020), referans ilaç olan galantaminin ($IC_{50} = 0,0004$ µmol/mL) AChE inhibe etme gücünün EGCG'ye ($IC_{50} = 0,014$ µmol/mL) göre 31,8 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada, BChE inhibisyonu için galantamin ($IC_{50} = 0,01$ µmol/mL) EGCG'ye ($IC_{50} = 0,025$ µmol/mL) göre 2,51 kat daha güçlü bulunmuş ve AChE inhibisyonuna göre daha düşük bulunan bu fark, galantaminin BChE'ye olan daha düşük afinitesiyle açıklanmıştır.

Nugroho ve diğerlerinin (2017) AChE inhibisyonunu *in vitro* olarak tayin ettiği çalışmada, referans inhibitör olarak kullanılan berberin $IC_{50}= 0,33 \mu\text{g/mL}$ inhibisyon değeri gösterirken, test edilen bileşikler arasında en güçlü inhibitörler, kafeik asit ($IC_{50}= 1,05 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$) ve kersetin ($IC_{50}= 3,58 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$) olarak bildirilmiştir. Test edilen diğer bileşiklerin AChE inhibisyonları açısından sıralaması; *p*-kumarik asit ($IC_{50}= 18,73 \pm 1,07 \mu\text{g/mL}$), kemferol ($IC_{50}= 22,50 \pm 0,83 \mu\text{g/mL}$), hidroksitirozol ($IC_{50}= 56,36 \pm 0,41 \mu\text{g/mL}$) ve sirinjik asit ($IC_{50}= > 100 \mu\text{g/mL}$) olarak kaydedilmiştir.

Güney Kore’de birçok flavonoitin AChE inhibitör aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada pozitif kontrol olarak takrin ($IC_{50}= 0,81 \mu\text{M}$) ve EGCG ($IC_{50}= 8,14 \mu\text{M}$) kullanılmıştır. Test edilen flavonoidler arasında referans inhibitörlere en yakın aktiviteyi $40,29 \mu\text{M}$ IC_{50} değeri ile taksifolin göstermiştir. Diğer flavonoidlere ait IC_{50} değerleri sırasıyla kersetin için $51,22 \mu\text{M}$, mirisetin için $59,33 \mu\text{M}$, morin için $60,25 \mu\text{M}$, luteolin için $79,53 \mu\text{M}$, fisetin için $85,76 \mu\text{M}$, kemferol için $151,50 \mu\text{M}$, genistein için $152,86 \mu\text{M}$, naringin için $154,33 \mu\text{M}$, daidzein için $159,88 \mu\text{M}$ ve kateşin için $413,44 \mu\text{M}$ olarak bildirilmiştir (Cheng, 2018).

Pan ve diğerlerinin (2014) resveratrol ve türevlerinin kolinesterazları inhibe etme potansiyelini araştırdığı çalışmada, siklik amin grubu eklenerek elde edilen türevin AChE ve BChE inhibitör aktivitesinin (sırasıyla $IC_{50}= 6,55 \pm 0,16 \mu\text{M}$ ve $8,04 \pm 0,22 \mu\text{M}$) resveratrole göre (sırasıyla $IC_{50}= 165,24 \pm 48 \mu\text{M}$ ve $752,46 \pm 87 \mu\text{M}$) oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir. Resveratrol türevinin BChE inhibitör aktivitesi, referans olarak kullanılan galantaminden de ($IC_{50}= 13,61 \pm 0,28 \mu\text{M}$) yüksek bulunmuştur.

Bazı fenolik bileşiklerin BACE1 inhibitör etkilerinin incelendiği bir çalışmada, en yüksek inhibitör etkiyi luteolin ($IC_{50}= 0,5 \mu\text{M}$) göstermiştir. Diğer bileşiklere ait IC_{50} değerleri ise sırasıyla, rozmarinik asit için $21 \mu\text{M}$, resveratrol için $28 \mu\text{M}$, *p*-kumarik asit için $90 \mu\text{M}$ ve gallik asit için $>90 \mu\text{M}$ olarak bildirilmiştir (Bhattacharjee, 2020).

2017’de yapılan bir çalışmada, taksifolin adlı flavonoitin AChE inhibisyon potansiyeli *in vitro* yöntemle araştırılmış ve $16,42 \pm 0,48 \mu\text{g/mL}$ IC_{50} değeri ile bileşiğin referans ilaç donepezilden ($IC_{50}= 22,00 \pm 0,56 \mu\text{g/mL}$) daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Kuppusamy ve diğerleri 2017).

Fys ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada (Fys ve diğerleri 2017), naringin, vanilik asit ve kateşin gibi fenolik bileşiklerin kolinesteraz inhibitör etkileri araştırılmış, referans ilaç olarak galantamin ve ezerin (fizostigmin) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, galantaminin AChE ve BChE inhibisyon değerleri sırasıyla $IC_{50} = 99,8 \pm 0,31 \mu M$ ve $IC_{50} = 75,5 \pm 1,1 \mu M$ olarak tespit edilirken, ezerin için bu değerler sırasıyla $IC_{50} = 0,04 \pm 0,0001 \mu M$ ve $IC_{50} = 0,82 \pm 0,001 \mu M$ olarak saptanmıştır. Naringin, vanilik asit ve kateşinin ise her iki enzim üzerinde de inhibisyon göstermediği tespit edilmiştir.

Citrus flavanonlarının kolinesteraz ve BACE1 enzim inhibitör aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada, hesperetin ve naringenin için AChE, BChE ve BACE1 inhibitör aktivite IC_{50} değerleri, sırasıyla hesperetin için $45,70 \pm 2,69 \mu M$; $>100 \mu M$; $22,13 \pm 1,81 \mu M$ ve naringenin için $42,66 \pm 4,30 \mu M$; $>100 \mu M$; $30,31 \pm 2,06 \mu M$ olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada referans ilaç olarak galantamin (AChE- $IC_{50} = 1,59 \pm 0,03 \mu M$; BChE- $IC_{50} = 10,93 \pm 0,69 \mu M$) ve resveratrol (BACE1- $IC_{50} = 14,59 \pm 0,79 \mu M$) kullanılmıştır (Lee ve diğerleri 2018).

Choi ve diğerlerinin (2014a) çalışmasında, viteksin ve apigeninin AChE ve BACE1 enzim inhibisyonu değerlendirilmiş ve viteksinin (AChE- $IC_{50} = 12,16 \pm 3,58 \mu M$; BACE1- $IC_{50} = 51,07 \pm 3,31 \mu M$) apigenine (AChE- $IC_{50} = 34,43 \pm 2,41 \mu M$; BACE1- $IC_{50} = >100 \mu M$) göre daha güçlü enzim inhibisyonu gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen sonuç, bileşiklerin farklı pozisyondaki C-glikozilasyonuna bağlanmıştır. Choi ve diğerleri (2014b) tarafından yapılan diğer çalışmada, luteolin ve glikozillenmiş türevi orientin de araştırılmış ve luteolinin (AChE- $IC_{50} = 9,27 \pm 0,73 \mu M$; BChE= $9,60 \pm 0,11$; BACE1- $IC_{50} = 1,95 \pm 0,02 \mu M$) orientine (AChE- $IC_{50} = 20,06 \pm 0,64$; BChE= $11,05 \pm 1,43$; BACE1- $IC_{50} = 15,95 \pm 0,54 \mu M$) göre daha güçlü inhibisyon gösterdiği bildirilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların yanında, luteolinin tıbbi bitkilerde yaygın bulunan bir bileşik olması ve nispeten kolay ekstraksiyonu nedeniyle AH tedavisinde potansiyel bir inhibitör olabileceği vurgulanmıştır.

2021 yılında yapılan bir çalışmada, *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi çiçeklerinden elde edilen ve bir izoflavon türevi olan glisiteinin nöroprotektif etkisi *in vitro* yöntemle incelenmiştir (Prajapati ve diğerleri 2021). Çalışmanın sonuçlarına göre, glisiteinin AChE, BChE ve BACE1 enzim inhibisyonuna ait IC_{50} değerleri sırasıyla $142,98 \pm 10,02 \mu M$; $69,40 \pm 3,24 \mu M$ ve $59,46 \pm 3,94 \mu M$ olarak bildirilmiştir.

Hiperozit (kersetin 3- β -D-galaktozit) ve izokersitrinin *in vitro* AChE inhibisyon aktivitesinin referans ilaç olan galantamine karşı ölçüldüğü bir çalışmada, galantaminin IC₅₀ değeri 0,21 μ g/mL hesaplanırken, adıgeçen bileşikler için IC₅₀ değerleri sırasıyla, 86 μ g/mL ve 66 μ g/mL olarak hesaplanmıştır (Hernandez ve diğerleri 2010).

2.3.2. Fenolik bileşikler ile yapılan antioksidan aktivite çalışmaları

Fenolik bileşikler, iyonları şelatlayarak ve özellikle süperoksit, peroksil ve hidroksil gibi serbest radikalleri temizleyerek antioksidan görevi görür (Rani ve diğerleri 2018). Antioksidanların, AH ile ilişkili nöroenflamasyonu azaltarak nöroprotektif etki sağladığı ve bilişi güçlendirdiği düşünülmektedir (Sinyor ve diğerleri 2020).

Nenadis ve arkadaşlarının, 2002 ve 2004 yıllarında birçok fenolik bileşiğin antioksidan kapasitesini DPPH radikal süpürme yöntemiyle ölçtüğü çalışmasında, 20 dakikalık reaksiyon süresi ve % 60-80 inhibisyon değerini sağlayan molar oran seçilerek analitik protokol oluşturulmuştur (Nenadis ve Tsimidou, 2002; Nenadis ve diğerleri 2004). Elde edilen sonuçlara göre, gallik asit (% 96,3 \pm 0,4), rozmarinik asit (% 88,4 \pm 0,4), kafeik asit (% 76,6 \pm 0,5), kersetin (% 68,2 \pm 1,0) ve hidroksitirozol (% 57,0 \pm 0,2) referans olarak kullanılan trolokstan (% 53,4 \pm 1,2) daha güçlü etki göstermiştir. Test edilen diğer bileşiklerin serbest radikal süpürücü etkisi sıralaması; klorojenik asit (% 52,0 \pm 0,6), morin (% 43,2 \pm 0,8), oleuropein (% 41,3 \pm 0,2), *trans*-ferulik asit (% 30,9 \pm 2,9), *p*-kumarik asit (% 3,6 \pm 0,4) ve tirozol (% 2,7 \pm 0,3) olarak bildirilmiştir.

Nazir ve diğerlerinin (2020) çalışmasında, elajik asit, gallik asit ve klorojenik asitin DPPH aktivitesini referans olarak kullanılan askorbik asite (IC₅₀= 29 μ g/mL) karşı değerlendirmiş ve en güçlü aktiviteyi IC₅₀= 39 μ g/mL değeri ile klorojenik asit göstermiştir. Elajik asit ve gallik asitin IC₅₀ değerleri ise sırasıyla 39 μ g/mL ve 52 μ g/mL olarak bildirilmiştir. Yine askorbik asitin (IC₅₀= 58,19 μ M) referans olarak kullanıldığı başka bir çalışmada, luteolinin (IC₅₀: 67,14 μ M) antioksidan aktivitesi, referans bileşiğe en yakın değer olarak kaydedilmiştir. Çalışmada test edilen fisetin, izokersitrin, kersetin ve kemferol bileşiklerinin IC₅₀ değerleri ise sırasıyla 96,10 μ M; 123,23 μ M; 123,47 μ M ve 203,81 μ M olarak bildirilmiştir (Jang, 2015).

2018'de yapılan bir çalışmada, *Tenebrio molitor* adlı solucanın yetişkin bireylerinden izole edilen bazı bileşikler, bunlara karşılık gelen organik saf bileşikler ve pozitif kontrol olarak askorbik asit, bütilhidroksitoluen (BHT) ve EGCG gibi ticari olarak temin edilebilen antioksidanların aktivitesi DPPH radikal süpürme yöntemi ile değerlendirilmiştir. Test edilen bileşikler arasında izokersitrin (IC_{50} : 3,54 μ M), referans olarak kullanılan askorbik asitten (IC_{50} : 142,08 μ M) çok daha güçlü etki gösterirken, diğer bileşiklerin antioksidan aktiviteleri sırasıyla fisetin (IC_{50} : 5,53 μ M), kemferol (IC_{50} : 5,80 μ M), luteolin (IC_{50} : 7,72 μ M), kersetin (IC_{50} : 8,03 μ M), taksifolin (IC_{50} : 25,88 μ M), morin (IC_{50} : 35,87 μ M), mirisetin (IC_{50} : 98,45 μ M), kateşin (IC_{50} : 184,74 μ M), EGCG (IC_{50} : 208,67 μ M), genistein (IC_{50} : 214,35 μ M) ve daidzein (IC_{50} : 247,94 μ M) olarak tespit edilmiştir (Cheng, 2018).

Morus alba L. bitkisinin biyoaktivite potansiyelini araştıran bir çalışmada, DPPH radikal süpürme yöntemiyle ölçülen antioksidan aktivitenin, bitki tohumlarında, referans olarak kullanılan askorbik asit (IC_{50} : 31,5 M) ve tokoferolden (IC_{50} : 52,3 M) daha güçlü olduğu; bu etkinin içeriğindeki rutin (IC_{50} : 20,2 M), izokersitrin (IC_{50} : 22,5 M), kersitrin (IC_{50} : 24,6 M), kersetin (IC_{50} : 27,8 M), dihidrokersetin (IC_{50} : 28,9 M) ve klorojenik asitten (IC_{50} : 30,6 M) kaynaklandığı bildirilmiştir (Vishwakarma ve diğerleri 2022).

Fenolik bileşiklerin DPPH radikal süpürme yöntemiyle antioksidan özellikleri benzer çalışmalarla değerlendirilmiş ve bazı çalışmaların sonuçları Çizelge 2.2.'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. DPPH radikal süpürme yöntemiyle fenolik bileşikler üzerinde yapılan antioksidan aktivite çalışmalarına örnekler

Fenolik bileşikler	DPPH radikal süpürücü etki (IC ₅₀)	Referans bileşik	Kaynaklar
Klorojenik asit	35 µg/mL	Çalışmada referans bileşik kullanılmamıştır.	(Marcucci ve diğerleri 2023)
Kateşin	173 ± 8 µg/mL	Çalışmada referans bileşik kullanılmamıştır.	(Kamli ve diğerleri 2022)
<i>p</i> -Kumarik asit	59 µg/mL	Çalışmada referans bileşik kullanılmamıştır.	(Zahoor ve diğerleri 2021)
Taksifolin	35,3 ± 1,6 µM	Çalışmada referans bileşik kullanılmamıştır.	(Khelifi ve diğerleri 2020)
Viteksin	24,4 ± 0,026 µM	Çalışmada referans bileşik kullanılmamıştır.	(Ado ve diğerleri 2019)
Morin	0,88 ± 0,51 µg/mL	Çalışmada referans bileşik kullanılmamıştır.	(Ginting ve diğerleri 2020)
	59 µM	Çalışmada referans bileşik kullanılmamıştır.	(Sinha ve diğerleri 2015)
Vanilik asit	725,79 µg/mL	<i>L</i> -askorbik asit (IC ₅₀ = 37,91 µg/mL)	(Zhao ve diğerleri 2012)

Yapılan bir başka çalışmada, hidroksisinnamik asit türevi fenolik bileşiklerin demir-indirgeme antioksidan güçlerinin (FRAP), artan konsantrasyon ve yapıya eklenen hidroksil ve metoksil gruplarıyla artış gösterdiği bulunmuştur. Bu bileşikler arasından rozmarinik asit ve kafeik asit 1 mM konsantrasyonda sırasıyla 3,65 ± 0,14 mM Fe²⁺ ve 2,12 ± 0,01 mM Fe²⁺ FRAP aktivitesi gösterirken; ferulik asit ve *p*-kumarik asitin FRAP değerleri sırasıyla 1,70 ± 0,03 mM Fe²⁺ ve 0,11 ± 0,003 mM Fe²⁺ olarak kaydedilmiştir (Skroza ve diğerleri 2022). Aynı çalışmada hidroksibenzoik asit türevleri de incelenmiş ve FRAP değerleri sırasıyla gallik asit için 5,03 ± 0,10 mM Fe²⁺; vanilik asit için 0,85 ± 0,01 mM Fe²⁺; sirinjik asit için ise 3,20 ± 0,1 mM Fe²⁺ olarak bildirilmiştir.

Soobrattee ve diğerlerinin (2005) çalışmasında, birçok fenolik bileşiğin FRAP aktivitesini referans olarak kullanılan sentetik antioksidanlar (bütilhidroksianisol/BHA: 3,05 mmol Fe²⁺/L; BHT: 0,04 mmol Fe²⁺/L; troloks: 1,91 mmol Fe²⁺/L; askorbik asit: 2,26 mmol Fe²⁺/L) ile mukayeseli olarak değerlendirmiş ve en güçlü aktiviteyi flavanol yapısındaki EGCG (FRAP: 8,04 mmol Fe²⁺/L) göstermiştir. Aynı deneyden elde edilen FRAP değerleri sırasıyla; kersetin (7,39 mmol Fe²⁺/L), rozmarinik asit (6,21 mmol Fe²⁺/L), izokersitrin (5,52 mmol Fe²⁺/L), gallik asit (5,25 mmol Fe²⁺/L), kersetin 3-β-D-galaktozit (4,89 mmol Fe²⁺/L), mirisetin (4,58 mmol Fe²⁺/L), elajik asit (4,39 mmol Fe²⁺/L), klorojenik asit (3,22 mmol Fe²⁺/L), orientin

(2,81 mmol Fe²⁺/L), kateşin (2,47 mmol Fe²⁺/L), luteolin (2,23 mmol Fe²⁺/L), apigenin (2,01 mmol Fe²⁺/L), kemferol (1,95 mmol Fe²⁺/L), ferulik asit (1,33 mmol Fe²⁺/L), viteksin (0,56 mmol Fe²⁺/L), genistein (0,46 mmol Fe²⁺/L) ve naringenin (naringenin aglikon formu, 0,44 mmol Fe²⁺/L) olarak kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, flavonol, hidroksisinnamik asit ve basit fenolik asit gruplarına ait 9 adet bileşiğin antioksidan aktivitelerinin, referans olarak kullanılan BHA'dan daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Firuzi ve diğerlerinin (2005) çalışmasında, bazı fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri referans bileşik olan troloksa ($21,5 \pm 1,7 \mu\text{M}$) karşı FRAP yöntemi ile değerlendirilmiş, 4. dakikada kaydedilen döngüsel voltametri sonuçlarına göre, kersetin ($65,0 \pm 4,8 \mu\text{M}$), fisetin ($54,2 \pm 2,9 \mu\text{M}$) ve mirisetin ($49,0 \pm 1,9 \mu\text{M}$) en aktif bileşikler olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, kersetin, fisetin ve mirisetinin trolokstan sırasıyla 3,02; 2,52 ve 2,28 kat daha aktif olmasının, B halkasındaki *o*-dihidroksi yapısı, C halkasındaki 3-hidroksi grubu ve 2,3- çifte bağı ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Bunun yanında, FRAP aktivitesi ölçülen diğer bileşikler sırasıyla; kemferol ($27,3 \pm 0,3 \mu\text{M}$), taksifolin ($24,1 \pm 1,4 \mu\text{M}$), kateşin ($20,7 \pm 1,5 \mu\text{M}$), hesperetin ($13,3 \pm 0,6 \mu\text{M}$), apigenin ($0,9 \pm 0,3 \mu\text{M}$), genistein ($0,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$), daidzein ($0,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$) ve naringin ($0 \mu\text{M}$) olmuştur.

Hırvatistan'da yapılan bir çalışmada, gallik asit ($1467,7 \pm 58,8 \mu\text{M}$), kafeik asit ($754,7 \pm 31,4 \mu\text{M}$), kersetin ($1796,4 \pm 105,4 \mu\text{M}$), kateşin ($635,6 \pm 46,0 \mu\text{M}$) ve resveratrolün ($335,9 \pm 3,3 \mu\text{M}$) antioksidan aktiviteleri FRAP yöntemi ile test edilmiş ve 20. dakikada alınan sonuçlar troloks eşdeğeri olarak kaydedilmiştir (Skroza ve diğerleri 2015). Bu sonuçlara göre, flavonol yapıdaki kersetinin, flavan-3-ol yapısındaki kateşinden 3 kat daha etkili olduğu ve bu farkın, aynı pozisyonlarda aynı sayıda hidroksil grubuna sahip olmalarına rağmen, C halkasındaki 2 ile 3 no'lu karbonlar arasındaki çift bağ ve 4. karbondaki oksijen grubundan kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Aynı çalışmada bileşiklerin DPPH süpürücü aktivitesi de değerlendirilmiş ve en etkili bileşik gallik asit (IC_{50} : $301,2 \mu\text{M}$), diğer bileşiklerin ise sırasıyla, kersetin (IC_{50} : $593,4 \mu\text{M}$), kafeik asit (IC_{50} : $1343,2 \mu\text{M}$), kateşin (IC_{50} : $1406,9 \mu\text{M}$) ve resveratrol (IC_{50} : $5472,6 \mu\text{M}$) olduğu bildirilmiştir.

2018 yılında, flavonoid türevleri olan apigenin, luteolin ve diosmetinin antioksidan aktivitesinin DPPH radikal süpürme ve FRAP yöntemleriyle araştırıldığı bir çalışmada (Nile

ve diğerleri 2018), bileşikler DPPH radikal süpürme yönteminde sırasıyla % $82,7 \pm 1,1$; % $85,5 \pm 1,6$ ve % $80,6 \pm 2,1$ inhibisyon gösterirken; FRAP yönteminde bu değerler % $68,5 \pm 1,3$; % $70,6 \pm 2,1$ ve % $67,4 \pm 1,9$ olarak bildirilmiştir. Referans olarak kullanılan kersetin için ise DPPH radikal süpürme ve FRAP sonuçları sırasıyla % $80,4 \pm 1,7$ ve % $65,8 \pm 1,2$ olarak tespit edilmiştir.

Çin’de yapılan başka bir çalışmada (Ma ve Huang, 2014), glisitein, daidzein ve genisteinin antioksidan aktiviteleri DPPH radikal süpürme ve FRAP yöntemleri ile test edilmiştir. DPPH radikal süpürme yönteminden elde edilen sonuçlar, sırasıyla 0,485; 0,613 ve 0,616 μM troloks eşdeğeri/g olarak kaydedilirken, FRAP sonuçları sırasıyla 0,710; 0,792 ve 0,750 mmol Fe^{2+} eşdeğeri/100 g olarak bildirilmiştir.

“Satsuma mandalinası” olarak bilinen *Citrus unshiu* Marsow. kabuklarından elde edilen başlıca flavonoidler olan hesperetin ve naringenin antioksidan kapasitesinin araştırıldığı bir çalışmada (Kim ve Lim, 2020), DPPH radikal süpürme ve FRAP yöntemi sonuçlarına göre, hesperetin sırasıyla $115,8 \pm 3,9$ mg askorbik asit eşdeğeri/g ve $549,1 \pm 21,1$ mmol FeSO_4 eşdeğeri/100 g değerleri ile naringenine ($52,6 \pm 3,3$ mg askorbik asit eşdeğeri/g ve $150,3 \pm 3,7$ mmol FeSO_4 eşdeğeri/100 g) göre daha güçlü antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Bileşiklerin fenolik yapısının CUPRAC aktivitesi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (Apak ve diğerleri 2007), flavonollerdeki A ve C halkalarında 5-hidroksi-4-keto grubu varlığı, flavonolün iki halka sistemini konjugasyon yoluyla bağlayan 2 ile 3 no’lu karbonlar arasındaki çift bağ ve B halkasındaki 3',4'-dihidroksi sübstitüsyonunun antioksidan etki için önemli yapısal özellikler olduğu ve tüm flavonoller arasında en yüksek troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) değerine kersetinin (TEAC: 4,38) sahip olduğu bildirilmiştir. Çalışmada yer alan diğer fenolik bileşikler için TEAC değerleri sırasıyla, EGCG: 4,89; fisetin: 3,90; kateşin: 3,09; gallik asit: 2,62; morin: 1,88; kemferol: 1,58; vanilik asit: 1,24; sirinjik asit: 1,12; hesperetin: 0,99; naringin: 0,02 olarak bildirilmiştir. Bunun yanında, flavonoid glikozitler aglikonlarına hidroliz edildiğinde CUPRAC kapasitelerinin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Hidroksisinnamik asit grubu bileşiklerde ise, 2 adet hidroksil grubu taşıyan bileşiklerin TEAC değerleri (kafeik asit: 2,89, klorojenik asit: 2,47) tek hidroksil veya metoksil

grubu taşıyanlara (ferulik asit: 1,20 ve *p*-kumarik asit: 0,55) göre yüksek bulunmuştur. Bunun yanında, DPPH ve ABTS radikal süpürme yöntemleriyle rozmarinik asit için elde edilen sonuçlar düşük antioksidan aktivite gösterdiği yönünde olsa da, bu çalışmada CUPRAC aktivitesi yüksek bulunmuştur (Apak ve diğerleri 2007; Kim ve Lee, 2004; Miliuskas ve diğerleri 2004).

UV spektroskopisi ile çeşitli polifenol bileşiklerin Fe²⁺ oksidasyon kinetiği ve antioksidan özelliklerini araştıran çalışmada, Fe²⁺-polifenol kompleksi için en iyi IC₅₀ değerleri sırasıyla EGCG (1,10 ± 0,01 µM), mirisetin (2,07 ± 0,05 µM), kersetin (10,4 ± 0,2 µM) ve gallik asit (15,2 ± 0,1 µM) olarak bildirilmiştir (Perron ve diğerleri 2010).

Yine 2011 yılında yapılan bir çalışmada, mirisetinin, metal-kaynaklı Aβ agregasyonunu metal içermeyen Aβ agregasyonundan daha güçlü şekilde modüle ettiği, ayrıca Zn²⁺ye kıyasla Cu²⁺-kaynaklı Aβ agregasyonunu düzenlediği, ve canlı hücrelerde, metal iyonları-nedenli Aβ sitotoksitesini azaltarak daha yüksek hücre sağkalım oranı sağladığı bildirilmiştir (DeToma ve diğerleri 2011).

Sinha ve diğerleri (2015), non-steroidal antiinflamatuvar ilaç kaynaklı gastropatinin tedavisinde anti-ülser ilaçlara alternatif olarak morin bileşiğinin antioksidan aktivitesini test ettiği çalışmasında, DPPH radikal süpürücü etki (IC₅₀= 59 µM), FRAP (IC₅₀= 38 µM) ve demir iyonu şelasyon etki tayininden (IC₅₀= 50 µM) elde edilen sonuçlar morinin güçlü bir antioksidan olduğunu ortaya koymuştur.

Polonya'da yapılan bir çalışmada, bazı flavon ve flavonoller antioksidan aktiviteleri değerlendirilmek üzere test edilmiş ve en yüksek FRAP aktivitesini mirisetin (152 ± 5,8 Fe/µmol) göstermiştir. Aynı deneyden elde edilen FRAP sonuçları sırasıyla kersetin (123 ± 4,5 Fe/µmol), kemferol (92 ± 4,3 Fe/µmol), luteolin (89 ± 3,2 Fe/µmol), diosmetin (1,6 ± 0,17 Fe/µmol) ve apigenin (0,48 ± 0,58 Fe/µmol) olarak kaydedilmiştir (Sroka ve diğerleri 2015).

Hidroksitirozol ve sentezlenen dimerik türevinin antioksidan aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, dimerik türevin (DPPH: % 86,7; FRAP: 363 mg askorbik asit eşdeğeri/L) hidroksitirozole göre (DPPH: % 33,2; FRAP: 124 mg askorbik asit eşdeğeri/L) çok daha etkili

olduğu bulunmuştur (Zwane ve diğerleri 2012). Yine oleuropeinin antioksidan gücünü tespit etmek için 5 yöntemin kullanıldığı bir çalışmada, DPPH radikal süpürücü etki ve FRAP metotlarına göre sonuçlar sırasıyla IC_{50} : $34,54 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$ (referanslar; askorbik asit IC_{50} : $28,47 \pm 1,09 \mu\text{g/mL}$; BHT IC_{50} : $31,15 \pm 0,32 \mu\text{g/mL}$) ve IC_{50} : $75,32 \pm 1,83 \mu\text{g/mL}$ (referanslar; askorbik asit IC_{50} : $44,69 \pm 1,08 \mu\text{g/mL}$; BHT IC_{50} : $83,32 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$) olarak kaydedilmiştir (Zun-Qiu ve diğerleri 2015). Ayrıca, oleuropein ve hidrokstitirozolün antioksidan kapasitesi ve lenfositlerde H_2O_2 -kaynaklı DNA hasarına karşı koruyucu etkilerinin FRAP ve CUPRAC yöntemleri kullanılarak araştırıldığı bir çalışmada, her iki bileşiğin de güçlü antioksidan ajanlar olduğu bildirilmiştir (Zorić ve diğerleri 2021).

2011 yılında yapılan bir çalışmada, *Teucrium ramosissimum* Desf. bitkisinden izole edilen bileşiklerden biri olan apigeninin en yüksek CUPRAC ($10,5 \mu\text{M}$ troloks eşdeğeri) ve FRAP ($0,71 \mu\text{M}$ troloks eşdeğeri) değerine sahip olduğu kaydedilmiştir (Sghaier ve diğerleri 2011).

2022 yılında kinik asitin antioksidan özelliklerinin 7 adet yöntemle (CUPRAC, ABTS, FRAP, DPPH, demir iyonu şelasyon tayini ve *N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamin analizi) araştırıldığı bir çalışmada, kinik asidin oldukça düşük antioksidan aktivite gösterdiği kaydedilmiştir (Ercan ve Doğru, 2022).

Özyürek ve diğerleri (2010) tarafından, bazı polifenolik bileşiklerin % hidrojen peroksit süpürme aktivitelerinin modifiye CUPRAC yöntemiyle değerlendirildiği çalışmada, en yüksek aktivitenin gallik asit ($\% 62,8 \pm 0,9$) tarafından sağlandığını bildirmiştir. Test edilen bileşiklerden kersetin ($\% 47,1 \pm 2,0$), EGCG ($\% 42,9 \pm 0,5$), kemferol ($\% 31,7 \pm 0,4$), rozmarinik asitin ($\% 26,0 \pm 0,5$) ise askorbik asit ($\% 17,5 \pm 0,5$) ve troloks ($\% 17,0 \pm 1,2$) daha yüksek aktiviteye sahip olduğu kaydedilmiştir. Ayrıca, kafeik asit ($\% 17,3 \pm 1,6$), klorojenik asit ($\% 14,6 \pm 0,8$), kateşin ($\% 14,6 \pm 1,9$), *p*-kumarik asit ($\% 10,6 \pm 0,3$) ve apigeninde ($\% 2,5 \pm 0,1$) daha düşük aktivite gözlenmiştir.

Bazı fenolik bileşiklerin farklı solvanlarda antioksidan kapasitelerinin CUPRAC ve FRAP yöntemleriyle değerlendirildiği bir çalışmada, en yüksek CUPRAC aktivitesi metanolde ve sırasıyla kersetin, kateşin, ferulik asit ve naringeninde gözlenmiştir. Diğer yandan, en yüksek FRAP aktivitesi metanol-su (1:1, v/v) karışımında kaydedilmiş olup sırasıyla kersetin, kateşin

ve ferulik asite ait değerler bildirilirken, naringenin aktif olmadığı bildirilmiştir (Çelik ve diğerleri 2010).

2.3.3. Fenolik bileşikler ile yapılan *in vivo* nöroprotektif etki tayinine ait çalışmalar

Antiamnezik aktivite tayinine ait çalışmalar

Yaşlanma sürecinin ana sebeplerinden biri olan oksidatif stres, amnezinin de sebebi olarak görülmektedir. Bu sebeple, amneziyi önlemek için fenolik bileşiklerin potansiyeli olduğu düşünölmekte ve bununla ilgili birçok bilimsel çalışma yürütölmektedir (Smach ve diğerleri 2021). Örneğin, Hasanein ve Mahtaj'ın (2015) yaptığı çalışmada, sıçanlarda skopolamin (1 mg/kg, *i.p.*) ile hafıza kaybı oluşturulduktan sonra 8, 16 ve 32 mg/kg dozlarda, rozmarinik asit *p.o.* uygulamasının antiamnezik etki sağlama potansiyeli test edilmiştir. Rozmarinik asitin 8 mg/kg dozda uygulamasında etki gözlenmezken, 16 mg/kg ve 32 mg/kg dozlarda uygulandığında karanlık bölmeye geçiş süresinin geciktiği, yani hafızayı güçlendirdiği bildirilmiştir. Ayrıca, referans ilaç olarak kullanılan donepezilin, 32 mg/kg rozmarinik asite göre hafızanın korunmasında daha etkin olduğu görölmüştür. Hasanein ve arkadaşlarının (2017) yaptığı bir diğer çalışmada, sıçanlarda etanol ile hafıza kaybı tetiklendikten sonra 8, 16 ve 32 mg/kg dozlarda (*p.o.*) rozmarinik asit uygulanmış ve 8 mg/kg dozda rozmarinik asit uygulaması hafızada herhangi bir değişiklik yaratmamıştır. Bunun yanında, 16 mg/kg ve 32 mg/kg dozlarda rozmarinik asit uygulamasının hafıza kaybına karşı koruma sağladığı, ayrıca donepezil ve 32 mg/kg dozda rozmarinik asit uygulamasının hafızanın korunmasında donepezil ile benzer etkileri olduğu bildirilmiştir.

2016 yılında yapılan bir çalışmada (Khodad ve diğerleri 2016), yetişkin erkek sıçanlarda hipokampüsün CA1 bölgesine iki taraflı uygulanan kolşisin (15 µg/sıçan) ile hafıza kaybı oluşturulmadan 10 gün önce sıçanlara 10 mg/kg ve 20 mg/kg dozlarda (*p.o.*) oleuropein verilmiştir. Kolşisin uygulamasından bir hafta sonra öğrenme ve hafıza yeteneklerinin ölçölmesi için pasif kaçınma testi uygulanmış ve oleuropeinin kolşisin-kaynaklı hafıza kaybına karşı koruma sağladığı bildirilmiştir.

İran'da yapılan bir çalışmada, sıçanlarda pentilentetrazol (PTZ) ile oluşturulan akut nöbet modelinde, 10 mg/kg ve 20 mg/kg (*i.p.*) dozlarda oleuropein uygulamasının pasif kaçınma

hafızasında önemli bir artış ve antikonvülzan etki sağladığı tespit edilmiştir (Sadate Hosseini ve diğerleri 2019).

Pasif kaçınma hafızasının değerlendirildiği bir çalışmada (Salehi ve diğerleri 2019), erkek sıçanlar 10 mg/kg ve 20 mg/kg dozda gallik asit; yalnızca fiziksel egzersiz veya hem fiziksel egzersiz hem de 10 ve 20 mg/kg dozda gallik asit uygulanacak şekilde gruplara ayrılmış ve 10 gün boyunca uygulamalar devam etmiştir. Uygulama sonunda yapılan pasif kaçınma testinde gallik asit ve fiziksel egzersizin tek başına veya kombine olarak hafızayı güçlendirdiği bulunmuştur.

Nagpal ve arkadaşlarının (2013) yılında erkek Swiss albino farelerde skopolamin (0,4 mg/kg, *i.v.*) kaynaklı amnezi oluşturduğu çalışmada, 7 gün boyunca 10 mg/kg (*i.p.*) gallik asit uygulamasının amneziyi tersine çevirdiği ve bileşiğin anti-amnezik aktivite gösterdiği bulunmuştur.

Travmatik beyin hasarı sonrası gallik asitin pasif kaçınma hafızası üzerindeki etkisini inceleyen çalışmada, travmatik beyin hasarı oluşturulmadan 7 gün önce ve hasardan sonra 2 gün olmak üzere 100 mg/kg dozda (*p.o.*) gallik asit uygulaması yapılmıştır (Sarkaki ve diğerleri 2015). Gallik asitin, travmanın sebep olduğu davranışsal, enflamatuvar ve elektrofizyolojik bozukluklara karşı, muhtemelen serebral proenflamatuvar sitokinlerin azalması yoluyla, hafızayı önemli ölçüde geliştirdiği ve nöroprotektif özellikler gösterdiği bildirilmiştir.

Sıçanlarda skopolamin (1 mg/kg, *i.p.*)-nedenli hafıza kaybına karşı EGCG'nin etkisini inceleyen çalışmada, 10 gün boyunca 5 mg/kg (*i.p.*) dozda EGCG, takip eden 9 gün boyunca EGCG ve skopolamin, davranış testlerinden (Y-labirent, pasif kaçınma ve Morris su labirent testi) önce uygulanmıştır. Çalışma sonucunda, EGCG'nin pasif kaçınma hafızasını önemli ölçüde iyileştirdiği, davranış testlerinden sonra disekte edilen sıçan beyinlerindeki AChE aktivitesini azaltarak kolinerjik fonksiyonları geliştirdiği tespit edilmiştir (Kim ve diğerleri 2021).

2016 yılında yapılan bir çalışmada (Kong ve diğerleri 2016), *D. melanogaster* ile AH modelinde kısalan yaşam süresi ve bozulmuş lokomotif davranışı tersine çevirmek üzere ergin sineklere diyet yolu ile kersetin takviyesi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, sineklerin ömrünün önemli ölçüde uzadığı ve tırmanma yeteneklerindeki bozuklukların kaybolduğu tespit edilmiştir.

Diyetle alınan bazı fitokimyasalların yaşlanma karşıtı etkilerini inceleyen bir çalışmada (Bauer ve diğerleri 2004), resveratrol alımının kalori kısıtlamasını taklit ederek *D. melanogaster*'in sağlığını iyileştirerek ömrünü uzatabileceğini ortaya koymuştur.

2023 yılında yapılan bir çalışmada (Ganesh, 2023), tau ve A β *D. melanogaster* hatları kullanılarak *Moringa oleifera* Lam., *Sesamum indicum* L., *Vaccinium* sp., *Ginkgo biloba* L. ve EGCG'nin AH'nı önleme potansiyeli araştırılmış, EGCG ve *G. biloba* su ekstresi birlikte sineklere verildiğinde, tüm pro-enflamatuvar sitokin üretiminin engellendiği ve AH başlangıcının yaklaşık 20 gün geciktiği gözlenmiştir.

Zebra balığı davranış modelleriyle nöroprotektif etki tayinine ait çalışmalar

Son yıllarda, hızlı gelişimi, optik şeffaflığı, yüksek yavru sayısı ve genetik manipülasyona yatkınlığı gibi özellikleriyle zebra balığı (*Danio rerio*) özellikle nörobiyolojik araştırmalarda avantajlı bir model organizma haline gelmiştir (Chávez ve diğerleri 2016). Örneğin, 2022 yılında, zebra balığında lipopolisakkarit (LPS)-kaynaklı nöroenflamasyon ve oksidatif strese karşı 50 ve 100 mg/kg dozlarda (*i.p.*) kersetinin etkisini yeni tank dalış (novel tank diving test, YTT) testiyle inceleyen çalışmada, kersetinin davranışsal değişikliklerde düzelmeye sağladığı gözlenmiştir (Singh ve diğerleri 2022b).

Kersetin ile yapılan başka bir çalışmada (Gupta ve diğerleri 2021), YTT yöntemiyle yetişkin zebra balıklarında streptozotosin (300 mg/kg, *i.p.*)-kaynaklı demans oluşturulduktan 24 saat sonra, 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarda (*i.p.*) kersetin uygulanmıştır. YTT sonucuna göre, kersetinin zebra balıklarında tankın üst bölgesinde geçirilen süreyi ve üst bölgeye giriş sayısını önemli ölçüde artırdığı gözlenmiştir. Ayrıca kersetinin 100 mg/kg dozda, 50 mg/kg ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha etkili olduğu bulunmuştur.

Zebra balığı üzerinde bisfenol A'nın (17,52 μM) neden olduğu nörotoksisite ve oksidatif strese karşı naringenin ve silibinin (10 μM) etkisini inceleyen bir çalışmada, zebra balığının nörodavranışsal özellikleri YTT ile değerlendirilmiştir (Thayumanavan ve diğerleri 2022). Silibin ve naringenin uygulamasının tankın üst bölgesinde geçirilen süre ve üst bölgeye geçişte gecikmeyi önemli ölçüde etkilediği, bisfenol A'nın dipte yaşama davranışına neden olan nörotoksik etkisini tersine çevirerek nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir.

İspanya'da zebra balığı embriyo modeli kullanarak oleuropein, apigenin, klorojenik asit ve naringenin gibi fenolik bileşiklerin koruyucu özelliklerini araştıran çalışmada, embriyolar *tert*-bütil hidroperoksit ile oksidatif stres oluşturulmadan önce fenolik bileşiklere tabi tutulmuştur (Arteaga ve diğerleri 2021). Çalışma sonucunda, bileşiklerin tümünün oksidatif stres kaynaklı ölümden koruduğu, apigeninin ise oluşması muhtemel doğum defektlerini engellediği bildirilmiştir.

Issac ve diğerleri (2021) zebra balığı larvaları üzerinde H_2O_2 ile oksidatif stres oluşturduktan sonra morin adlı flavonol türevinin davranışsal değişiklikler üzerindeki etkisini gözlemlemiştir. Morin uygulamasının, larvaların reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species, ROS) seviyelerini önemli ölçüde azalttığı, davranışsal aktiviteyi geliştirdiği, antioksidan enzim aktivitesini artırarak H_2O_2 -kaynaklı oksidatif stresten koruduğu bildirilmiştir.

2021'de yapılan başka bir çalışmada, zebra balığında PTZ-kaynaklı nöbetleri önlemede hesperidinin antikonvülzan etkisi araştırılmıştır (Sharma ve diğerleri 2021). Larvalara, PTZ'ye maruz bırakılmadan önce, 1, 5 ve 10 μM dozlarda 1 saat süreyle hesperidin uygulaması yapılmış ve PTZ-kaynaklı hiperaktif tepkilerin önemli ölçüde azaldığı ve nöbet gecikme süresinin uzadığı tespit edilmiştir.

2020 yılında, çinko oksit nanopartikülleriyle oluşturulan toksisiteye karşı resveratrolün koruyucu etkisini zebra balığı modelinde inceleyen bir başka *in vivo* çalışmada, resveratrolün ROS artışını inhibe ettiği, mitokondriyal membran potansiyeli işlev bozukluğunu ve ortaya çıkan hücre apoptozunu önlediği tespit edilmiştir (Giordo ve diğerleri 2020). Bunun yanında, zebra balıklarında mitokondriyal membran işlev bozukluğu

üzerine hidroksitirozolün etkisini araştıran *in vivo* bir çalışmada (Dong ve diğerleri 2022), balıklara normal (% 10) ve yüksek (% 16) yağ içeren diyetlerle birlikte 200 mg/kg hidroksitirozol içeren iki ek diyet uygulanmıştır. Çalışmanın sonucuna gore, hidroksitirozolün yüksek yağlı beslenmenin sebep olduğu oksidatif stresi ve mitokondriyal disfonksiyonu hafiflettiği bildirilmiştir.

Brezilya'da yapılan bir çalışmada (Richetti ve diğerleri 2011), kersetin ve rutin hafıza koruyucu özellikleri skopolamin (200 μ M, 1 saat sureyle, tank suyu içinde oznm halde) ile hafıza kaybı oluşturulan zebra balıkları üzerinde araştırılmış; 50 mg/kg (*i.p.*) dozda kersetin ve rutin n uygulamasının, zebra balıklarında skopolamin-kaynaklı amneziyi genel lokomotor aktiviteyi etkilemeden önlediği tespit edilmiştir.

2022 yılında yapılan bir çalışmada (Li ve diğerleri 2022), alüminyum klorür-nedenli zebra balığı AH modelinde, *Lavandula angustifolia* Mill. bitkisinin bileşenlerinden luteolin-7-glukozit, apigenin-7-O-glukozit, salvianolik asit A and rozmarinik asitin AH tedavisinde etkin bileşikler olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca, 2023 yılında yapılan başka bir çalışmada (Singh ve diğerleri 2023), EGCG'nin nöroprotektif ve antioksidan özelliklerinin, zebra balıklarında gen ifadesinin baskılanmasıyla oluşan nöronal hücre oksidasyonunun neden olduğu nörobilişsel bozulmayı iyileştirdiği bulunmuştur.

Zebra balıklarında gallik asit ön uygulamasının akut etanol maruziyeti ile oluşabilecek değişikliklere etkisini inceleyen çalışmada, etanolün sebep olduğu oksidatif stres parametreleri üzerindeki inhibitör etkinin gallik asit tarafından önlendiği bildirilmiştir (Baldin ve diğerleri 2022).

2.3.4. Fenolik bileşiklerin AChE, BChE ve BACE1 enzimleriyle moleküler modellemesine ait alışmalar

Moleküler biyolojik veri miktarının hızla artmasıyla birlikte bilgisayar tabanlı analizlerin uygulanabilirliğinde son yıllarda önemli ilerlemeler kaydedilmiş ve sentetik ve doğal kökenli nc (lead) biyoaktif moleküllerin protein-ligant ilişkilerinin moleküler düzeyde incelenmesinde *in silico* yöntemler oldukça önem kazanmıştır (Fang ve diğerleri 2018;

Lengauer ve Rarey, 1996; Olğaç ve diğerleri 2017; Thomford ve diğerleri 2018). İlaç-hedef etkileşimlerinin tahmininde günümüzde kullanılan *in silico* yöntemler; hedef-temelli, ligant-temelli, ağ-temelli, kemogenomik-temelli ve omik-temelli yaklaşımlar olarak sınıflandırılmaktadır. Moleküler modelleme en yaygın kullanılan hedef-temelli yaklaşımdır ve doğal bileşiklerin hedef proteinini, biyolojik hedefin 3 boyutlu yapısına dayanarak tahmin etmektedir (Fang ve diğerleri 2018).

Moleküler modelleme, bir ligant ve hedef molekülün kararlı bir kompleks oluşturmak üzere birbirine bağlandığında, bir molekülün diğer moleküle tercih edilen yönelimini tahmin eden bir yöntemdir (Lengauer ve Rarey, 1996). Bu iki molekül arasındaki ilişkinin gücü veya bağlanma yakınlığı belirli skorlama fonksiyonları kullanılarak tahmin edilmektedir. Moleküler modelleme, küçük moleküllü ligantların uygun hedef bağlanma bölgesine bağlanma konformasyonunu tahmin etme kabiliyeti nedeniyle ilaç tasarımında en sık kullanılan yöntemlerden biridir (Kitchen ve diğerleri 2004). Moleküler modellemede en çok tercih edilen iki yaklaşım; protein ve ligantı tamamlayıcı yüzeyler olarak tanımlayan eşleştirme tekniğinin kullanıldığı ve protein-ligant arasında çift yönlü etkileşim enerjilerinin hesaplanarak gerçek modelleme sürecinin simüle edildiği yöntemdir (Feig ve diğerleri 2004; Goldman ve Wipke, 2000; Meng ve diğerleri 1992; Morris ve diğerleri 1998).

Örneğin, 2018 yılında, fenolik bileşiklerin AChE, BChE ve BACE1 enzimlerinin aktif bölgesinde moleküler düzeydeki etkileşimini incelemek amacıyla *in silico* ortamda yapılan moleküler modelleme çalışmasında, referans ilaçlar olarak donepezil, galantamin ve rivastigmin kullanılmıştır (Alam ve diğerleri 2018). Yapılan çalışmanın sonuçlarına göre, gallik asit dışındaki tüm bileşikler referans ilaçlara göre daha iyi moleküler kenetlenme göstermiş ve bağlanma enerjileri Çizelge 2.3.'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Bazı fenolik bileşiklerin AchE, BChE ve BACE1 enzimleriyle moleküler modellemesine ait bağlanma enerjileri (Alam ve diğerleri 2018)

Fenolik bileşikler	Bağlanma enerjileri (Kkal/mol)		
	AChE	BChE	BACE1
Rozmarinik asit	-8,2	-9,2	-7,4
Elajik asit	-9,7	-10,5	-8,1
Gallik asit	-6,4	-6,4	-5,5
Hesperetin	-8,4	-9,1	-8,4
Tangeretin	-8	-7,1	-8,2
Kersetin	-8,5	-9,4	-8,2
Klorojenik asit	-7,6	-8,3	-7,4
Apigenin	-8,9	-7,9	-8,4
Resveratrol	-8,2	-7,6	-7,4
Naringenin	-8,5	-9,1	-8,2
Glisitein	-9,1	-8,1	-10,2
Daidzein	-8,2	-8,3	-8,7
Kemferol	-8,9	-7,8	-8,5
Pelargonidin	-10,3	-10,1	-9
Mirisetin	-8,5	-9,4	7,9
Luteolin	-8,6	-9,7	-8,4
Kateşin	-9,6	-10,6	-9,5
Genistein	-8,6	-7,9	-9,1
Referans ilaçlar			
Donepezil	-7,5	-7,7	-8,6
Galantamin	-6,5	-6,8	-6,3
Rivastigmin	-6,2	-7,2	-6,2

Madeswaran'ın (2017) çalışmasında, birçok fenolik bileşiğin AChE ve BChE enzimleriyle olan etkileşimi moleküler modelleme ile araştırılmış ve referans ilaç olarak kullanılan donepezile kıyasla çalışmaya dahil edilen fenolik bileşiklerin tümü AChE enzimiyle daha iyi kenetlenirken, BChE enzimi için referanstan daha iyi afinite gösteren fenolik bileşikler sırasıyla mirisetin, apigenin, morin, hesperetin, tangeretin, izokersitrin, diosmetin ve naringenin olarak tayin edilmiştir. Fenolik bileşiklerin AChE ve BChE enzimleriyle moleküler kenetlenmesine ait bağlanma enerjileri Çizelge 2.4.'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. Bazı fenolik bileşiklerin AChE ve BChE enzimleriyle moleküler kenetlenmesine ait bağlanma enerjileri (Madeswaran, 2017)

Fenolik bileşikler	Bağlanma enerjileri (Kkal/mol)	
	AChE	BChE
Trisin	-5,36	-3,28
Orientin	-4,08	-2,64
Viteksin	-5,96	-3,61
Hesperetin	-6,72	-3,83
Tangeretin	-6,24	-3,82
Fisetin	-5,28	-3,15
Glisitein	-4,76	-2,38
Apigenin	-6,33	-3,88
EGCG	-5,31	-3,40
Naringenin	-6,76	-3,59
Pelargonidin	-4,32	-2,53
Daidzein	-5,04	-3,08
Kemferol	-6,32	-3,06
İzokersitrin	-4,32	-3,73
Mirisetin	-6,34	-4,21
Luteolin	-4,35	-2,58
Diosmetin	-6,03	-3,66
Taksifolin	-5,22	-3,17
Vanilik asit	-5,34	-3,28
Genistein	-4,32	-2,50
Morin	-6,92	-3,88
Referans ilaç		
Donepezil	-3,87	-3,47

2.3.5. Fenolik bileşiklerin sitotoksitelerine ait çalışmalar

A β peptit nörotoksitesinin AH patogenezinde merkezi bir rol oynadığı bilinmektedir. Doğal kaynaklı fenolik bileşiklerin ise amiloit sitotoksitesini geriye çevirmek için potansiyeli olduğu bildirilmiştir (Stefani ve Rigacci, 2013). Bu kapsamda, hücre canlılığını ölçmek ve A β toksitesini değerlendirmek için MTT yanında Alamar Blue da yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri haline gelmiştir (Liu ve Schubert, 1997; Rampersad, 2012). Örneğin, Omar ve diğerlerinin (2018b) çalışmasında, SH-SY5Y hücre hattına oleuropein, hidroksitirozol, kafeik asit, kersetin ve luteolin ile ön uygulamanın, nöroblastoma hücrelerinde A β ₄₂, bakır- A β ₄₂ ve L-DOPA- A β ₄₂-kaynaklı toksitelerin neden olduğu hücre ölümünü hafiflettiği bildirilmiştir. Bu çalışmaya ait sonuçlar Çizelge 2.5.'te özetlenmiştir.

Çizelge 2.5. Bazı fenolik bileşiklerin SH-SY5Y hücrelerinde A β ₄₂, bakır- A β ₄₂ ve L-DOPA- A β ₄₂-kaynaklı toksiteye karşı nöroprotektif etkileri (Omar ve diğerleri 2018b)

Fenolik bileşikler	A β -SH-SY5Y toksisitesi (%)	A β -Cu-SH-SY5Y toksisitesi	A β -L-DOPA-SH-SY5Y toksisitesi
Kontrol (besiyeri)	100 \pm 1,21	100 \pm 1,13	100 \pm 0,92
Negatif kontrol (A β ₄₂ , Cu-A β ₄₂ , ve L-DOPA- A β ₄₂)	37 \pm 1,41	34 \pm 1,53	12 \pm 0,37
Kafeik asit	62 \pm 0,53	62 \pm 0,93	67 \pm 0,43
Hidroksitirozol	60 \pm 1,00	60 \pm 0,84	64 \pm 1,02
Oleuropein	68 \pm 0,69	76 \pm 1,61	74 \pm 0,23
Luteolin	65 \pm 0,39	67 \pm 0,52	69 \pm 0,87
Kersetin	63 \pm 0,29	60 \pm 0,52	61 \pm 0,73

Kalagatur ve diğerleri (2021), SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde deoksinivalenolün (DON) neden olduğu sitotoksik etkilere karşı 0,1; 0,5; 1; 2; 5 ve 10 mM konsantrasyonlarda kersetin ön uygulamasının koruyucu etkisini araştırmıştır. Buna göre, 1 mM kersetin konsantrasyonunun DON'a bağlı canlılıktaki azalmayı tersine çevirmede etkili olduğu, ancak 1 mM üzerindeki konsantrasyonlarda DON'a karşı ek bir koruma sağlamadığı bildirilmiştir.

2021 yılında yapılan bir çalışmada (Leri ve diğerleri 2021), oleuropein ve hidroksitirozolün otofaji üzerindeki moleküler mekanizmaları toksik A β ₁₋₄₂ oligomerlerine maruz bırakılan SH-SY5Y hücreleri üzerinde araştırılmış ve bu polifenollerin tek başına veya kombinasyonlarının otofajik yolları aktive ederek yaşlanmayla ilgili nörodejenerasyona karşı etkili olduğu tespit edilmiştir.

AH'da A β 'nin nörotoksik etkilerini taklit etmek için akut olarak A β ₄₂ ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin kullanıldığı bir çalışmada, A β kaynaklı meydana gelen MTT redüksiyon azalmasının, EGCG (EC₅₀= 0,8 μ M) tarafından % 100 oranda geriye çevrildiği ve EGCG'nin güçlü koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir (Del Castillo Frias, 2017).

2022 yılında yapılan bir çalışmada (Roy ve diğerleri 2002), resveratrolün sitotoksik aktivitesi MTT testi ile akut miyeloblastik lösemi (HL-60), kronik miyelojenik lösemi (K-562), meme adenokarsinomu (MCF-7) ve servikal epitelyal karsinom (HeLa) olmak üzere dört insan tümör hücre hattında denenmiş ve resveratrolün sadece HL-60 (IC₅₀= 49 μ M) ve K-562 (IC₅₀= 68 μ M) lösemi hücre hatlarında etkili olduğu bildirilmiştir.

Bazı fenolik bileşiklerin MTT testi ile insan meme kanseri hücrelerinde sitotoksik aktivitesini araştıran bir çalışmada, MCF-7/wt ve MCF-7/Adr kanser hücre hatlarına karşı en sitotoksik bileşiğin rozmarinik asit (sırasıyla, EC₅₀= 0,74 mM ve EC₅₀= 0,81 mM) olduğu, bunu sırasıyla luteolin-7-O-glukuronit (EC₅₀= 1,09 mM ve EC₅₀= 1,87 mM) ve kafeik asitin (EC₅₀= 1,36 mM ve EC₅₀= 2,01 mM) takip ettiği bildirilmiştir (Berdowska ve diğerleri 2013).

Fenolik bileşiklerin melanoma (B16F10 ve SK-MEL-1) ve dönüşmemiş melanosit (Melan-a) hücre hatlarında sitotoksik ve antiproliferatif etkilerini MTT yöntemiyle araştıran bir çalışmada (Yanez ve diğerleri 2004), hesperetin, luteolin, tangeretin, kersetin, mirisetin ve gallik asitin düşük dozlarda belirgin sitotoksik aktivite göstermediği bildirilmiştir. Flavon yapıdaki tangeretin ve luteolinin, 50 μ M konsantrasyonda B16F10 hücre hattı üzerinde güçlü sitotoksik aktivite gösterirken (sırasıyla, % 57,18 ve % 70,23); SK-MEL-1 hücre hattında benzer etki gösterdiği bulunmuştur. Melan-a hücre hattı üzerinde ise mirisetinin (% 34,42) en güçlü etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, fenolik bileşiklerin hücre büyümesi üzerine etkileri incelendiğinde, tangeretin, B16F10 hücreleri üzerinde en etkili flavonoit türevi olurken (IC₅₀= 11,2 μ M), bunu gallik asit (IC₅₀= 13,45 μ M), mirisetin (IC₅₀= 38,34 μ M), hesperetin (IC₅₀= >50 μ M), kersetin (IC₅₀= >50 μ M) ve luteolin (IC₅₀= >50 μ M) izlemiştir. Melan-a üzerinde ise mirisetin (IC₅₀= 21,9 μ M) en etkili bileşik olmuş ve bunu luteolin (IC₅₀= 23,4 μ M), gallik asit (IC₅₀= 30 μ M), kersetin (IC₅₀= 63,9 μ M) ve tangeretin (IC₅₀= >50 μ M) izlemiştir.

2.3.6. Fenolik bileşiklerin AH ile ilişkilendirilen genler üzerindeki etkilerine ait çalışmalar

Genomik teknolojilerin gelişimi ve özellikle gen ekspresyon profili ile hastalıkları karakterize eden genler hakkında veri setlerinin elde edilmesi, AH gibi hastalıklar hakkında henüz anlaşılammış süreçlerin aydınlatılmasına ışık tutmaktadır (Walker ve diğerleri 2004).

Örneğin, AH fare modelinde EGCG'nin α -sekretaz bölünmesi için A disintegrin ve metalloproteinaz alanı içeren protein 10 (a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10, *ADAM10*) adlı geni uyararak antiamiloidojenik etkiyle A β birikmesini azalttığı ve farelerde bilişsel işlevi iyileştirdiği gözlenmiştir (Obregon ve diğerleri 2006; Rezai-Zadeh ve diğerleri 2005). Yine, ailesel bir AH modeli olan amiloit protein öncüsü/presenilin 1 (*PSEN1*) (APP^{swe}/PS1^{dE9}) farelerine EGCG ve polilaktik-ko-glikolik asit-poliyetilen glikol (PLGA-PEG) nanopartikülünün oral yoldan uygulanması ile nöroenflamasyonun yanı sıra A β plak yükünde ve çözünür/çözünmez A β ₁₋₄₂ peptidin kortikal seviyelerinde azalma tespit edilmiştir (Cano ve diğerleri 2019). Bunun yanında, EGCG ve melatoninin birlikte kullanımının *PSEN1* geninde E280A mutasyonunun neden olduğu ailesel AH'da apoptotik belirteçleri tamamen azalttığı kanıtlanmıştır (Soto-Mercado ve diğerleri 2023). Ayrıca, EGCG'nin AH fare modelinde LPS-kaynaklı artmış sitokin ekspresyonunu, (tümör nekroz faktör- α (TNF- α), interlökin 1 β (IL-1 β), IL-6), dolayısıyla AH ile ilişkili enflamasyonu azalttığı bildirilmiştir (Lee ve diğerleri 2013).

2002'de yapılan bir çalışmada (Sartor ve diğerleri 2002), birçok fenolik bileşiğin matris metalloproteinaz-9'un (MMP9) enzimatik aktivitesi üzerindeki inhibitör etkisi test edilmiş ve morin, fisetin, pelargonidin, EGCG ile mirisetin inhibitör etki gösterirken, kersetin, resveratrol, rozmarinik asit, luteolin, apigenin, kemferol ve genisteinin inhibisyon göstermediği bildirilmiştir. Ayrıca, Spagnuolo ve diğerleri (2018), kersetin, EGCG, hesperetin ve genistein gibi flavonoidlerin pro-enflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-6, IL-1 β ve siklooksijenaz (cyclooxygenase-2, COX-2) ekspresyonunu azaltarak nörodejenerasyonu önleyebildiğini bildirmiştir.

Bir başka çalışmada, gallik asitin *APP/PS1* transjenik fare modelinde A β ₁₋₄₂ agregasyonunu ve nörotoksisiteyi azaltarak bilişsel gerilemeyi yavaşlattığı gözlenmiştir (Yu ve diğerleri

2019). Yine, sıçanlarda oluşturulan modelde gallik asit (50 mg/kg), donepezil (2,5 mg/kg) ve portakal kabuğundan elde edilen ekstraların (100 ve 200 mg/kg) oral uygulamasının sıçanlarda alüminyum klorür-nedenli AH modeline kıyasla *PSEN-2* gen ifadesinde önemli bir artış sağladığı gözlenmiştir (Abd El-Aziz ve diğerleri 2022). Benzer şekilde, sıçanlarda alüminyum klorür-nedenli AH modelinde kersetin uygulamasının *BACE1*, *APP*, *PSEN1* ve ön yutak defektif-1 (anterior pharynx-defective 1, *APH1*) genlerinin aşağı regülasyonu ve hipokampüste *ADAM10* ve *ADAM17* genlerinin yukarı doğru regülasyonu ile davranışsal, kolinerjik ve dopaminerjik işlev bozukluklarının yanında hipokampüste çözünmeyen A β agregasyonunu azalttığı bildirilmiştir (Elfiky ve diğerleri 2021).

Kersetinin antiamiloidojenik ve antioksidan özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, kersetinin H₂O₂ ile muamele edilmiş APP^{swE} hücrelerinde ROS oluşumunu tamamına yakın oranda azalttığı bildirilmiştir (Jiménez-Aliaga ve diğerleri 2011). Ayrıca, 2016 yılında yapılan bir çalışmada (Zhang ve diğerleri 2016), kersetinin astrositlerde *APOE* yıkımını inhibe ederek *APOE* seviyelerini önemli ölçüde artırdığı ve oral uygulamanın farelerin korteksindeki çözünmeyen A β seviyelerini azalttığı gözlenmiştir.

Trimetiltin uygulanan AH modelinde egzersiz ve kronik gallik asit uygulamasının sıçan hipokampüsünde TNF- α seviyesi üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmada (Bazyar ve diğerleri 2015), TNF- α seviyelerinin tüm gruplarda azaldığı, gallik asit ve egzersizin, tek başına ve birlikte, immünomodülatör etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.

Gallik asitin A β plakları üzerindeki etkisi ve bu etkinin cinsiyete bağlı olup olmadığını farelerde araştıran bir çalışmada, içme suyuna eklenen % 0,2 gallik asitin kontrole göre erkek *APOE* farelerde plağı azaltırken, dişi *APOE* farelerde ilgili kontrol gruplarına kıyasla plağı azaltmadığı gözlenmiştir (Clark ve diğerleri 2022).

Rozmarinik asidin TNF- α ve nükleer faktör-kappa B (*NF- κ B*) ekspresyonlarını azaltarak amiloit kaynaklı hafıza kaybını büyük ölçüde azalttığı bilinmektedir (Koul ve diğerleri 2023). Örneğin, sıçanlarda LPS ile nöroenflamasyon oluşturulan bir çalışmada, rozmarinik asit uygulamasının hipokampus ve prefrontal kortekste TNF- α , IL-1 β ve IL-6'nın aşırı üretimini önlediği bildirilmiştir (Hassanzadeh-Taheri ve diğerleri 2021). Yine, rozmarinik asit ile

muamelenin AH patolojileri üzerindeki etkilerini transjenik fareler üzerinde arařtıran bir çalıřmada, enflamatuvar rahatsızlıklarla iliřkili kemokin C-C (motif) ligant 5 [chemokine C-C (motif) ligant 5, *CCL5*] ve C-X-C motifli kemokin ligant 13 (C-X-C motif chemokine ligand 13, *CXCL13*) ekspresyonlarının rozmarinik asit uygulaması ile serebral korteks, hipokampus ve dalakta dūřtūđū gōzlenmiřtir (Yamamoto ve diđerleri 2021).

2016 yılında yapılan bir çalışmada, *APP/PS1* fare modelinde hidroksitirozolūn AH patogenizinde rolū araştırılmış ve hidroksitirozolūn *APP*'den bağımsız olarak nōronal enflamasyonu azalttığı tespit edilmiştir (Peng ve diğerleri 2016). Ayrıca, hidroksitirozolūn enflamatuvar belirteç seviyelerini azaltma etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (Fuccelli ve diğerleri 2018), farelerde 40 ve 80 mg/kg hidroksitirozol ön uygulamasından sonra LPS ile enflamasyon tetiklenmiştir. Çalışma sonucunda LPS ile artan TNF- α ve COX-2 seviyelerinin artmadığı gōzlenmiřtir.

Omar ve diğerleri (2018b) *APP^{swe}/PS1^{dE9}* transjenik fareleri 50 mg/kg oleuropein içeren zeytin yaprağı ekstresi ile 16 hafta boyunca beslenmiş ve kontrol grubuna kıyasla fare hipokampus ve korteksinde A β plak birikimin önemli ölçūde azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, oleuropeinin AH üzerinde koruyucu etkilerinin TgSwDI farelerinde araştırıldığı bir çalışmada, 4 hafta boyunca oleuropein ile beslenen farelerde A β yükūnün önemli ölçūde azaldığı ve bunun farelerin beynindeki *APOE*'ye bağlı amiloit klerensinin aktive olmasıyla ilişkili olabileceği vurgulanmıştır (Qosa ve diğerleri 2015). Bunun yanında, 2017 yılında yapılan bir çalışmada, oleuropein ile ön uygulama sonucu insan sinovyal fibroblast hücre hattında (SW982) IL-1 β muamelesi ile artan pro-enflamatuvar sitokinlerin (TNF- α ve IL-6) seviyelerinde önemli ölçūde azalma olduğu bildirilmiştir (Castejón ve diğerleri 2017).

řu ana kadar yapılan çalıřmalarda, resveratrolūn AH patogenezindeki nöroprotektif iřlevleri farklı etki mekanizmalarıyla deđerlendirilmiř ve anti-enflamatuvar etki oluřturduđu mekanizmalardan birinin pro-enflamatuvar sitokin aktivitesi (IL-1 β , IL-6 ve TNF- α) ve prostaglandin E₂ sentezinin engellenmesi olduđu vurgulanmıřtır (Kim ve diđerleri 2007; Mendiola-Precoma ve diđerleri 2016). Ayrıca, AH Tg2576 fare modelinde dūřük dozda (0,2 mg/L) uygulanan resveratrolūn A β seviyelerini dūřürdüđu ve resveratrolūn AH patolojisinde faydalı olduđu kanıtlanmıřtır (Wang ve diđerleri 2006). Bunun yanında, AH *APP/PS1* fare

modeli üzerinde oral resveratrol uygulamasının etkisini araştıran çalışmada, resveratrolün *APP/PS1* fare hipokampüsünde meydana gelen dejenerasyonu azaltarak hafıza kaybını önlediği bildirilmiştir (Porquet ve diğerleri 2014).

2013 yılında yapılan bir çalışmada, fisetin ve diosmetin ön uygulamasının LPS-nedenli PC12 hücre hasarı üzerinde nöroprotektif etkileri araştırılmış; fisetin ve diosmetinin, tek başına veya birlikte, sırasıyla *APP*, siklofilin D ve ROS üretimini baskıladığı, IL-10 ekspresyonunu ise konsantrasyona bağlı şekilde artırdığı tespit edilmiştir (Bhatt ve Benzeroual, 2013).

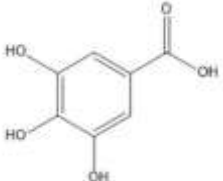
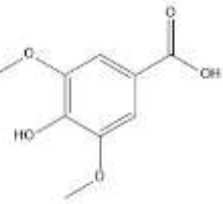
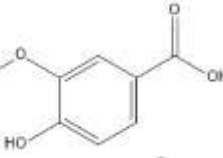
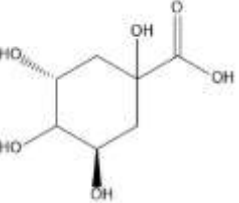
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

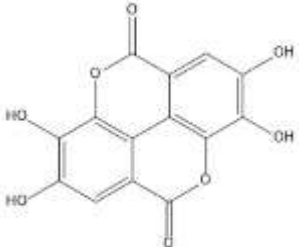
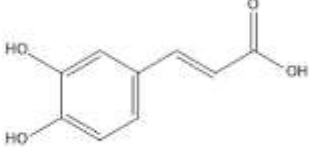
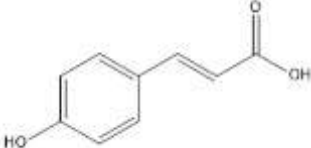
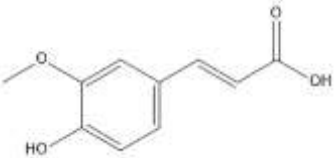
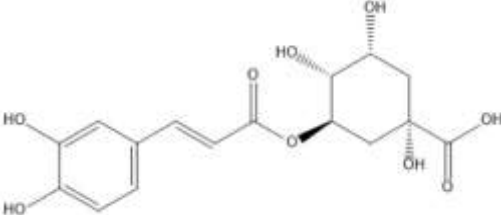
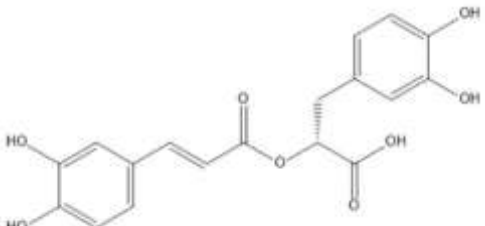
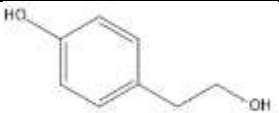
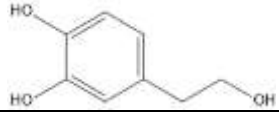
Tez çalışmamızda, bitkilerde yaygın olarak bulunan farklı kimyasal gruplardan 38 adet fenolik bileşik, skopolamin hidrobromür (S1875-5G) ve referans ilaç olarak kullanılan galantamin hidrobromür Sigma-Aldrich firmasından (St. Louis, Missouri, ABD) temin edilmiştir.

Tez gereçlerimizi oluşturan fenolik bileşiklerin isimleri, kimyasal yapıları ve kimyasal sınıfları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez çalışması için seçilen bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin kimyasal yapı ve sınıfları

Fenolik Bileşikler	Kimyasal Yapı	Kimyasal Sınıf
Gallik asit		Hidroksibenzoik asit
Sirinjik asit		
Vanilik asit		
D-(-)-Kinik asit		Sikloheksan karboksilik asit

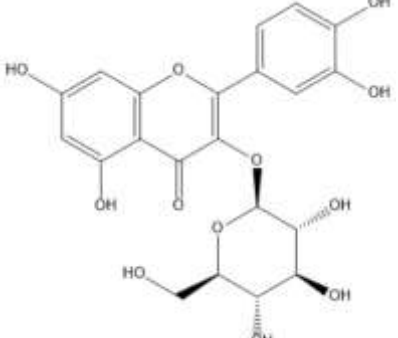
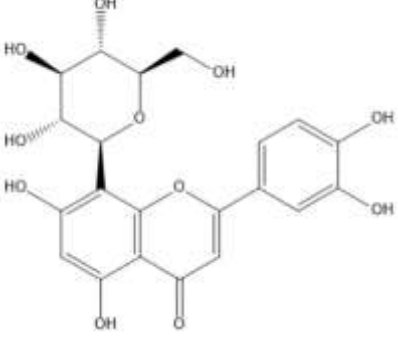
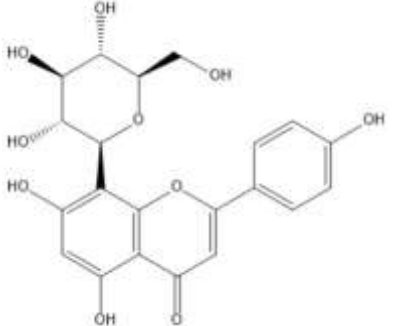
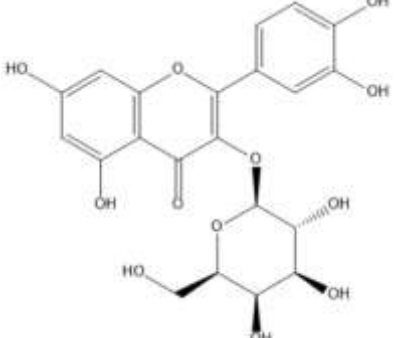
Çizelge 3.1. (devam) Tez çalışması için seçilen bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin kimyasal yapı ve sınıfları

Elajik asit		Gallik asitin dimerik türevi
Kafeik asit		Hidroksisinnamik asit
<i>p</i> -Kumarik asit		
<i>Trans</i> -Ferulik asit		
Klorojenik asit		Kafeik asit esteri
Rozmarinik asit		
<i>p</i> -Tirozol		Fenetil alkol
3-Hidroksitirozol		

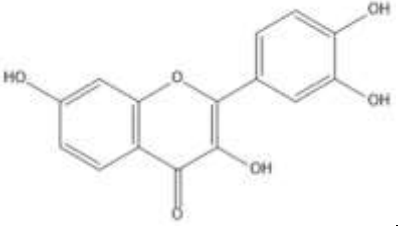
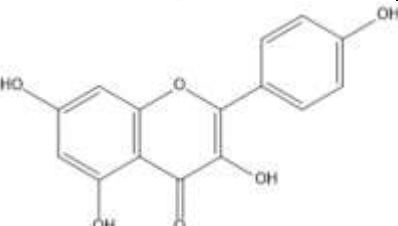
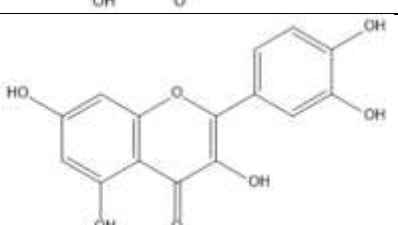
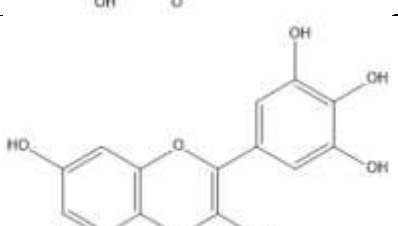
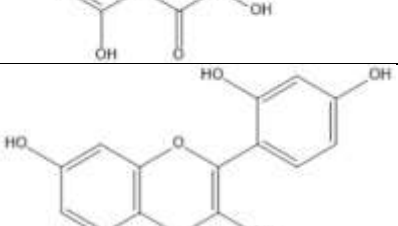
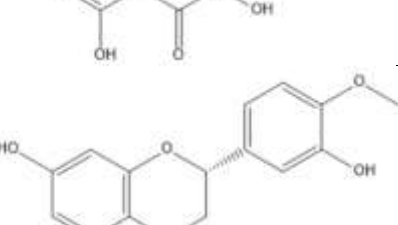
Çizelge 3.1. (devam) Tez çalışması için seçilen bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin kimyasal yapı ve sınıfları

Oleuropein		Sekoiridoit glikozit
Apigenin		Flavon
Luteolin		
Diosmetin		Metoksiflavon
Tangeretin		
Trisin		

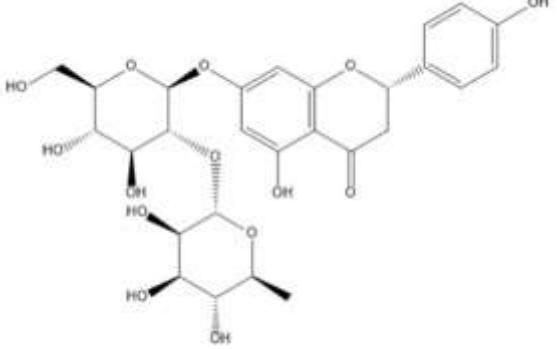
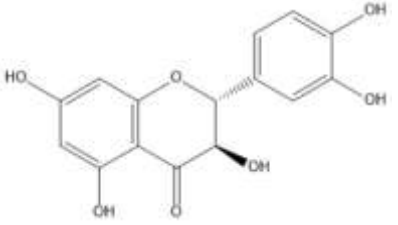
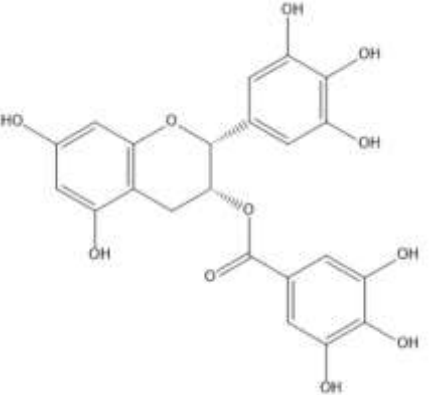
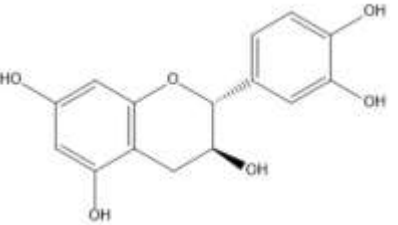
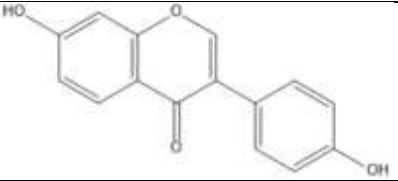
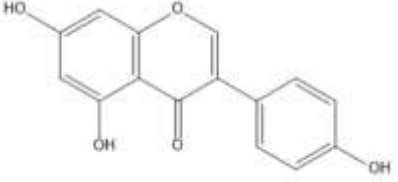
Çizelge 3.1. (devam) Tez çalışması için seçilen bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin kimyasal yapı ve sınıfları

İzokersitrin		Flavon-3-O-glikozit
Orientin		Flavon-8-C-glikozit
Viteksin		Flavon-8-C-glikozit
Hiperozit		Tetrahidroksiflavon

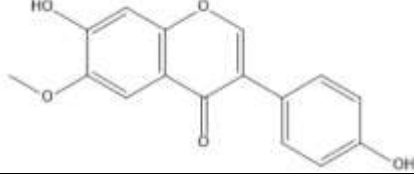
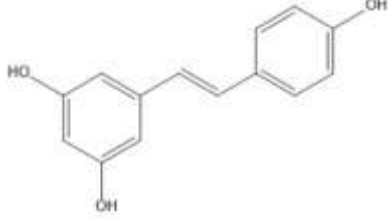
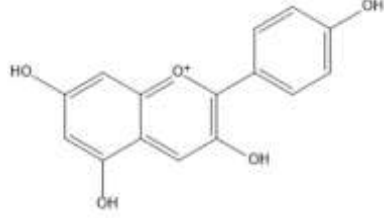
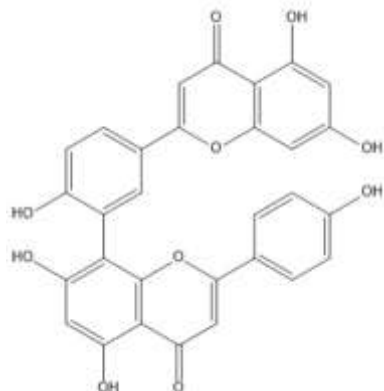
Çizelge 3.1. (devam) Tez çalışması için seçilen bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin kimyasal yapı ve sınıfları

Fisetin		Flavonol
Kemferol		
Kersetin		
Mirisetin		
Morin		
Hesperetin		Flavanon

Çizelge 3.1. (devam) Tez çalışması için seçilen bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin kimyasal yapı ve sınıfları

Naringin		Flavanon-7-O-glikozit
Taksifolin		Flavanonol
EGCG		Flavan-3-ol
Kateşin		
Daidzein		İzoflavon
Genistein		

Çizelge 3.1. (devam) Tez çalışması için seçilen bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin kimyasal yapı ve sınıfları

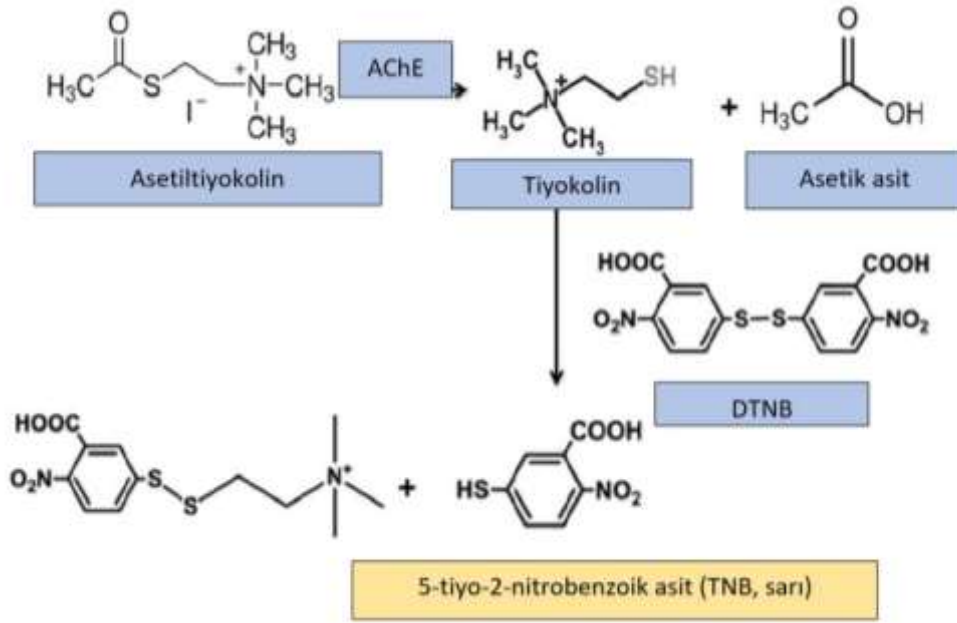
Glisitein		İzoflavon
<i>Trans</i> -Resveratrol		Stilben
Pelargonidin		Antosiyanidin
Amentoflavon		Biflavonoit

3.2. Yöntemler

3.2.1. *In vitro* yöntemler

Asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE) enzim inhibisyonu tayini

Ellman ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek AChE ve BChE inhibitör etki tayininde kullanılmıştır (Ellman ve diğerleri 1961). Yöntemin reaksiyon mekanizması Şekil 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Ellman Yöntemi reaksiyon mekanizması

AChE inhibisyonu tayininde enzim kaynağı olarak elektrikli yılan balığı (*Electrophorus electricus*) AChE'ı (Sigma, EC 3.1.1), substrat olarak asetiltiyokolin iyodür (Sigma, ABD) kullanılmış ve BChE inhibisyonu tayininde enzim kaynağı olarak at serumu BChE'ı (Sigma, ABD), substrat olarak ise bütiriltiyokolin klorür kullanılmıştır. Deneyde renklendirici madde olarak 5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit (DTNB, Sigma, ABD) kullanılmıştır. 96 Kuyucuklu mikrolakta her kuyucuğa ilk olarak 140 µL fosfat tamponu çok kanallı mikropipet (Eppendorff, Almanya) kullanılarak konulmuştur. İlk 3 ve son 3 kuyucuğa kontrol olarak 20 µL etanol eklenmiştir. Her bir fenolik maddeden (10 mM) 20 µL, 3 paralel olacak şekilde diğer kuyucuklara ilave edilmiştir. AChE veya BChE çözeltilisinden 20 µL olacak şekilde tüm kuyucuklara eklendikten sonra 25 °C'de 10 dakika (dk) boyunca bekletilmiştir (Resim 4.1.). Sonrasında tüm kuyucuklara 10 µL DTNB ve 10 µL substrat çözeltisi (asetiltiyokolin iyodür veya bütiriltiyokolin klorür) eklenerek ELISA mikrolak okuyucuda (SpectraMax i3x microplate reader, ABD) 412 nm dalga boyunda okutulmuştur. Sonuçlar Eş. 3.1'de yer alan formüle göre hesaplanmış ve % AChE/BChE inhibisyonları 3 paralel çalışmadan elde edilen sonuçların ortalaması ± standart sapma (S.S.) olarak kaydedilmiştir.

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - [(A_1/A_2) \times 100] \quad (3.1)$$

A_1 = Örnek çözeltilerinin 412 nm dalga boyundaki absorbansı

A_2 = Kontrol çözeltilerinin 412 nm dalga boyundaki ortalama absorbansı

Sonuçlar Softmax PRO 4.3.2.LS bilgisayar programı kullanılarak değerlendirilmiş ve referans ilaç olarak galantamin hidrobromür kullanılmıştır.

IC₅₀ değerlerinin hesaplanması

AChE veya BChE'ı % 50 üzerinde inhibe eden fenolik bileşiklerin sırasıyla 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM ve 0,125 mM final konsantrasyonlarında % inhibisyon değerleri hesaplanmış ve Graphpad Prism 6.01 programı kullanılarak IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Her bir inhibitör için IC₅₀ değerleri 3 paralel çalışmadan elde edilen sonuçların ortalaması \pm S.S. olarak kaydedilmiştir.

β -Sekretaz (BACE-1) inhibisyonu tayini

BACE1'in enzimatik aktivitesini ölçmek için floresans rezonans enerji transferi (FRET) teknolojisi kullanılmış, daha önce kullanılan yöntemler ve üreticinin (PanVera®) deney kitinde yer alan protokol modifiye edilerek ölçümler yapılmıştır (Youn ve diğerleri 2016). Test edilen bileşikler, insan rekombinant BACE1 (1,0 U/mL, Ph 7,5), tampon (50 mM sodyum asetat, pH 4,5) ve substrat (50 mM amonyum bikarbonat içinde Rh-EVNLDAEFK-Quencher, 75 μ M) reaksiyon kuyucuklarına eklenerek 25 °C'de 60 dk boyunca inkübe edilmiştir. Substrat hidrolizi ile üretilen floresans yoğunluğundaki artış, dalga boyları sırasıyla 545 nm (eksitasyon) ve 585 nm (emisyon) olacak şekilde floresans spektrofotometrede (SpectraMax i3x microplate reader, ABD) ölçülmüştür. İnhibisyon oranı Eş. 3.2'de verilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{ inhibisyon} = [1 - (B - B_0)/(K - K_0)] \times 100 \quad (3.2)$$

$K_0 = 0$. Dakikada kontrol grubunun floresans değeri

$K = 60$. Dakikada kontrol grubunun floresans değeri

$B_0 = 0$. Dakikada test bileşiğinin floresans değeri

$B = 60$. Dakikada test bileşiğinin floresans değeri

Antioksidan kapasite tayinleri

Demir iyonu-şelasyon etki tayini

Lantto ve diğerlerinin (2009) yönteminde bazı değişiklikler yapılarak, seçilen fenolik bileşiklerin demir iyonu-şelasyon etkisi tayin edilmiştir. Yöntem, örneklerin demir iyonu-şelasyon etkilerini tayin etmek için demir (II) ve ferrozinin, 562 nm dalga boyunda güçlü absorpsiyon veren bir kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Deneyde kullanılmak üzere 2 mM demir-II-klorür ile 5 mM ferrozin çözeltisi hazırlanmıştır. Yönteme göre; her bir örnekten ve kontrolden (etanol) 20 µL mikropipet ile alınarak 96 kuyucuklu mikroplağa konulmuş, üzerlerine 10 µL FeCl₂ ve ardından 40 µL ferrozin çözeltisi eklenmiştir. Son hacim 160 µL olacak şekilde etanol ilave edilerek, karışım 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve süre sonunda absorbans 562 nm dalga boyunda ELISA mikroplak okuyucuda (SpectraMax i3x microplate reader, ABD) okunmuştur. Örneklerin % şelasyonları Eş. 3.3'e göre hesaplanmıştır. Her örnek 3 paralel olacak şekilde çalışılmış ve sonuçlar 3 deneyden elde edilen % şelasyonların ortalaması ± S.S. olarak verilmiştir (Çizelge 4.4.) Referans madde olarak etilendiamintetraasetik asit (EDTA, Sigma) kullanılmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = [(A_1 - A_2)/A_1] \times 100 \quad (3.3)$$

A_1 = Kontrol çözeltisinin 562 nm dalga boyundaki absorbansı

A_2 = Örnek çözeltilerinin 562 nm dalga boyundaki absorbanısı

Demir-indirgeme antioksidan gücü (FRAP) tayini

FRAP değerleri, Benzie ve Strain'in (1996) yönteminde bazı değişiklikler yapılarak tayin edilmiştir. 96 Kuyucuklu mikropakta 10 mM stok konsantrasyonda hazırlanan fenolik bileşiklerden 10'ar μ L alınarak pH: 6,6; 0,2 M; 25 μ L fosfat tamponu ve 25 μ L potasyum ferrisiyanür eklenerek, 50 °C'de 20 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda 25 μ L % 10 trikloroasetik asit, 85 μ L distile su ve 17 μ L $FeCl_3$ eklenmiştir. Örnekler 30 dk daha inkübe edildikten sonra 700 nm dalga boyunda ELISA mikropak okuyucuda (SpectraMax i3x microplate reader, ABD) absorbanıslar ölçülmüştür. Bu deneyde kersetin, referans bileşik olarak kullanılmıştır. Deneyler 3 paralel olarak uygulanmış ve sonuçlar absorbanısların ortalaması \pm S.S. olarak verilmiştir.

DPPH serbest radikal süpürücü aktivite tayini

Örneklerin DPPH radikali etkisiyle koyu viyoleden açık sarı renge dönüşümünün 515 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülmesi ile tayin yapılmaktadır (Barros ve diğerleri 2007). 96 Kuyucuklu mikropığa, 10 mM konsantrasyonda hazırlanmış fenolik bileşiklerden 10'ar μ L ve taze olarak hazırlanmış 0,138 mg/mL DPPH solüsyonundan 90'ar μ L eklenmiştir. 30 dk boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilen mikropakların absorbanısları 515 nm'de ELISA mikropak okuyucuda (SpectraMax i3x microplate reader, ABD) ölçülmüştür. Kersetin referans bileşik (pozitif kontrol) olarak, etanol ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Deneyler 3 paralel olacak şekilde uygulanmış ve % süpürücü etkinin ortalaması \pm S.S. olarak kaydedilmiştir. % Süpürücü etki Eş. 3.4' e göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Süpürücü etki} = [(A_1 - A_2)/A_1] \times 100 \quad (3.4)$$

A_1 = DPPH stok çözeltilerinin 515 nm dalga boyundaki ortalama absorbanısı

A_2 = Örnek çözeltilerinin 515 nm dalga boyundaki absorbanısı

Bakır-indirgeme antioksidan gücü tayini (CUPRAC)

Bileşiklerin CUPRAC değerlerini tayin etmek amacıyla, esası bakır-neokuproin kompleksinin [Cu(II)-Nc] antioksidan etkili maddeler ile Cu(I)-Nc'e redüksiyonuna dayanan Apak ve diğerlerinin (2004) yöntemi mikropakta uygulanmak üzere modifiye edilerek uygulanmıştır. Bunun için 25 µL 10 mM CuCl₂, 25 µL 7,5 mM neokuproin, 25 µL 1 M amonyum asetat (pH: 7), 25 µL 10 mM fenolik bileşik ve 100 µL distile su 96 kuyucuklu mikropak kuyucuğunda karıştırılmıştır. Daha sonra mikropak 30 dk inkübe edilerek, süre sonunda absorbanlar 450 nm dalga boyunda ELISA mikropak okuyucuda (SpectraMax i3x microplate reader, ABD) okutulmuştur. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 3 paralel deneyden elde edilen absorbanların ortalaması ± S.S. olarak verilmiştir. Referans bileşik olarak gallik asit kullanılmıştır.

Drosophila melanogaster' de AChE ve BChE inhibitör aktivite ölçümleri

AChE ve BChE inhibisyonu aktivite ölçümleri Ellman ve ark. (1961) tarafından geliştirilen, modifiye edilmiş spektrofotometrik yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Enzim kaynağı olarak örnek numunelerinin bulunduğu besiyerinde beslenen *Drosophila melanogaster* (sirke sineği) ergin bireylerine ait kafa homojenatları kullanılmıştır. AChE inhibisyonu tayininde substrat olarak asetiltiyokolin iyodür (Sigma, ABD), BChE inhibisyonu tayininde ise substrat olarak bütiriltiyokolin klorür (Sigma, ABD) ile renklendirici madde olarak DTNB (Sigma, ABD) kullanılmıştır.

96 Kuyucuklu mikropak kuyucuğuna 110 µL distile su, 20 µL 1M tris-HCl (5 mM EDTA, pH: 8) ve 10 µL 0,5 mM DTNB (% 1'lik sodyum sitrat içinde hazırlanmış) eklenmiştir. Enzim kaynağı olarak sinek kafa homojenatından 10 µL ve AChE inhibisyonu ölçümünde substrat olarak kullanılan asetiltiyokolin iyodürden (10 mM) 50 µL kuyucuklara ilave edilerek, mikropaklardaki absorban değişimleri 412 nm dalga boyunda 5 dk boyunca 96 kuyucuklu ELISA mikropak okuyucuda (SpectraMax i3x microplate reader, ABD) okutulmuştur. BChE aktivite ölçümü için ise çözeltiler aynı şekilde kuyucuklara eklenmiş ve substrat olarak bütiriltiyokolin klorür kullanılmıştır. Her örnek 3 paralel çalışılmış ve süre sonunda 3 paralel deneyden elde edilen V_{max} değerlerinin ortalaması ± S.S. olarak verilmiştir (Yıldız, 2013).

Hücre kültürü yöntemiyle sitotoksosite tayini

MTT yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi

Kolinesteraz inhibitör etki açısından en aktif olduğu belirlenen fenolik bileşiklerin (kersetin, oleuropein, gallik asit, EGCG, rozmarinik asit ve 3-hidroksitirozol), insan nöroblastoma hücrelerinde olası sitotoksik aktivitesini belirlemek için, sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan kolorimetrik test yöntemlerinden biri olan MTT yöntemi kullanılarak hücre canlılığı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bu yöntemde, canlı hücreler MTT'yi formazana indirgeyen NAD(P)H'ye bağlı oksidoredüktaz enzimlerini içermektedir. Reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalizlenerek, mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Formazan kristallerinin çözülmesi ile elde edilen solüsyonun renk yoğunluğu spektrofotometrik ölçümle belirlenir. Formazon oluşumu yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görüldüğünden çözelti ne kadar koyu olursa, canlı yani metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı o kadar fazla olmaktadır (Mosmann, 1983).

Sitototoksik aktivitenin belirlenmesi için SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri kullanılmıştır. Hücreler, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Merve BACANLI'nın laboratuvarından temin edilmiştir. SH-SY5Y, SK-N-SH nöroblastoma hücre hattından türetilen 3 kez alt klonlanmış bir hücre hattıdır. SH-SY5Y hücreleri % 5 fetal sığır serumu (fetal bovine serum, FBS) ve % 1 penisilin-streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyerinde 37°C'de % 5 CO₂ içeren inkübatörde T25 erlenlerde kültüre edilmiştir. Hücreler yeterli birleşme (confluent) düzeyine ulaştığında, deneye alınmadan önce tripan mavisini metodu ile canlı hücre sayımı yapılmıştır (Strober, 2015). MTT yöntemi için 96 kuyucuklu plaklarda her bir kuyucuğa 6000 hücre ekilmiştir. Hücreler bir gece inkübe edildikten sonra deney tasarımına göre uygun dozlarda test edilecek bileşikler ve kontroller hücrelerle muamele edilmiştir. Test maddeleri dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözüldüğünden, negatif kontrolün yanı sıra çözücü kontrol olarak DMSO uygulanmıştır. Referans ilaç (pozitif kontrol) olarak doksorubisin (0,3-10 µM) eklenmiştir. Test edilen bileşiklerin final konsantrasyonu 1000 µM (10 – 1000 µM) olacak şekilde 5 dozda sitotoksosite açısından değerlendirilmiştir. Sitotoksik aktivite deneyi her

örnek için 3 kez, her seferinde 3'lü tekrarlar olarak çalışılmıştır. Ardından hücreler 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücrelerin üzerindeki besi yeri uzaklaştırılarak besi yeri tazelenmiş ve üzerine 1 g/L konsantrasyondaki MTT çözeltisi (50 µl) eklenmiştir. Üç saatlik inkübasyon sonrasında, kuyucuklardaki karışım uzaklaştırılıp, formazan kristallerinin çözülmesi için DMSO eklenmiştir. Mikroplak okuyucuda 570 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Çözücü kontrol % 100 canlı olarak kabul edilerek, test edilen dozların % hücre canlılıkları Graphpad Prizm v.7 yazılımı kullanılarak, doğrusal olmayan regresyon yöntemi ile hesaplanmış ve ardından IC₅₀ değerleri tayin edilmiştir.

Alamar Blue yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi

Kolinesteraz inhibitör etki açısından en aktif olduğu belirlenen fenolik bileşiklerin insan nöroblastoma hücrelerinde olası sitotoksik aktivitesini belirlemek için florometrik bir test yöntemi olan Alamar Blue yöntemi kullanılarak da hücre canlılığı değerlendirilmiştir (Erkekoğlu ve Baydar, 2021). Sitotoksik aktivitenin belirlenmesi için SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler 56 °C'de 30 dk boyunca ısıyla pasif hale getirilmiş, % 10'luk FBS ile desteklenmiş ve % 1 penisilin-streptomisin içeren DMEM/besin karışımı F-12 besiyerinde muhafaza edilmiştir. Hücreler 37 °C'de % 5 CO₂ ve % 95 nem oranına sahip steril bir inkübatörde kültüre edilmiştir. Tam besiyerindeki (100 µl) 10000 SH-SY5Y hücresi 96 kuyucuklu plağın her bir kuyusuna ekilmiş ve yüzeye tutunmaları için 16-24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler DMSO içinde çözülmüş fenolik bileşiklerin (gallik asit, rozmarinik asit, kersetin, EGCG, fisetin, 3-hidroksitirozol, oleuropein ve *trans*-resveratrol) farklı konsantrasyonları (0-400 µM) ile muamele edilmiş ve % 5 CO₂ ile 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir kuyucuğa filtre ile sterilize edilmiş 10 µl % 0,015 resazurin çözeltisi (Sigma-Aldrich, R7017) eklenerek, 37 °C'de % 5 CO₂ ile 2 saat inkübe edilmiştir. 560 nm dalga boyunda eksitasyon ve 590 nm dalga boyunda emisyon floresan ölçümleri yapılmış ve kontrol grubuna kıyasla % hücre canlılığı hesaplanmıştır (Eilenberger ve diğerleri 2018).

Seçilen fenolik bileşiklerin AH ile ilişkilendirilen bazı genler üzerinde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real time/RT-PCR) yöntemi ile ekspresyon analizi

RNA izolasyonu ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real time/RT-PCR)

SH-SY5Y hücreleri 24 saat boyunca gallik asit, rozmarinik asit, kersetin, EGCG, fisetin, 3-hidroksitirozol, oleuropein ve *trans*-resveratrol ile muamele edilmiş ve RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyon protokolünde, hücre pelletleri 1 mL trizol reaktifi kullanılarak homojenize edilmiş ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. Kloroform (200 µl)/trizol (1 mL) eklenmiş, karışım kuvvetlice çalkalanmış ve oda sıcaklığında 3 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra karışım +4 °C'de 10000 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj edilmiş ve üstteki renksiz faz RNaz içermeyen bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Tüpe isopropanol (500 µL)/trizol (1 mL) eklenerek, karışım oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilip 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet en az 1 mL % 75 etanol/1 mL trizol ile yıkanmış ve +4°C'de 7500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Tüm süpernatant tüpten çıkarıldıktan ve pellet havada kurutulduktan sonra, RNA içeren pelet yaklaşık 100 µl nükleaz içermeyen suda çözülmüş ve 55 °C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Uzun süreli saklama için RNA - 80 °C'de saklanmıştır.

cDNA sentezi abm, OneScript® Plus cDNA sentez kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kit ile birlikte verilen protokolda belirtildiği gibi, 2000 ng/µl RNA, 1 µl dNTPS, 1 µl oligo (dT) primer ve 13 µl'ye kadar nükleaz içermeyen su içeren karışım hazırlanmış ve 65 °C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Karışım buz üzerinde 1 dk inkübe edildikten sonra, tüpe 4 µl 5X RT tamponu ve 1 µl OneScript® Plus RTase eklenmiştir. Tüm karışım 50 °C'de 50 dk ve 85 °C'de 5 dk inkübe edilmiştir. cDNA uzun süreli saklama için - 20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Real time (RT)-PCR; abm, BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix ve CFX Connect RT-PCR sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.2.'de belirtilen toplam 14 genin (*APP*, *PSEN1*, *ABCA7*, *APOE*, *CLU*, *PICALM*, *BIN1*, *CD2AP*, *CR1*, *CD33*, *SORL1*, *MMP9*, *TNF* ve *CCL5*) gen ifade düzeyindeki değişim β-aktin ile normalize edilmiştir (Karch ve diğerleri 2014). Kontrol grubu olarak fenolik bileşiklerin çözücüsü olan DMSO kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Gene özgü primer dizileri ve primer yapışma sıcaklıkları

Genler*	İleri Sekans	Geri Sekans	Primer Yapışma Sıcaklığı (annealing) (°C)
<i>APP</i>	<i>GCCCTGCGGAATTGACAAG</i>	<i>CCATCTGCATAGTCTGTGTCTG</i>	62
<i>PSEN1</i>	<i>GCAGTATCCTCGCTGGTGAAGA</i>	<i>CAGGCTATGGTTGTGTTCCAGTC</i>	54,5
<i>ABCA7</i>	<i>CACTCTTCCGAGAGCTAGACAC</i>	<i>CTCCATATCTGTGTCCGCAGCA</i>	54,5
<i>APOE</i>	<i>GGGTCGCTTTTGGGATTACCTG</i>	<i>CAACTCCTTCATGGTCTCGTCC</i>	54,5
<i>CLU</i>	<i>TGCGGATGAAGGACCAGTGTGA</i>	<i>TTTCTGGTCAACCTCTCAGCG</i>	54,5
<i>PICALM</i>	<i>GGCAGCATTAGAGGAAGAACAGG</i>	<i>CTGCTGAGGTGGATACAGGAGA</i>	54,5
<i>BIN1</i>	<i>CGTCAACACGTTCCAGAGCATC</i>	<i>CTTGACCGTGAAGGTGTTGCTC</i>	54,5
<i>CD2AP</i>	<i>CCAAAGCCTGAAGTATAGCTGC</i>	<i>GGACTTGTGGAGCTGCTGGTTT</i>	54,5
<i>CR1</i>	<i>TAGGTGTCAGCCTGGCTTTGTC</i>	<i>GACATCTGGAGGTGGCTGACAT</i>	54,5
<i>CD33</i>	<i>GTGACTACGGAGAGAACCATCC</i>	<i>GCTGTAACACCAGCTCCTCAA</i>	54,5
<i>SORL1</i>	<i>GAACACCTGTCTTCGCAACCAG</i>	<i>TGTCCAGGTCACAGATGGTGGT</i>	54,5
<i>MMP9</i>	<i>GGGACGCAGACATCGTCATC</i>	<i>TCGTCATCGTCGAAATGGGC</i>	62
<i>TNF</i>	<i>TGGGATCATTGCCCTGTGAG</i>	<i>GGTGTCTGAAGGAGGGGGTA</i>	62
<i>CCL5</i>	<i>CAGTCGTCTTTGTACCCGA</i>	<i>AGAGCAAGCAGAAACAGGCA</i>	62
<i>β-Aktin</i>	<i>GCCGCCAGCTCACCAT</i>	<i>GATGCCTCTTGTCTGGG</i>	59

*APP: amiloit öncü proteini; *PSEN1*: *presenilin1*; *ABCA7*: ATP Bağlayıcı Kaset Alt Ailesi A Üyesi 7; APOE: apolipoprotein E; CLU: Klusterin; *PICALM*: fosfatidilinositol bağlayıcı klaterin montaj proteini; *BIN1*: Köprüleme entegratörü 1; *CD2AP*: CD2-ilişkili protein; *CR1*: kompleman reseptörü tip 1; *CD33*: Sialik asit-bağlayıcı immüoglobulin-lektin 3; *SORL1*: sortilin-ilişkili reseptör 1; *MMP9*: matriks metalloproteinaz-9; *TNF*: tümör nekroz faktör; *CCL5*: kemokin C-C (motif) ligant 5

3.2.2. *In vivo* yöntemler

Antiamnezik aktivite tayini

Enzim inhibisyon deneylerinde aktif bulunan fenolik bileşiklerin bazılarının hafıza üzerindeki etkileri, AH için önerilen *in vivo* deney modellerinden biri olan farelerde pasif kaçınma testi (passive avoidance test) ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla aralarında giyotin kapı (5 × 5 cm) bulunan, aydınlık ve karanlık olmak üzere eşit iki bölmeden (20 × 20 × 20 cm) oluşan bir aparat (step-through type, Ugo-Basile Biological Research Apparatus, Comerio, Italy, Cat. No. 7550) kullanılmıştır. Tabanında 2 mm kalınlık ve 1 cm aralıklı paslanmaz çelik telden meydana gelen ızgara bulunan aparatın aydınlık bölmesi 100 watt'lık bir ampulle aydınlatılmıştır. Gazi Üniversitesi, Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezinden (GÜDAM) satın alınan 64 adet erkek Swiss albino farenin (35-45 g), Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi bünyesindeki Deney Hayvanları Bakım ve Deneysel Araştırmalar Ünitesinde bir hafta boyunca adaptasyon süreci tamamlanmış ve bir hafta

sonunda fareler rastgele, her grupta 8 fare olacak şekilde 8 gruba ayrılmıştır; A- (% 0,9 NaCl-SHAM), B-(skopolamin hidrobromür-kontrol grubu), C-(oleuropein), D-(3-hidroksitirozol), E-(gallik asit), F-(rozmarinik asit), G-(EGCG) fenolik bileşik grupları ve referans H-(galantamin hidrobromür) grubu oluşturulmuştur (Resim 3.1.). Öğrenme/edinim (acquisition) periyodunda fareler önce aydınlık bölme konulmuş, 10 sn sonra giyotin kapı açılmış ve farelerin karanlık bölme geçiş süresi ölçülmüştür (Çizelge 4.12.; Resim 3.2.). Karanlık bölme geçtikten sonra giyotin kapı kapanmış ve farelerin ayaklarına 3 sn boyunca 0,1 mA/10 g/vücut ağırlığı (v.a.) olacak şekilde elektrik akımı uygulanmıştır (Orhan ve Aslan, 2009). Öğrenme periyodundan hemen sonra A grubuna (SHAM) sadece % 0,9 NaCl; C, D, E, F, G gruplarına sırasıyla % 0,9 NaCl içinde 20 mg/kg dozlarda olacak şekilde hazırlanmış olan oleuropein, 3-hidroksitirozol, gallik asit, rozmarinik asit ve EGCG *i.p.* yolla; H grubuna ise 10 mg/kg dozda, referans ilaç galantamin hidrobromür *s.c.* yolla enjekte edilmiştir (De Bruin ve Pouzet, 2006). B, C, D, E, F, G ve H gruplarına 30 dk sonra skopolamin hidrobromür 1 mg/kg dozda, % 0,9 NaCl içinde çözülerek *i.p.* yolla uygulanmış ve amnezi oluşturulmuştur (Orhan ve Aslan, 2009). Bu uygulamadan 24 saat sonra fareler tekrar aydınlık bölme yerleştirilmiş ve giyotin kapı açıldıktan sonra karanlık bölme geçiş zamanı (latency time) ölçülmüştür (Çizelge 4.12.). Karanlık bölme 9 dk (cut off time) içinde girmeyen farelerin pasif kaçınmayı hatırladıkları sonucuna varılmıştır. İstatistiksel değerlendirmeler tek yönlü ANOVA yöntemi ile GraphPad Prism 6.01 yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Deneyler Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından verilen 66332047-604.01.02 sayılı etik kurul izni doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.



Resim 3.1. Antiamnezik aktivite tayininde kullanılmak üzere gruplara ayrılmış erkek Swiss albino fareler



Resim 3.2. Pasif kaçınma testi düzeneği

Drosophila melanogaster nöroprotektif etki modeliyle aktivite tayini

Kullanılan Drosophila melanogaster soyu

Bu çalışma kapsamında kullanılan *Drosophila melanogaster* Berlin-K soyu, yabancı bir soy olup gerek nörodejeneratif hastalıklar gerekse *Drosophila* ile yapılan diğer çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir soy hattıdır. Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Fonksiyonel ve Evrimsel Genetik Laboratuvarı bünyesinde bulunan bu soy ile, *Drosophila melanogaster* AChE genotiplerini çalışmak üzere yukarıda belirtilen *in vitro* çalışmalarda belirlenen fenolik bileşiklerin uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

Stokların muhafaza edilmesi, çoğaltılması ve kafa homojenatlarının hazırlanması

Soyun stokları ve deneysel çapraz setleri 25 ± 1 °C'deki sabit sıcaklık, ortalama % 65 bağıl nem ve 12 saatlik gece-gündüz döngüsü sağlayan iklim odasında, 16 gün aralıklarla transfer edilerek muhafaza edilmiştir. Stoklar ve deneysel çaprazlar standart *Drosophila* besiyerini içeren (Markow ve O'Grady, 2005) tüpler ve şişelerde gerçekleştirilmiştir. *In vitro* AChE ve BChE inhibisyon tayini sonucu aktif olduğunu belirlediğimiz fenolik bileşiklerden gallik asit, 3-hidroksitirozol ve kersetin, ayrıca galantamin hidrobromür (pozitif kontrol) ve etanol (negatif kontrol) larvaların beslenmesi için seçilmiştir. Graf ve diğerleri (1984) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek; bu bileşiklerle beslenecek aynı yaştaki larvaları elde etmek için, standart *Drosophila* besiyerinde ön stoklar oluşturulmuştur (Graf ve diğerleri 1984). Bu stoklardan gelen 5-7 günlük dişi ve erkek bireylerin, yeni kültür şişelerinde bir araya konularak 8 saat süresince yumurta bırakmaları sağlanmıştır (Resim 3.3.). Üçüncü evre larvalar bu şişelerin 72 saat sonunda ince gözenekli elekte yıkanmasıyla elde edilmiştir (Resim 3.4.). 72 ± 4 yaştaki larvalar hazır olduğunda, seçilen fenolik bileşikler için literatür ile belirlenen 2'şer konsantrasyon ve galantamin için 4 konsantrasyon (Çizelge 3.3.) hazırlanmış ve tüm bileşikler % 1 konsantrasyonda % 96'lık etanolde çözülmüştür. 2,5x7,5 cm ölçülerindeki cam tüplere birer ölçü (4,5 g) *Drosophila* hazır besiyeri (Carolina- Formula 4-24-*Drosophila* Instant Medium) konulmuş, fenolik bileşikler ve galantaminin farklı konsantrasyonlarıyla (9'ar mL) ıslatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan her bir tüpe eleklerde ayrılmış larvalardan bir küçük spatül dolusu (yaklaşık 50 larva) konulmuş ve tüplerin ağızları sünger tıplarla kapatılmıştır. Tüm tüpler 25 ± 1 °C' deki sabit sıcaklık kabinine kaldırılmıştır. Üçüncü evre larvalar fenolik bileşik ve galantamin hidrobromür ile hazırlanmış besiyerlerinde pupa evresine kadar yaklaşık 48 saat beslenerek kronik şekilde uygulanan bileşiklere maruz bırakılmıştır (Resim 3.5.).

Çizelge 3.3. 72 saat/yaştaki *Drosophila melanogaster* larvalarının beslendiği fenolik bileşik ve pozitif kontrol konsantrasyonları

Fenolik bileşikler ve pozitif kontrol	72 Saat/yaştaki <i>Drosophila</i> larvalarının beslendiği konsantrasyonlar	Kaynaklar
Gallik asit	0,5 mM, 1,5 mM	(Gomes ve diğerleri 2020) (Cha ve diğerleri 2019) (Nagpal ve Abraham, 2017) (Ortega-Arellano ve diğerleri 2013)
3-Hidroksitirozol	20 µM, 100 µM	(Anter ve diğerleri 2014)
Kersetin	50 µM, 150 µM	(Nagpal ve Abraham, 2017) (Singh ve diğerleri 2011) (Gupta ve diğerleri 2007)
Galantamin hidrobromür	20 µM, 1mM, 2 mM, 10 mM	(Siddique ve diğerleri 2023) (Siddique ve diğerleri 2022) (Zarotsky ve diğerleri 2003)



Resim 3.3. Fenolik bileşikler ile beslenmiş 5-7 günlük dişi ve erkek bireyler



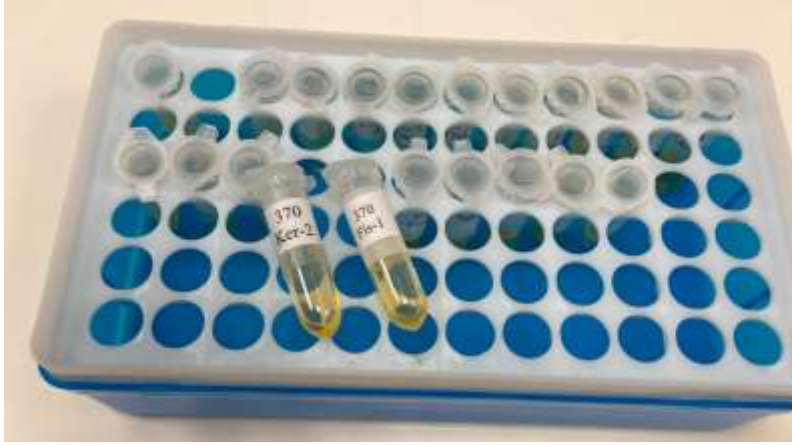
Resim 3.4. Üçüncü evre larvaların ince gözenekli elekte yıkanması



Resim 3.5. Üçüncü evre larvaların fenolik bileşiklerin 2 konsantrasyonu ile hazırlanan besiyerinde pupa evresine kadar beslendiği tüpler

Fenolik bileşiklere 48 saat boyunca maruz bırakılarak beslenen *D. melanogaster* larvaları pupa evresinden ergin evreye geçtikleri ilk gün CO₂ ile bayıltılarak, her konsantrasyon için 15 birey olacak şekilde Eppendorf tüplerine alınmış ve – 80 °C'deki dondurucuya konulmuştur.

D. melanogaster Berlin-K soyu için uygulama grubunda (3 fenolik bileşik x 2 farklı konsantrasyon x 15 birey: 90 birey), negatif kontrol (etanol: 15 birey), referans (galantamin hidrobromür: 15 birey), toplamda 120 adet *D. melanogaster* ergin kafası elde edilmiştir. -80°C'de dondurulmuş *Drosophila* kafaları buz üzerinde disekte edildikten sonra, sıvı azot içeren havana aktarılıp ezilmiştir. Kafaların gramı başına 10 mL % 0,5 Triton X-100 içeren 0,1 M fosfat tamponu (pH: 7,4) eklenip, +4 °C'de 13 000 rpm hızda 15 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar, enzim kaynağı olarak kullanılmak üzere steril tüplere alınıp Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Fonksiyonel ve Evrimsel Genetik Laboratuvarından soğuk zincir ile Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Laboratuvarına transfer edilmiş (Resim 3.6.) ve *in vitro* AChE ve BChE inhibitör aktivite tayininde kullanılmıştır.



Resim 3.6. Enzim kaynağı olarak kullanılan, steril tüplere konulmuş süpernatantlar

Zebra balığı davranış modellerinde nöroprotektif etki tayini

Tez deneylerimizin *in vitro* ve *in vivo* (farelerde) aşamalarında aktif olduğunu belirlediğimiz ve elimizde yeterli miktarda bulunan fenolik bileşiklerin hafıza üzerindeki etkileri, tezimizdeki *in vivo* deney modellerinden diğeri olan zebra balığı (*Danio rerio*) davranış modelleri kullanılarak, Iasi Alexandru Ioan Cuza Üniversitesi, Biyoloji Fakültesi, Biyoloji Bölümü Laboratuvarında (Romanya) gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla çalışmanın başlangıcında, her 2 cinsiyetten eşit sayıda, 3-4 aylık ve 3-4 cm uzunluğunda 90 adet yetişkin zebra balığının wild-type short-fin suşu yetkili bir ticari tedarikçiden (Iasi, Romanya) satın alınmıştır. En az 14 gün boyunca deney ortamına alıştıırılan zebra balıkları 10'arlı gruplar halinde, Tetrattec® hava pompaları (Tetra, Melle, Almanya) ile su filtrasyonu ve

havalandırmanın (7,20 mg O₂/L) yapıldığı 24 L termostatlı (26 ± 1 °C) tanklarda tutulmuştur. Hayvanlar 14/10 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulmuş ve günde 2 kez Norwin Norvitall marka balık yemi (Norwin, Gadstrup, Danimarka) ile beslenmiştir. Davranışsal çalışmalarda, zebra balığı için güvenli dozlar belirlenerek, ortama alıştırmış zebra balıkları rastgele olarak kontrol, EGCG (EG, 3 µg/L), fisetin (FS, 3 µg/L), oleuropein (OP, 3 µg/L), rozmarinik asit (RA, 3 µg/L), kersetin (QC, 3 µg/L), 3-hidroksitirozol (3HT, 3 µg/L), gallik asit (GA, 3 µg/L) ve *trans*-resveratrol (RV, 3 µg/L) olacak şekilde gruplandırılmıştır. Seçilen fenolik bileşikler (3 µg/L) % 1 DMSO çözeltisinde çözülmüş ve zebra balıklarına 8 gün boyunca günde bir kez 1 saat süreyle daldırılarak uygulanmıştır. Kontrol grubu sadece % 1 DMSO çözeltisi içeren klorsuz suya daldırılmıştır. Tüm deneyler Iasi Alexandru Ioan Cuza Üniversitesi, Biyoloji Fakültesi (Iasi, Romanya) Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından verilen 1714/6.07.2023 sayılı etik kurul izni doğrultusunda gerçekleştirilmiş ve hayvanların güvenliğine ilişkin 22 Eylül 2010 tarihli ve 2010/63/EU sayılı Avrupa Parlamentosu ve Avrupa Konseyi Direktifine tam olarak uyulmuştur. Araştırmaya katılan tüm hayvanların sağlık durumu ve refahı davranış testleri sırasında düzenli olarak test edilmiştir. Uygulanan deneysel prosedürler, zebra balıklarında ciddi acıya veya uzun süreli hasara neden olmamıştır ve deneysel prosedürler sırasında hiçbir balık ölmemiştir.

Yeni tank dalış testi-YTT (Novel Tank Diving Test)

Cachat ve diğerleri (2010) tank dalış testini zebra balıklarında hem lokomotor aktiviteyi hem de anksiyete tepkisini değerlendirmek için özel bir test olarak tanımlamıştır. İkizkenar yamuk şeklinde, 1,5 L'lik bir tank (15,2 x 27,9 x 7,1 cm) sanal bir yatay çizgi ile üst ve alt kısımlara ayrılmıştır (Resim 3.7.). Her bir zebra balığının hareket ve keşif davranışları 6 dk boyunca test edilmiş ve ANY-maze® yazılımı (Stoelting Co., Wood Dale, IL, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. İncelenen parametreler, üst bölgede geçirilen süre (s), üst/alt oranında geçirilen süre, kat edilen toplam mesafe (m) ve hız (m/s) olmuştur.



Resim 3.7. Yeni tank dالیş testi düzeneği

Y-labirent testi (Y-Maze test)

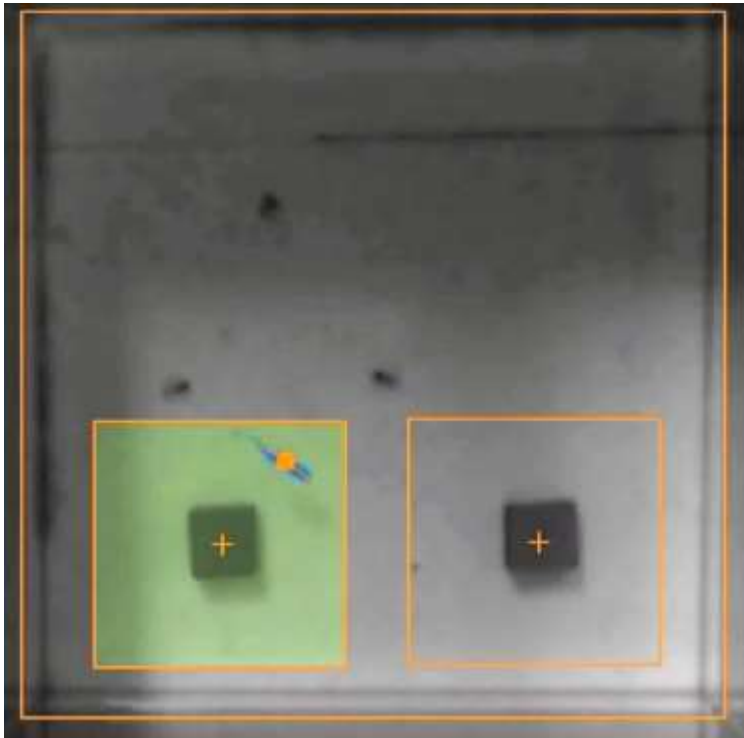
Y-labirent testi, zebra balıklarının yeniliğe verdikleri tepkileri ve lokomotor aktiviteyi değerlendirmek için kullanılmaktadır (Boiangiu ve diğerleri 2022). Her bir zebra balığı, "başlangıç" kolu (her zaman açık), "yeni" kol (test denemesi sırasında açık) ve sürekli açık kol olarak tasarlanmış üç kolu (25 x 8 x 15 cm) olan Y şeklinde bir cam akvaryumda (3 L) uyum sürecinden geçirilmiştir (Resim 3.8.). Balıklar başlangıç koluna tek tek yerleştirilmiş ve yeni kol ilk eğitim seansı (5 dk) için kapatılmıştır. İkinci eğitim seansı (5 dk) 1 saat sonra başlamış ve balıklar bir kez daha başlangıç koluna yerleştirilmiş ve yeni kol açılmıştır. Yeni kolda geçirilen süre (toplam kol süresinin %'si) yeniliğe verilen tepkiyi (yeni kolun kilidi açıldığında cihaza yerleştirilen balığın tepkisi), spontan değişim (%) ise kısa süreli hafızayı değerlendirmek için kullanılırken; toplam kat edilen mesafe (m) ve dönüş açısı (°) lokomotor aktivite karakterizasyonu için kullanılmıştır. Videolar ANY-maze® yazılımı (Stoelting Co., Wood Dale, IL, ABD) ile analiz edilmiştir.



Resim 3.8. Y-labirent testi düzeneği

Yeni nesne tanıma testi-YNT (Novel object recognition test)

Zebra balığının hafıza yeteneğini incelemek için YNT testi kullanılmıştır (Capatina ve diğerleri 2021). Alışma aşamasında, zebra balığına 3 gün süreyle, nesnelerin yokluğunda 5 dk boyunca yeni tanka (30 x 30 x 30 cm) alışma süresi verilmiştir. Zebra balığı, eğitim aşaması için 4. gün 10 dk süreyle benzer iki nesneye maruz bırakılmıştır (Resim 3.9.). Eğitim aşamasından bir saat sonra, iki benzer nesneden (tanıdık nesneler, TN) biri yeni bir nesne (YN) ile rastgele değiştirilmiş ve etkileşim 10 dk boyunca gözlemlenmiştir (test aşaması). Tercih yüzdeleri şu şekilde hesaplanmıştır: $[YN_{\text{keşif zamanı}}/TN_{\text{keşif zamanı}} + YN_{\text{keşif zamanı}} \times 100]$. Davranış sonuçları, ANY-maze® yazılımı (Stoelting Co., Wood Dale, IL, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir.



Resim 3.9. Yeni nesne tanıma testi düzeneği

Zebra balığı deneyleri için istatistiksel değerlendirme

Sonuçları ifade etmek için ortalama \pm S.S. kullanılmıştır. GraphPad Prism v. 9.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, ABD), çoklu karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey's *post hoc* analizini de içeren istatistiksel analizleri yürütmek için

kullanılmıştır. Veri dağılımının normalliği Shapiro-Wilk-Testi kullanılarak değerlendirilmiştir. $p < 0,05$ olduğunda, istatistiksel anlamlılığın mevcut olduğu kabul edilmiştir.

3.2.3. *In silico* yöntemler

In silico biyolojik aktivite tayini

Biyolojik aktivite tahminleri, maddeler için aktivite spektrumu tahmini (Prediction of Activity Spectra for Substances, PASS) programı kullanılarak değerlendirilmiştir. PASS programında hafıza güçlendirici etkiyi sağlamada rol oynayabilecek biyolojik aktiviteler temel alınarak fenolik bileşiklerin P_a (aktif olma olasılığı) ve P_i (inaktif olma olasılığı) değerleri belirlenmiş, (P_a-P_i) değerlerine göre etki sıralaması yapılmıştır. Bileşikler PASS yazılımına basitleştirilmiş moleküler girdi hattı giriş sistemi kullanılarak girilmiştir.

In silico toksisite tayini

Belirlenen fenolik bileşiklere ait toksisite tahminlerinde PASS programından yararlanılmıştır. Toksikite tahmininde en yüksek olasılıktaki ilk 3 advers/toksik etki raporlanmıştır. Bileşikler PASS yazılımına basitleştirilmiş moleküler girdi hattı giriş sistemi kullanılarak girilmiştir.

Moleküler kenetlenme çalışmaları

Moleküler kenetlenme çalışmaları, Schrödinger Small-Molecule Drug Discovery Suite 2023-1 (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RCSB Protein Data Bank (PDB) veri tabanından insan AChE (PDB kodu: 4EY7), BChE (PDB kodu: 4TPK) ve BACE1 (PDB kodu: 2WJO) X-ışını kristal yapısı indirilmiş, Schrödinger programının Protein Preparation Wizard modülü kullanılarak hazırlanmıştır (Bao ve diğerleri 2023; Brus ve diğerleri 2014; Cheung ve diğerleri 2012). Hazırlık aşamasında hidrojen atomları eklenmiş, eksik veya yanlış atom tipleri düzeltilmiş ve su molekülleri silinmiştir. Sıvı simülasyonları için optimize edilmiş potansiyel (optimized potential for liquid simulations, OPLS4) kuvvet alanı uygulanarak, kök ortalama kare sapma (root mean square deviation, RMSD) değeri en fazla 0.3 Å olacak şekilde enerji minimizasyonu yapılmıştır. Enzim X-ışını kristal yapısına bağlı

inhibitör molekül seçilerek, inhibitörün çevresinde aktif bölgeyi koordinatlarıyla tanımlayan 20 Å'luk bir kutu (grid), "receptor grid generation" paneli ile oluşturulmuştur. Bu aşamada kuvvet alanı olarak yine OPLS4 kullanılmış, van der waals ölçeklendirme faktörü 0.80 ve yük parçalı kesme noktası 0,15 olarak tanımlanmıştır. Elde edilen reseptör, grid dosyaları moleküler modelleme çalışmasında kullanılmak üzere kaydedilmiştir. Moleküler modelleme işlemi, X-ışını yapısında bulunan inhibitörün yeniden kenetlenmesiyle (RMSD 0.8427 Å) doğrulanmıştır. Seçilen bileşikler, Schrödinger programının Maestro ara yüzünde çizilmiş ve LigPrep (Schrödinger Release 2023-1: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023) modülü ile varsayılan değerler kullanılarak 3 boyutlu yapıları hazırlanmıştır. Moleküller önceden kaydedilen grid dosyası üzerinden Schrödinger programının Glide modülü ile enzim aktif bölgesine ekstra hassasiyet (Extra Precision, XP) algoritması kullanılarak yerleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar GlideScore değerleri temel alınarak incelenip, moleküllere ait uygun bağlantı modları belirlenmiştir (Friesner ve diğerleri 2006).

4. BULGULAR

4.1. AChE ve BChE Enzim İnhibisyonuna Ait Bulgular

Tez çalışmamızda kullanılan fenolik bileşiklerin ve galantamin hidrobromürün (referans ilaç) 1 mM final konsantrasyonda AChE ve BChE inhibitör etkilerine ait % inhibisyon değerleri Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Fenolik bileşiklerin AChE ve BChE inhibitör etkileri (% İnhibisyon \pm S.S.^a, 1 mM final konsantrasyon)

Fenolik Bileşikler	Enzim İnhibisyonu (% İnhibisyon \pm S.S. ^a) 1 mM ^b	
	AChE	BChE
Gallik asit	79,23 \pm 0,54	84,4 \pm 2,25
Sirinjik asit	2,39 \pm 4,18	17,56 \pm 4,24
Vanilik asit	- ^c	35,06 \pm 3,21
D-(-)-Kinik asit	5,44 \pm 4,0	5,84 \pm 4,60
Elajik asit	-	-
Kafeik asit	57,33 \pm 4,54	47,82 \pm 2,75
<i>p</i> -Kumarik asit	-	5,15 \pm 3,96
<i>Trans</i> -Ferulik asit	6,26 \pm 2,55	-
Klorojenik asit	18,67 \pm 1,76	25,35 \pm 1,72
Rozmarinik asit	69,99 \pm 1,84	68,91 \pm 4,51
<i>p</i> -Tirozol	-	35,58 \pm 3,54
3-Hidroksitirozol	62,40 \pm 0,68	94,35 \pm 2,40
Oleuropein	84,10 \pm 3,11	90,54 \pm 2,51
Apigenin	76,97 \pm 1,50	-
Luteolin	-	-
Diosmetin	-	18,04 \pm 2,07
Tangeretin	-	9,97 \pm 4,09
Trisin	-	10,48 \pm 4,13
İzokersitrin	43,17 \pm 1,65	31,77 \pm 0,39
Orientin	-	-
Viteksin	17,32 \pm 2,77	23,14 \pm 3,30
Hiperozit	27,13 \pm 1,28	-
Fisetin	96,21 \pm 0,06	76,19 \pm 2,48
Kemferol	30,91 \pm 1,83	-
Kersetin	80,98 \pm 1,24	99,4 \pm 0,76
Mirisetin	-	-
Morin	9,72 \pm 0,96	2,81 \pm 3,83
Hesperetin	19,19 \pm 2,75	25,58 \pm 3,92
Naringin	4,27 \pm 4,28	14,94 \pm 0,13
Taksifolin	50,43 \pm 1,12	14,36 \pm 1,71
EGCG	69,11 \pm 3,91	84,43 \pm 0,86
Kateşin	-	-
Daidzein	-	32,15 \pm 3,45
Genistein	13,05 \pm 0,50	-
Glisitein	-	29,77 \pm 0,01
<i>Trans</i> -Resveratrol	54,0 \pm 3,59	53,21 \pm 5,13
Pelargonidin	34,25 \pm 0,50	25,29 \pm 4,13
Amentoflavon	-	-
Galantamin hidrobromür ^d	98,34 \pm 0,72	87,22 \pm 2,08

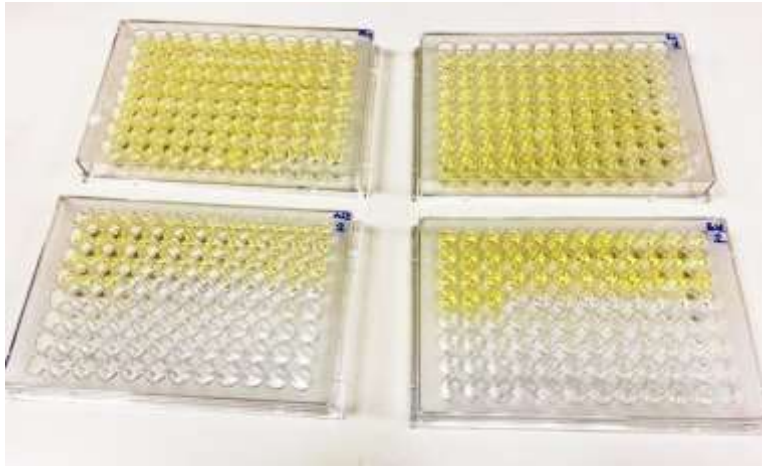
^a Standart sapma (n: 3), ^b Final konsantrasyon, ^c İnhibisyon gözlenmedi, ^d Referans (1 mM)

AChE ve BChE'ı % 50 üzerinde inhibe eden fenolik bileşikler ve galantaminin IC₅₀ değerleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. AChE'a karşı fenolik bileşikler ve galantaminin IC₅₀ değerleri

Fenolik Bileşikler	AChE İnhibisyonu (IC ₅₀ ± S.S. ^a , mM ^b)	BChE İnhibisyonu (IC ₅₀ ± S.S. ^a , mM ^b)
Gallik asit	0,427 ± 0,007	0,318 ± 0,059
Kafeik asit	0,383 ± 0,067	- ^c
Rozmarinik asit	0,308 ± 0,050	0,614 ± 0,009
3-Hidroksitirozol	0,456 ± 0,027	0,610 ± 0,019
Oleuropein	0,539 ± 0,035	0,648 ± 0,103
Apigenin	0,367 ± 0,002	-
Fisetin	0,124 ± 0,124	0,962 ± 0,081
Kersetin	0,122 ± 0,079	0,323 ± 0,024
Taksifolin	0,718 ± 0,205	-
EGCG	0,412 ± 0,101	0,516 ± 0,031
<i>Trans</i> -Resveratrol	0,519 ± 0,283	0,987 ± 0,101
Galantamin hidrobromür ^d	0,00018 ± 0,000005	0,025 ± 0,001

^a Standart sapma (n: 3), ^b Final konsantrasyon, ^c Test edilmedi, ^d Referans



Resim 4.1. 96 kuyucuklu mikropakta *in vitro* kolinesteraz enzim inhibisyonu tayini

4.2. BACE1 İnhibisyonuna Ait Bulgular

Seçilen fenolik bileşiklerin 1 mM final konsantrasyonda BACE1 inhibitör etkilerine ait % inhibisyon ve BACE1'i % 50 üzerinde inhibe eden fenolik bileşiklerin IC₅₀ değerleri Çizelge 4.3.'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Seçilen fenolik bileşiklerin 1 mM final konsantrasyonda BACE-1 inhibitör etkileri (% İnhibisyon \pm S.S.^a; IC₅₀ \pm S.S.^a)

Fenolik Bileşikler	β -Sekretaz İnhibisyonu (% İnhibisyon \pm S.S. ^a , 1 mM ^b)	β -Sekretaz İnhibisyonu (IC ₅₀ \pm S.S. ^a , mM ^b)
Gallik asit	27,51 \pm 2,97	- ^c
Rozmarinik asit	67,04 \pm 0,64	0,406 \pm 0,068
3-Hidroksitirozol	45,33 \pm 0,22	-
Oleuropein	52,38 \pm 2,08	0,987 \pm 0,101
Fisetin	32,40 \pm 4,59	-
Kersetin ^d	86,87 \pm 4,48	0,316 \pm 0,030
EGCG	90,58 \pm 1,07	0,162 \pm 0,012
<i>Trans</i> -Resveratrol	91,58 \pm 3,59	0,180 \pm 0,017

^a Standart sapma (n: 3), ^b final konsantrasyon, ^c Test edilmedi, ^d Referans

4.3. Demir İyonu-Şelasyon Etki Tayinine Ait Bulgular

Fenolik bileşikler 10 mM stok konsantrasyonda % 50'nin altında demir iyonu-şelasyon etki gösterdiğinden, IC₅₀ değerleri hesaplanmamıştır. Sonuçlar Çizelge 4.4.'te sunulmaktadır.

Çizelge 4.4. Fenolik bileşiklerin demir iyonu-şelasyon etkileri (% Şelasyon \pm S.S.^a)

Fenolik Bileşikler	Demir İyonu-Şelasyon Etki (% Şelasyon \pm S.S. ^a) (10 mM)
Gallik asit	2,60 \pm 0,03
Sirinjik asit	4,84 \pm 0,03
Vanilik asit	3,47 \pm 0,07
D-(-)-Kinik asit	26,82 \pm 0,08
Elajik asit	39,82 \pm 0,02
Kafeik asit	- ^b
<i>p</i> -Kumarik asit	14,51 \pm 0,07
<i>Trans</i> -Ferulik asit	1,90 \pm 0,01
Klorojenik asit	11,99 \pm 0,05
Rozmarinik asit	-
<i>p</i> -Tirozol	14,71 \pm 0,09
3-Hidroksitirozol	2,84 \pm 0,05
Oleuropein	2,61 \pm 0,05
Apigenin	32,55 \pm 0,02
Luteolin	23,62 \pm 0,03
Diosmetin	5,65 \pm 0,02
Tangeretin	5,46 \pm 0,05
Trisin	37,13 \pm 0,05
İzokersitrin	8,33 \pm 0,11
Orientin	9,51 \pm 0,05
Viteksin	44,12 \pm 0,09
Hiperozit	38,96 \pm 0,12
Fisetin	22,64 \pm 0,06
Kemferol	8,88 \pm 0,01
Kersetin	13,87 \pm 0,12
Mirisetin	10,06 \pm 0,08
Morin	7,95 \pm 0,03
Hesperetin	10,69 \pm 0,01
Naringin	10,44 \pm 0,07
Taksifolin	5,15 \pm 0,05
EGCG	4,44 \pm 0,07
Kateşin	14,89 \pm 0,06
Daidzein	13,77 \pm 0,09
Genistein	13,11 \pm 0,07
Glisitein	14,99 \pm 0,03
<i>Trans</i> -Resveratrol	11,00 \pm 0,05
Pelargonidin	-
Amentoflavon	32,54 \pm 0,05
EDTA ^c	93,35 \pm 0,01

^a Standart sapma (n: 3), ^b Şelasyon gözlenmedi, ^c Referans (10 mM)

4.4. FRAP Tayinine Ait Bulgular

Tez gereçlerimizi teşkil eden fenolik bileşiklerin FRAP değerleri tayin edilmiş olup, sonuçlar Çizelge 4.5.'te sunulmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre; referans olarak kullanılan kersetinden daha yüksek aktivite gösteren 5 bileşik sırasıyla; taksifolin, morin, EGCG, fisetin ve 3-hidroksitirozol olmuştur. En yüksek FRAP aktivitesine sahip diğer 2 bileşik olan rozmarinik asit ve sirinjik asitin değerleri ise kersetine çok yakın bulunmuştur.

Çizelge 4.5. Fenolik bileşiklerin 10 mM stok konsantrasyonda FRAP değerleri

Fenolik Bileşikler	FRAP (700 nm'de absorbans \pm S.S ^a) (10 mM)
Gallik asit	1,61 \pm 0,02
Sirinjik asit	1,80 \pm 0,17
Vanilik asit	1,17 \pm 0,01
D-(-)-Kinik asit	1,14 \pm 0,23
Elajik asit	1,59 \pm 0,43
Kafeik asit	1,72 \pm 0,10
<i>p</i> -Kumarik asit	1,08 \pm 0,04
<i>Trans</i> -Ferulik asit	1,57 \pm 0,09
Klorojenik asit	1,57 \pm 0,11
Rozmarinik asit	1,83 \pm 0,05
<i>p</i> -Tirozol	1,11 \pm 0,12
3-Hidroksitirozol	1,86 \pm 0,05
Oleuropein	1,68 \pm 0,04
Apigenin	1,10 \pm 0,04
Luteolin	1,70 \pm 0,22
Diosmetin	1,40 \pm 0,10
Tangeretin	1,14 \pm 0,03
Trisin	0,93 \pm 0,05
İzokersitrin	1,76 \pm 0,06
Orientin	1,30 \pm 0,23
Viteksin	0,98 \pm 0,05
Hiperozit	1,52 \pm 0,05
Fisetin	1,93 \pm 0,05
Kemferol	1,63 \pm 0,05
Kersetin ^b	1,84 \pm 0,03
Mirisetin	1,78 \pm 0,23
Morin	1,98 \pm 0,03
Hesperetin	1,20 \pm 0,10
Naringin	1,16 \pm 0,03
Taksifolin	2,00 \pm 0,10
EGCG	1,97 \pm 0,06
Kateşin	1,69 \pm 0,08
Daidzein	1,23 \pm 0,06
Genistein	1,02 \pm 0,01
Glisitein	1,09 \pm 0,02
<i>Trans</i> -Resveratrol	1,51 \pm 0,03
Pelargonidin	1,31 \pm 0,03
Amentoflavon	1,37 \pm 0,04

^a Standart sapma (n: 3), ^b Referans (10 mM)

4.5. DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Tayinine Ait Bulgular

Tez gereçlerini teşkil eden fenolik bileşiklerin DPPH radikal süpürücü aktivitesi tayin edilmiş olup, sonuçlar Çizelge 4.6.'da sunulmuştur. Oleuropein, referans olarak kullanılan kersetinden daha yüksek aktivite göstermiştir. Bunun yanında, sırasıyla; kemferol, taksifolin, rozmarinik asit, gallik asit, *trans*-resveratrol ve EGCG'in DPPH radikal süpürücü aktivitesi de kersetine oldukça yakın bulunmuştur.

Çizelge 4.6. Fenolik bileşiklerin 10 mM stok konsantrasyonda DPPH radikal süpürücü etkileri

Fenolik Bileşikler	DPPH Radikal Süpürücü Etki (% Süpürücü etki \pm S.S. ^a) (10 mM)
Gallik asit	85,16 \pm 0,06
Sirinjik asit	83,08 \pm 0,07
Vanilik asit	26,38 \pm 0,30
D-(-)-Kinik asit	19,19 \pm 0,33
Elajik asit	78,72 \pm 0,09
Kafeik asit	83,66 \pm 0,07
<i>p</i> -Kumarik asit	16,95 \pm 0,34
<i>Trans</i> -Ferulik asit	82,41 \pm 0,07
Klorojenik asit	83,57 \pm 0,07
Rozmarinik asit	85,35 \pm 0,06
<i>p</i> -Tirozol	33,27 \pm 0,27
3-Hidroksitirozol	83,01 \pm 0,07
Oleuropein	87,05 \pm 0,05
Apigenin	24,36 \pm 0,31
Luteolin	82,28 \pm 0,07
Diosmetin	10,36 \pm 0,37
Tangeretin	11,78 \pm 0,03
Trisin	40,51 \pm 0,24
İzokersitrin	83,50 \pm 0,07
Orientin	20,46 \pm 0,33
Viteksin	46,15 \pm 0,22
Hiperozit	65,81 \pm 0,14
Fisetin	81,50 \pm 0,08
Kemferol	85,77 \pm 0,06
Kersetin ^b	86,20 \pm 0,06
Mirisetin	78,42 \pm 0,09
Morin	83,15 \pm 0,07
Hesperetin	60,07 \pm 0,16
Naringin	9,93 \pm 0,37
Taksifolin	85,72 \pm 0,06
EGCG	84,73 \pm 0,06
Kateşin	82,57 \pm 0,07
Daidzein	15,50 \pm 0,35
Genistein	16,53 \pm 0,01
Glisitein	14,12 \pm 0,35
<i>Trans</i> -Resveratrol	84,81 \pm 0,06
Pelargonidin	38,74 \pm 0,25
Amentoflavon	15,80 \pm 0,35

^a Standart sapma (n: 3), ^b Referans (10 mM)

4.6. CUPRAC Tayinine Ait Bulgular

CUPRAC yöntemine göre 10 mM stok konsantrasyonda test edilen fenolik bileşikler ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7.'de verilmiştir. Sonuçlar, artan absorbans değerlerinin indirgeme gücünün arttığına işaret etmesi şeklinde değerlendirilmektedir. Sonuçlarımıza göre, izokersitrin, kersetin, luteolin, mirisetin, kemferol ve morin, referans olarak kullanılan gallik asitten daha yüksek aktivite göstermiştir.

Çizelge 4.7. Fenolik bileşiklerin 10 mM stok konsantrasyonda CUPRAC değerleri

Fenolik Bileşikler	CUPRAC (450 nm'de absorbans \pm S.S ^a) (10 mM)
Gallik asit ^b	3,40 \pm 0,01
Sirinjik asit	1,57 \pm 0,03
Vanilik asit	1,61 \pm 0,07
D-(-)-Kinik asit	0,31 \pm 0,01
Elajik asit	0,52 \pm 0,08
Kafeik asit	2,23 \pm 0,16
<i>p</i> -Kumarik asit	1,07 \pm 0,09
<i>Trans</i> -Ferulik asit	1,58 \pm 0,003
Klorojenik asit	2,37 \pm 0,08
Rozmarinik asit	2,71 \pm 0,12
<i>p</i> -Tirozol	0,67 \pm 0,01
3-Hidroksitirozol	1,80 \pm 0,04
Oleuropein	1,39 \pm 0,10
Apigenin	0,98 \pm 0,30
Luteolin	3,96 \pm 0,05
Diosmetin	0,43 \pm 0,04
Tangeretin	0,26 \pm 0,01
Trisin	0,07 \pm 0,003
İzokersitrin	3,99 \pm 0,01
Orientin	1,74 \pm 0,24
Viteksin	0,17 \pm 0,01
Hiperozit	3,11 \pm 0,50
Fisetin	2,66 \pm 0,36
Kemferol	3,60 \pm 0,28
Kersetin	3,99 \pm 0,004
Mirisetin	3,78 \pm 0,11
Morin	3,48 \pm 0,26
Hesperetin	1,79 \pm 0,17
Naringin	0,19 \pm 0,01
Taksifolin	1,46 \pm 0,11
EGCG	1,96 \pm 0,20
Kateşin	3,33 \pm 0,28
Daidzein	0,47 \pm 0,06
Genistein	1,56 \pm 0,14
Glisitein	0,27 \pm 0,01
<i>Trans</i> -Resveratrol	1,69 \pm 0,04
Pelargonidin	1,30 \pm 0,10
Amentoflavon	2,50 \pm 0,18

^a Standart sapma (n: 3), ^b Referans (10 mM)

4.7. Hücre Kültürü Yöntemiyle Sitotoksosite Tayinine Ait Bulgular

4.7.1. MTT yöntemiyle elde edilen sitotoksik aktivite tayinine ait bulgular

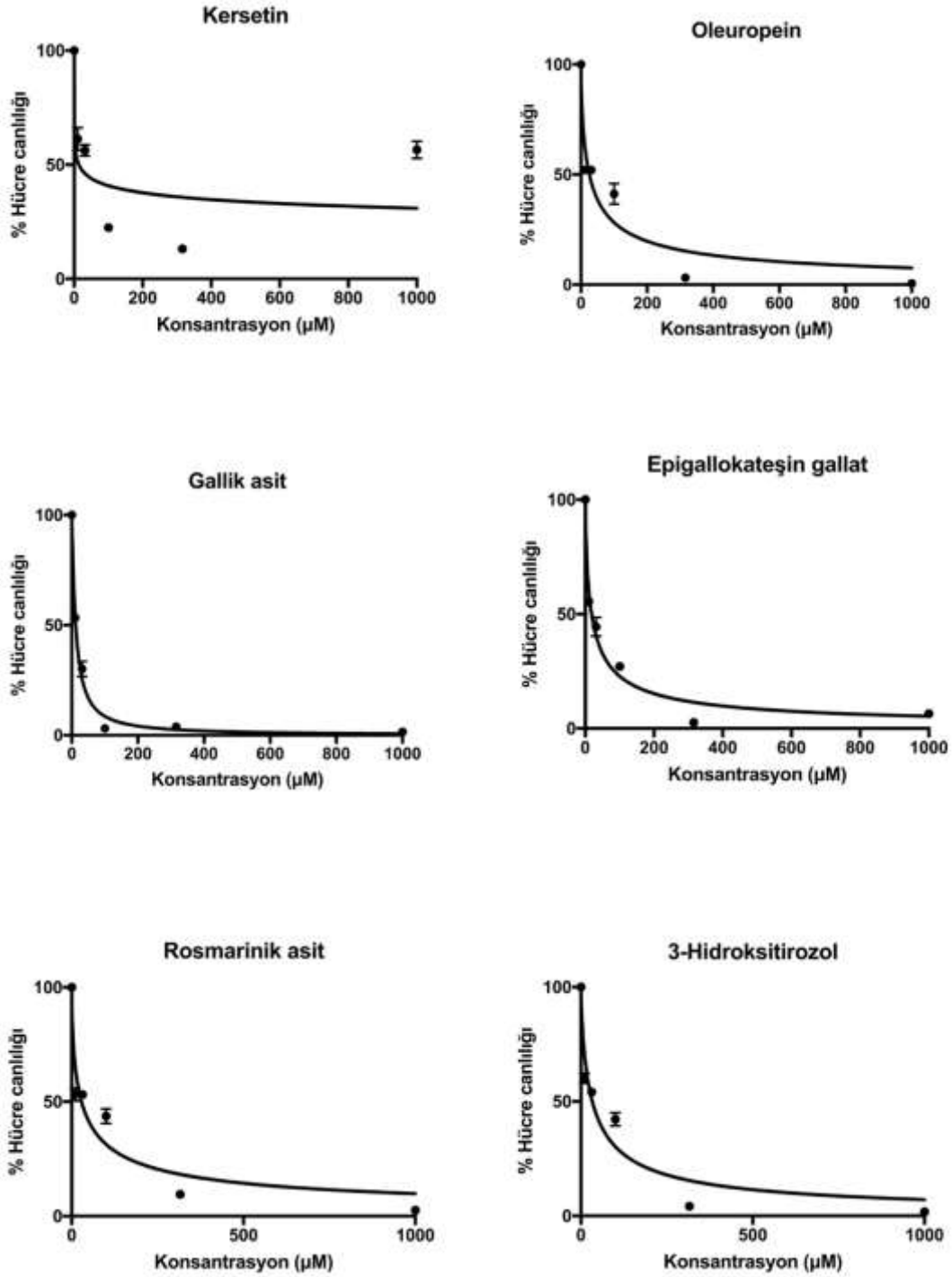
Hafıza güçlendirici etki açısından en aktif olduğu belirlenen fenolik bileşiklerin MTT yöntemi ile SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde olası sitotoksik aktivitesi değerlendirilmiş ve Şekil 4.1.'de doz-cevap eğrileri elde edilmiştir. Bileşiklere ait IC₅₀ değerleri ise Çizelge 4.8.'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Fenolik bileşiklerin SH-SY5Y hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksosite değerlendirmesine ait IC₅₀ değerleri

Fenolik bileşikler	IC ₅₀ değerleri ± S.S. ^a (µM ^b)
Gallik asit	12,01 ± 0,75
Rozmarinik asit	28,52 ± 4,91
3-Hidroksitirozol	33,12 ± 4,45
Oleuropein	25,28 ± 4,75
Kersetin	13,84 ± 17,81
EGCG	18,52 ± 2,22
Doksozobisin ^c	2,12 ± 0,22

^a Standart sapma (n: 3), ^b final konsantrasyon, ^c Referans

Nörodejeneratif hastalıkların araştırmalarında yaygın kullanılan bir deneysel model olarak SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde, test edilen 6 adet fenolik bileşiğin IC₅₀ değerleri de 35 µM konsantrasyonun altında bulunmuştur. En düşük IC₅₀ değerine gallik asit, en yüksek IC₅₀ değerine ise 3-hidroksitirozolün sahip olduğu tespit edilmiştir. Sitotoksik etki açısından aktif bulunan bu bileşiklerin kullanımlarında, hücre ölümü açısından doz ayarlaması yapılması önerilmektedir. Doz-cevap eğrisinde kersetinin düşük dozlarda hücre ölümüne neden olduğu, 1000 µM dozda kontrole göre düşük olmasına rağmen düşük dozlara göre daha yüksek hücre canlılığı gözlenmiştir. Bazı bileşiklerde olduğu gibi doz-cevap eğrilerinde karşılaşılan U-eğrisinin kersetin için de geçerli olabileceği düşünülebilir ve daha yüksek dozlarda ileri analizler gerçekleştirilebilir.



Şekil 4.1. Kersetin, oleuropein, gallik asit, epigallokateşin gallat, rozmarinik asit ve 3-hidroksitirozole ait MTT yöntemiyle elde edilen sitotoksikite sonuçları

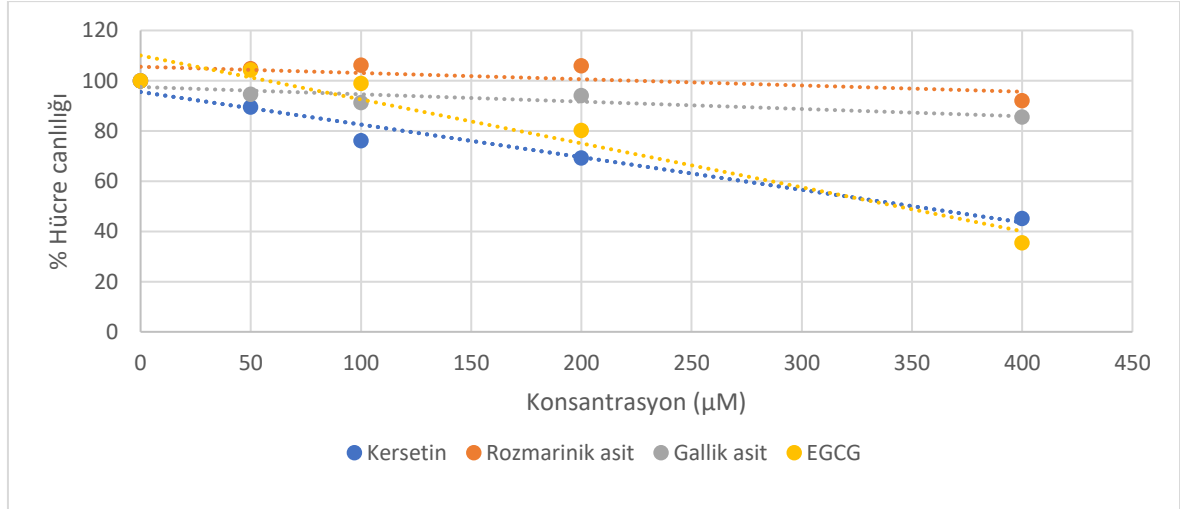
4.7.2. Alamar Blue yöntemiyle elde edilen sitotoksik aktivite tayinine ait bulgular

Anti-Alzheimer etki açısından en aktif olduğu belirlenen fenolik bileşiklerin Alamar Blue yöntemi ile SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde olası sitotoksik aktivitesi

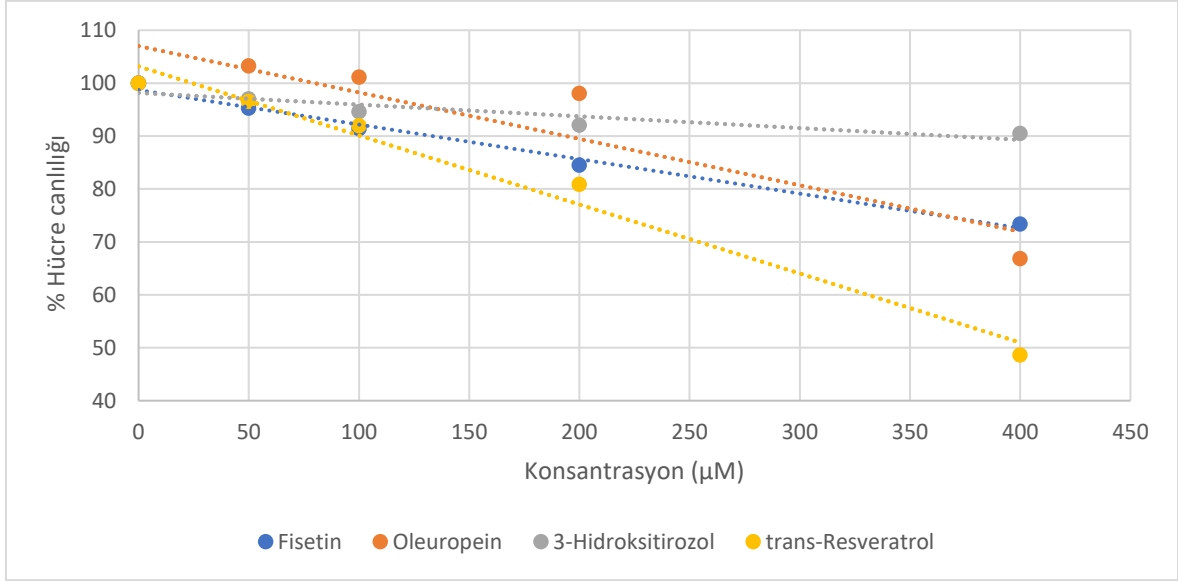
değerlendirilmiş ve Şekil 4.2. ve 4.3.'te sunulan doz-cevap eğrileri elde edilmiştir. DMSO çözücü kontrol olarak kullanılmış ve hücre canlılığı % 100 olarak kaydedilmiştir. Bileşiklere ait % 8 inhibisyon gözlenen konsantrasyon (IC_{08}), yani % 92 canlılığın görüldüğü dozlar hesaplanarak Çizelge 4.9.'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Fenolik bileşiklerin SH-SY5Y hücrelerinde Alamar Blue yöntemiyle sitotoksosite değerlendirilmesine ait IC_{08} değerleri

Fenolik bileşikler	IC_{08} Değerleri (μM)
Gallik asit	187,84
Rozmarinik asit	545,97
3-Hidroksitirozol	278,42
Oleuropein	171,15
Fisetin	102,73
Kersetin	27,08
EGCG	103,09
<i>Trans</i> -Resveratrol	85,52



Şekil 4.2. Kersetin, rozmarinik asit, gallik asit ve EGCG'a ait Alamar Blue yöntemiyle elde edilen sitotoksosite sonuçları



Şekil 4.3. Fisetin, oleuropein, 3-hidroksitirozol ve *trans*-resveratrole ait Alamar Blue yöntemiyle elde edilen sitotoksosite sonuçları

4.8. Real Time-PCR Yöntemiyle Ekspresyon Analizine Ait Bulgular

Gallik asit, rozmarinik asit, kersetin, EGCG, fisetin, 3-hidroksitirozol, oleuropein ve *trans*-resveratrol ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinden elde edilen PCR sonuçları Çizelge 4.10. ve 4.11. ile Şekil 4.4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.10. Gallik asit, rozmarinik asit, kersetin ve EGCG'nin genler üzerindeki fold regülasyon değerleri

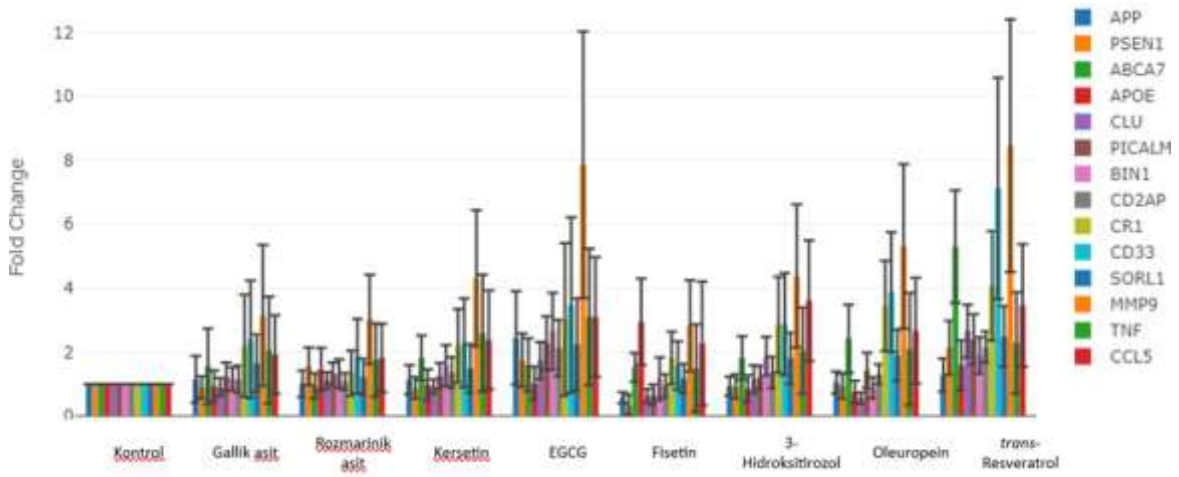
Fenolik bileşikler	Gallik asit		Rozmarinik asit		Kersetin		EGCG	
	Fold regulation	p değeri	Fold regulation	p değeri	Fold regulation	p değeri	Fold regulation	p değeri
APP	1,15	0,365900	1,01	0,987500	1,14	0,486800	2,45	0,009300
PSEN1	-1,11	0,459700	1,55	0,027900	-1,13	0,398200	1,75	0,016900
ABCA7	1,55	0,083200	-1,07	0,744800	1,82	0,003800	1,60	0,028700
APOE	-1,07	0,641300	1,45	0,201900	-1,02	0,721400	1,02	0,849000
CLU	-1,11	0,437700	1,11	0,494300	-1,09	0,427800	1,74	0,001900
PICALM	1,22	0,259000	1,32	0,088000	1,26	0,165200	2,28	0,000300
BIN1	1,16	0,427600	1,33	0,107000	1,58	0,022000	2,65	0,000700
CD2AP	1,15	0,351800	1,08	0,595700	1,36	0,044100	2,12	0,001500
CR1	2,20	0,025000	1,34	0,261700	2,20	0,004100	3,02	0,010400
CD33	2,40	0,020100	1,88	0,033900	2,29	0,006000	3,47	0,008700
SORL1	1,65	0,049600	1,23	0,357200	1,49	0,075100	2,24	0,015000
MMP9	3,14	0,003700	3,02	0,000020	4,31	0,000006	7,86	0,000006
TNF	2,06	0,049600	1,75	0,099400	2,59	0,008300	3,10	0,001600
CCL5	1,92	0,033900	1,82	0,042900	2,38	0,007900	3,10	0,000600
BACT	1,00		1,00		1,00		1,00	

*APP: amiloit öncü proteini; PSEN1: *presenilin1*; ABCA7: ATP Bağlayıcı Kaset Alt Ailesi A Üyesi 7; APOE: apolipoprotein E; CLU: Klusterin; PICALM: fosfatidilinositol bağlayıcı klatrin montaj proteini; BIN1: Köprüleme entegratörü 1; CD2AP: CD2-ilişkili protein; CR1: kompleman reseptörü tip 1; CD33: Sialik asit-bağlayıcı immüno globin-lectin 3; SORL1: sortilin-ilişkili reseptör 1; MMP9: matriks metalloproteinaz-9; TNF: tümör nekroz faktör; CCL5: kemokin C-C (motif) ligant 5

Çizelge 4.11. Fisetin, 3-hidroksitirozol, oleuropein ve trans-resveratrolün genler üzerindeki fold regülasyon değerleri

Fenolik bileşikler	Fisetin		3-Hidroksitirozol		Oleuropein		trans-Resveratrol	
	Fold regulation	p değeri	Fold regulation	p değeri	Fold regulation	p değeri	Fold regulation	p değeri
APP	-1,76	0,010000	-1,07	0,531000	1,05	0,909700	1,28	0,181200
PSEN1	-2,87	0,015200	-1,08	0,565900	-1,07	0,605000	2,14	0,000400
ABCA7	1,52	0,008500	1,82	0,002800	2,42	0,000800	5,30	0,000000
APOE	2,95	0,000043	-1,17	0,419400	-1,33	0,222500	1,59	0,092700
CLU	-1,60	0,013900	1,15	0,352600	-1,78	0,004800	2,66	0,000010
PICALM	-1,51	0,093000	1,21	0,263000	1,43	0,055500	2,40	0,000080
BIN1	1,16	0,382000	1,87	0,000800	-1,14	0,435900	1,90	0,000200
CD2AP	-1,06	0,779700	1,36	0,056000	1,31	0,032800	2,16	0,000002
CR1	1,82	0,014800	2,86	0,000800	3,45	0,000003	4,07	0,000002
CD33	1,58	0,087400	2,88	0,000600	3,88	0,000002	7,12	0,000000
SORL1	1,18	0,517400	1,81	0,008200	1,90	0,003100	2,49	0,000046
MMP9	2,82	0,000300	4,38	0,000010	5,31	0,000001	8,46	0,000000
TNF	1,50	0,227800	2,04	0,030400	2,09	0,047500	2,29	0,014900
CCL5	2,27	0,029500	3,61	0,000005	2,67	0,002200	3,46	0,000070
BACT	1,00		1,00		1,00		1,00	

*APP: amiloit öncü proteini; PSEN1: *presenilin1*; ABCA7: ATP Bağlayıcı Kaset Alt Ailesi A Üyesi 7; APOE: apolipoprotein E; CLU: Klusterin; PICALM: fosfatidilinositol bağlayıcı klatrin montaj proteini; BIN1: Köprüleme entegratörü 1; CD2AP: CD2-ilişkili protein; CR1: kompleman reseptörü tip 1; CD33: Sialik asit-bağlayıcı immüno globin-lectin 3; SORL1: sortilin-ilişkili reseptör 1; MMP9: matriks metalloproteinaz-9; TNF: tümör nekroz faktör; CCL5: kemokin C-C (motif) ligant 5



Şekil 4.4. Seçilen fenolik bileşiklerin test edilen genler üzerindeki fold regülasyon değerleri

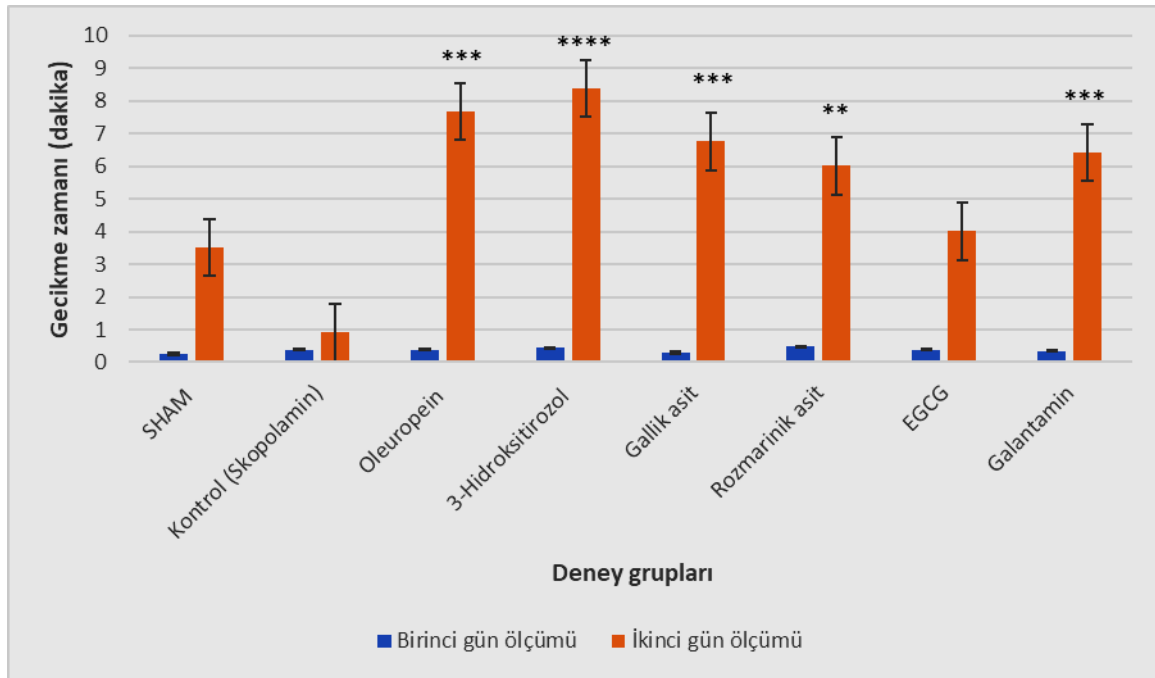
4.9. Antiamnezik Aktivite Tayinine Ait Bulgular

Enzim inhibisyon deneylerimizde % 50'nin üstünde inhibitör etkiye sahip olduğu bulunan oleuropein, 3-hidroksitirozol, gallik asit, rozmarinik asit ve EGCG'nin hafıza üzerindeki etkileri, AH için yaygın olarak kullanılan *in vivo* deney modellerinden biri olan farelerde pasif kaçınma testi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen istatistiksel sonuçlar Çizelge 4.12. ve Şekil 4.5.'te verilmiştir.

Çizelge 4.12. Pasif kaçınma testinde deney gruplarına enjekte edilen doz, ağırlık ortalamaları, 1. ve 2. gün karanlık bölmeye geçiş süreleri [Ortalama (dk) ± S.S.] ve istatistiksel analiz sonuçları

Deney grupları		Doz (mg/kg)	Fare ortalama ağırlığı (g)	Karanlık bölmeye geçiş süresi ortalaması (dk) ± S.S. ^a - 1. Gün	Karanlık bölmeye geçiş süresi ortalaması (dk) ± S.S. ^a - 2. Gün
A	SHAM		37	0,25 ± 0,04	3,52 ± 0,74
B	Kontrol (Skopolamin HBr)	1	37	0,38 ± 0,04	0,91 ± 0,14
C	Oleuropein	20	40	0,39 ± 0,07	7,68 ± 0,55***
D	3-Hidroksitirozol	20	37	0,44 ± 0,03	8,39 ± 0,31****
E	Gallik asit	20	39	0,29 ± 0,03	6,76 ± 1,11***
F	Rozmarinik asit	20	39	0,48 ± 0,11	6,02 ± 1,16**
G	EGCG	20	39	0,38 ± 0,04	4,01 ± 0,77 ^c
H	Galantamin HBr ^b	10	40	0,35 ± 0,08	6,42 ± 1,06***

^a Standart sapma (n: 3), ^b Referans, ^c İstatistiksel olarak anlamlı değil $p > 0,05$, **Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık $p < 0,01$, *** Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık $p < 0,001$, **** Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık $p < 0,0001$

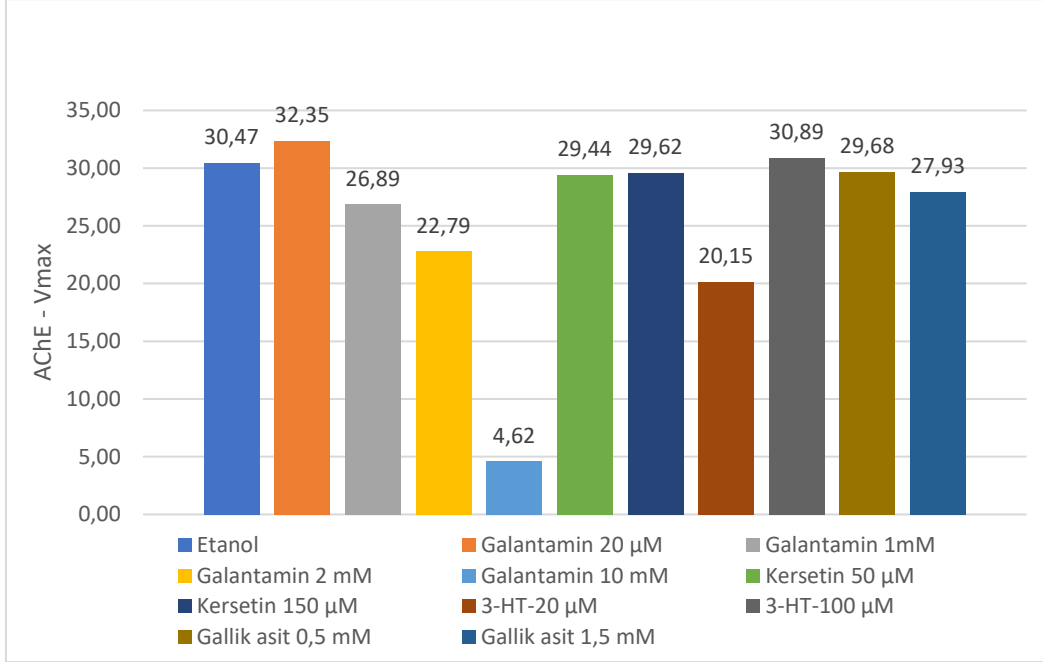


Şekil 4.5. Pasif kaçınma testinde deney gruplarına göre 1. ve 2. günde farelerin karanlık bölmeye geçiş süreleri ve istatistiksel analiz sonuçları

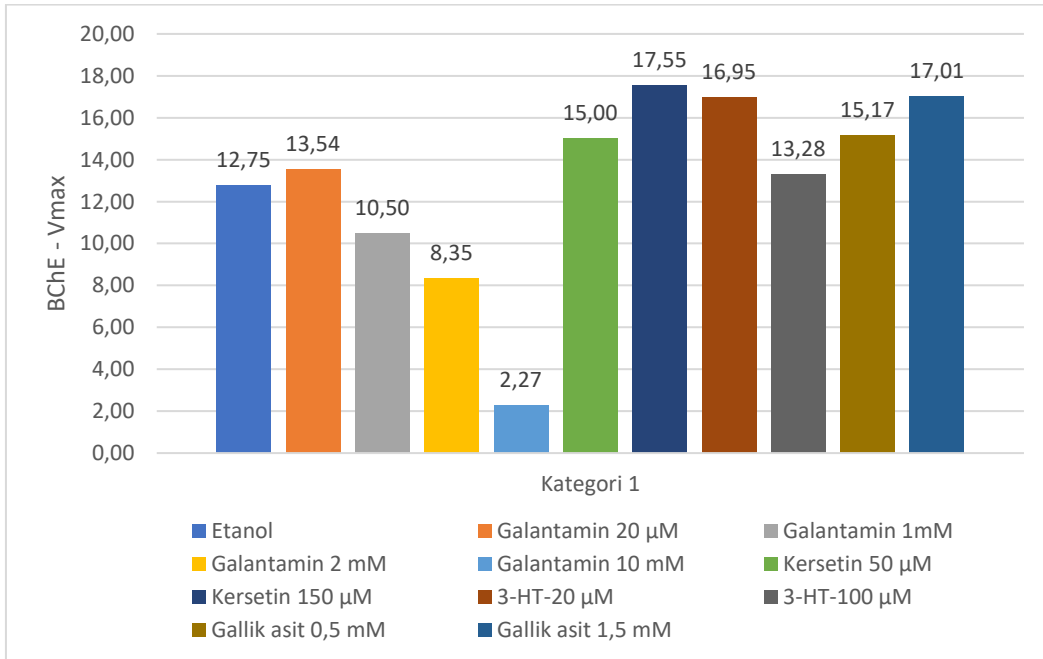
4.10. *Drosophila melanogaster* Nöroprotektif Etki Modeliyle Aktivite Tayinine Ait Bulgular

In vitro AChE ve BChE inhibitör tayini sonucu aktif olduğu belirlenen gallik asit, 3-hidroksitirozol, kersetin ve pozitif kontrol için literatür taraması sonucu belirlenen, çalışmamızda kullanılan konsantrasyonlar Çizelge 3.3.'te verilmiştir. Fenolik bileşikler,

pozitif ve negatif kontrollerin gösterdikleri AChE ve BChE aktivite ölçümüne ait (V_{max}) bulgular Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.'de verilmiştir.



Şekil 4.6. Seçilen fenolik bileşikler, pozitif ve negatif kontrollerin *Drosophila melanogaster* nöroprotektif etki modelinde AChE aktivite ölçümüne ait V_{max} değerleri



Şekil 4.7. Seçilen fenolik bileşikler, pozitif ve negatif kontrollerin *Drosophila melanogaster* nöroprotektif etki modelinde BChE aktivite ölçümüne ait V_{max} değerleri

4.11. Zebra Balığı Davranış Modelleriyle Nöroprotektif Etki Tayinine Ait Bulgular

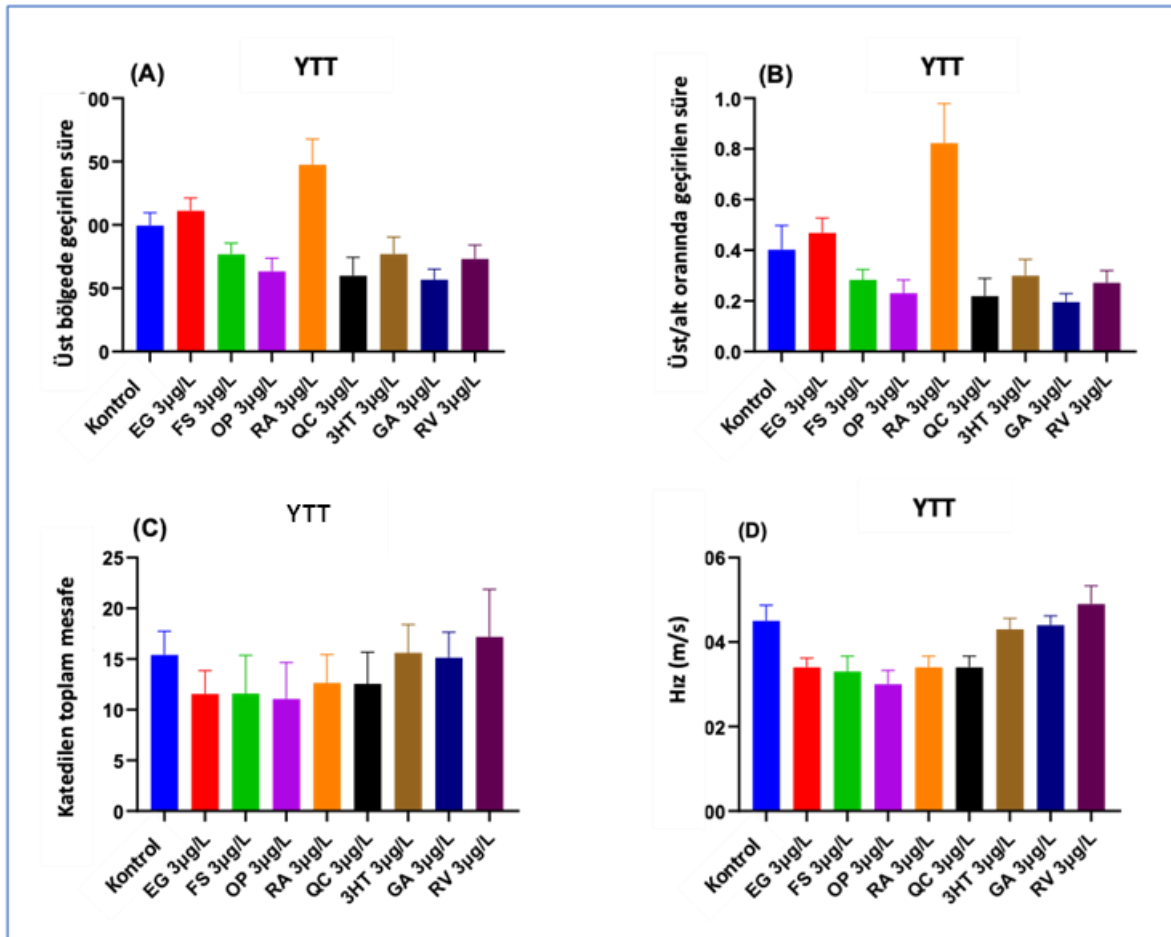
4.11.1. Fenolik bileşiklerin yeni tank dalış (YTT) testinde kaygı benzeri davranışlar üzerine etkisi

Fenolik bileşiklerin zebra balığında kaygı benzeri davranış üzerindeki etkileri, aşağıdaki parametreler ölçülerek YTT modelinde değerlendirilmiştir: Üst bölgede geçirilen süre (s), üst/alt oranında geçirilen süre, kat edilen toplam mesafe (m) ve hız (m/s). Tukey's *post hoc* analizlerine göre, tankın üst bölgesinde geçirilen süre dikkate alındığında fisetin 3 µg/L ile rozmarinik asit 3 µg/L ($p < 0,001$), oleuropein 3 µg/L ile rozmarinik asit 3 µg/L ($p < 0,0001$), rozmarinik asit 3 µg/L ile kersetin 3 µg/L ($p < 0,0001$), rozmarinik asit 3 µg/L ile 3-hidroksitirozol 3 µg/L ($p < 0,001$), rozmarinik asit 3 µg/L ile gallik asit 3 µg/L ($p < 0,0001$) ve rozmarinik asit 3 µg/L ile *trans*-resveratrol 3 µg/L arasında ($p < 0,001$) önemli farklılıklar ortaya çıkmıştır (Şekil 4.8.-A). Ayrıca, üst/alt oranında geçirilen süre için kontrol ile rozmarinik asit 3 µg/L ($p < 0,0001$), EGCG 3µg/L ile rozmarinik asit 3 µg/L ($p < 0,01$), fisetin 3 µg/L ile rozmarinik asit 3 µg /L ($p < 0,0001$), oleuropein 3 µg/L ile rozmarinik asit 3 µg/L ($p < 0,0001$), rozmarinik asit 3 µg/L ile kersetin 3 µg/L ($p < 0,0001$), rozmarinik asit 3 µg/L ile 3-hidroksitirozol 3 µg/L ($p < 0,0001$), rozmarinik asit 3 µg/L ile gallik asit 3 µg/L ($p < 0,0001$) ve rozmarinik asit 3 µg/L ile *trans*-resveratrol 3 µg/L ($p < 0,0001$) arasında da önemli farklılıklar ortaya çıkmıştır (Şekil 4.8.-B).

Tek yönlü ANOVA testine göre, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, rozmarinik asit uygulanan grubun tankın üst bölgesinde daha fazla zaman geçirdiği ($p < 0,0001$) (Şekil 4.8.-A), üst/alt oranında önemli miktarda zaman harcadığı ($p < 0,0001$) (Şekil 4.8.-B) bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, fenolik bileşikler, özellikle rozmarinik asit, güçlü anksiyolitik özellikler sergilemiştir.

Bunun yanında, YTT'de katedilen toplam mesafe ve hız sonuçları değerlendirildiğinde, fenolik bileşikler ile muamelenin hareket kabiliyetini önemli ölçüde etkilediği görülmüştür. Tukey's *post hoc* analizleri, kat edilen toplam mesafe dikkate alındığında; EGCG 3 µg/L ile *trans*-resveratrol 3 µg/L ($p < 0,001$), fisetin 3 µg/L ile *trans*-resveratrol 3 µg/L ($p < 0,001$), oleuropein 3 µg/L ile 3-hidroksitirozol 3 µg/L ($p < 0,01$), oleuropein 3 µg/L ile *trans*-

resveratrol 3 µg/L ($p < 0,001$) ve kersetin 3 µg/L ile *trans*-resveratrol 3 µg/L ($p < 0,01$) arasında önemli farklılıklar ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.8.-C). Ayrıca, tanktaki zebra balığının hızı dikkate alındığında EGCG 3 µg/L ile *trans*-resveratrol 3 µg/L ($p < 0,01$), fisetin 3 µg/L ile *trans*-resveratrol 3 µg/L ($p < 0,01$), oleuropein 3 µg/L ile *trans*-resveratrol 3 µg/L ($p < 0,001$), rozmarinik asit 3 µg/L ile *trans*-resveratrol 3 µg/L ($p < 0,01$) ve kersetin 3 µg/L ile *trans*-resveratrol 3 µg/L ($p < 0,01$) arasında da önemli farklılıklar ortaya çıkmıştır (Şekil 4.8.-D). Tek yönlü ANOVA testine göre, kontrol grubuyla kıyaslandığında, özellikle rozmarinik asite maruz kalmanın, kat edilen toplam mesafe ($p < 0,05$) (Şekil 4.8.-C) ve hızı ($p < 0,01$) (Şekil 4.8.-D), dolayısıyla lokomotor aktiviteyi azalttığı görülmüştür.

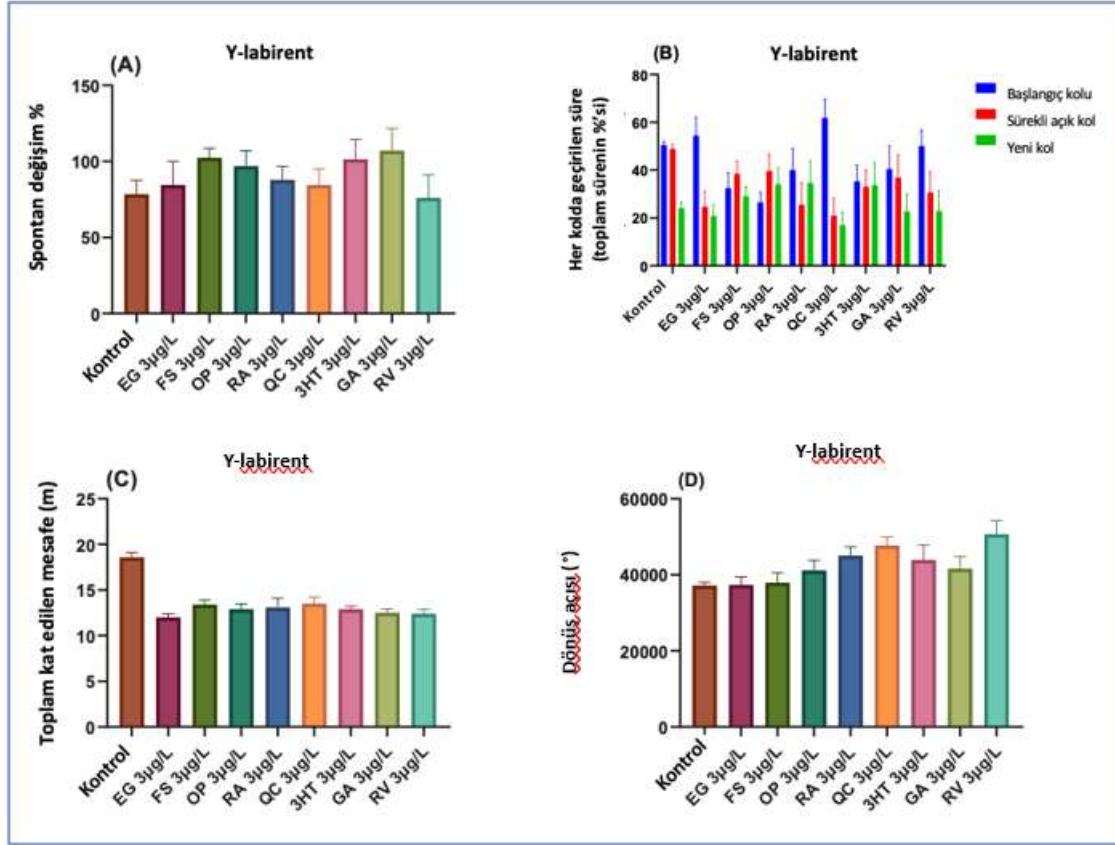


Şekil 4.8. Fenolik bileşikler (3 µg/L) kaygı durumunu azaltmış ve yeni tank dalış testinde (YTT) hareket kabiliyetini etkilemiştir. Kaygı benzeri davranış: farklı gruplarda üst bölgede geçirilen süre ve üst/alt oranında geçirilen süre; Hareket: Zebra balığının farklı gruplarda tankta kat ettiği toplam mesafe (m) ve hız (m/s). Değerler: ortalama \pm S.S. (n: 10). EG - epigallokateşin gallat; FS – fisetin; OP – oleuropein; RA - rozmarinik asit; KK – kersetin; 3HT - 3-hidroksitirozol; GA - gallik asit; RV – *trans*-resveratrol

4.11.2. Fenolik bileşiklerin Y-labirent testinde hafıza ve yeniliğe tepki üzerindeki etkileri

Zebra balığındaki yeniliğe tepki ve uzamsal hafıza, Y-labirent testi ile değerlendirilmiştir. Tukey's *post hoc* analizleri, spontan değişim yüzdesi üzerinde kontrol ile fisetin 3 µg/L ($p < 0,001$), kontrol ile oleuropein 3 µg/L ($p < 0,01$), kontrol ile 3-hidroksitirozol 3 µg/L ($p < 0,001$), kontrol ile gallik asit 3 µg/L ($p < 0,001$) arasında önemli farklar ortaya çıkarmış (Şekil 4.9.-A) ve uzamsal hafıza oluşumu üzerinde olumlu etkilerin olduğunu düşündürmüştür.

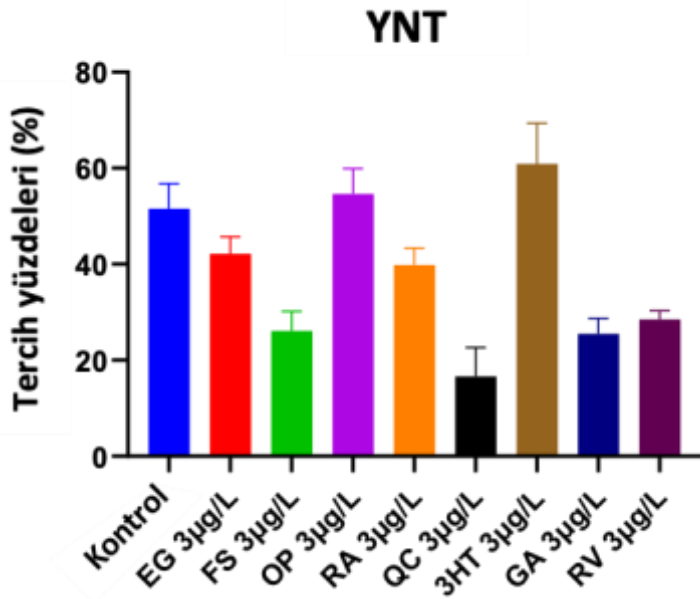
Ayrıca, her bir kolda harcanan zaman üzerinde kontrol ve fisetin 3 µg/L ($p < 0,01$), kontrol ve oleuropein 3 µg/L ($p < 0,001$), kontrol ve rozmarinik asit 3 µg/L ($p < 0,001$) ve kontrol ve 3-hidroksitirozol 3 µg/L ($p < 0,001$) arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 4.9.-B). Fenolik bileşikler, kontrol ile kıyaslandığında yeni kolda geçirilen süreyi önemli ölçüde artırmakla birlikte kat edilen toplam mesafeyi ($p < 0,001$) (Şekil 4.9.-C), yani lokomotor aktiviteyi azaltmıştır. Bu sonuca dayanarak fenolik bileşiklerin yeniliğe tepki ve uzamsal hafıza üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu, ancak bellek performansının lokomotor aktivitedeki değişikliklerle ilgili olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.9. Fenolik bileşikler (3 µg/L), Y-labirent testinde hafızayı ve hareket kabiliyetini iyileştirmiştir. Bellek: farklı gruplarda spontan değişim %'si; her bir kolda geçirilen süre (toplam sürenin yüzdesi); Hareket: Zebra balığının farklı gruplarda tankta kat ettiği toplam mesafe (m) ve farklı gruplarda zebra balığının tankta dönüş açısı. Değerler: ortalama ± S.S. (n: 10). EG - epigallokateşin gallat; FS – fisetin; OP – oleuropein; RA - rozmarinik asit; KK – kersetin; 3HT - 3-hidroksitirozol; GA - gallik asit; RV – *trans*-resveratrol

4.11.3. Fenolik bileşiklerin yeni nesne tanıma testinde tanıma belleği üzerindeki etkileri

Zebra balığının tanıma hafızası, YNT testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Zebra balığının, tanıdık ve yeni bir nesne arasında ayırım yapabildiği (May ve diğerleri 2016) ve çevreden 3 boyutlu geometrik şekilleri tanıyabildiği (Lucon-Xiccato ve Dadda, 2014) literatürde belirtilmektedir. Tukey's *post hoc* analizleri, kontrol ile oleuropein (3 µg/L, $p < 0,01$) ve kontrol ile 3-hidroksitirozol (3 µg/L, $p < 0,001$) arasında önemli farklar ortaya çıkarmıştır ki; bu sonuç da, oleuropein ve 3-hidroksitirozolün güçlü promnezik etki sergilediğini düşündürmektedir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Fenolik bileşikler (3 µg/L), YNT testindeki tercih yüzdesini iyileştirmiştir. Değerler: ortalama ± S.S. (n: 10). EG - epigallokateşin gallat; FS – fisetin; OP – oleuropein; RA - rozmarinik asit; KK – kersetin; 3HT - 3-hidroksitirozol; GA - gallik asit; RV – *trans-resveratrol*

4.12. *In Silico* Biyolojik Aktivite Tayinine Ait Bulgular

PASS yazılımından elde edilen verilerde, anti-amiloidojenik etki (Aisen, 2005; Hamaguchi ve diğerleri 2006), Aβ agregasyon inhibisyonu (Q. Wang ve diğerleri 2014), *APOA1* ekspresyon artırıcı etki (Lin ve diğerleri 2015; Slot ve diğerleri 2017), asetilkolin nöromusküler blokajı (Baruah, 2008), serbest radikal süpürücü ve antioksidan etki (Behl ve Moosmann, 2002), protein kinaz inhibisyonu (Tell ve Hilgeroth, 2013), peroksidaz inhibisyonu (Atamna ve Boyle, 2006), lipit peroksidasyon inhibisyonu (Everse ve Coates, 2009) ve sistationin β-sentaz inhibisyonu (Beyer ve diğerleri 2004) gibi mekanizmaların anti-Alzheimer etkiyi sağlamada rol oynadığı göz önüne alınarak, bileşiklerin bu biyolojik aktiviteler için aktif olma potansiyelleri değerlendirilmiştir ve olasılıklar Çizelge 4.13.'te listelenmiştir. PASS çevrimiçi yazılımının atomların çok düzeyli komşulukları (multilevel neighborhoods of atoms, MNA) tanımlayıcıları bazı kriterlerin sağlanması koşulu ile hesaplanabilmektedir. Bu kriterler arasında molekülün molekül ağırlığı, kovalent bağ varlığı, karbon atomu sayısı ve bileşik yükü gibi özellikler sayılmaktadır. Ancak pelargonidin, PASS yazılımı tarafından analiz edilememiştir. Moleküler yapının yüksüz olması durumunda MNA tanımlayıcılarının

belirlenebileceği kriterine istinaden, pelargonidinde bulunan oksijen atomunun + yüklü olması nedeniyle, ilgili bileşiğe ait biyolojik aktivite tahmin analizi yapılamamıştır.

Çizelge 4.13. Seçilen doğal kaynaklı bileşiklerin AH'na karşı potansiyel biyolojik aktivite tahminleri

Fenolik Bileşikler	Biyolojik Aktivite	Olasılık	
		P _a ^a	P _i ^b
Gallik asit	Peroksidaz inhibitörü	0,891	0,003
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,789	0,002
	<i>APOA1</i> ^c ekspresyonu artırıcı	0,778	0,004
	Serbest radikal süpürücü	0,570	0,007
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,554	0,012
	Anti-amiloidojenik	0,548	0,009
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,531	0,056
	Antioksidan	0,520	0,006
	Kinaz inhibitörü	0,388	0,072
	A β agregasyon inhibitörü	0,373	0,007
Sirinjik asit	Peroksidaz inhibitörü	0,846	0,004
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,662	0,007
	Serbest radikal süpürücü	0,619	0,005
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,559	0,012
	Anti-amiloidojenik	0,553	0,009
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,407	0,004
	Antioksidan	0,403	0,012
	A β agregasyon inhibitörü	0,400	0,007
Vanilik asit	Kinaz inhibitörü	0,307	0,137
	Peroksidaz inhibitörü	0,836	0,004
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,714	0,005
	Serbest radikal süpürücü	0,643	0,005
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,564	0,011
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,570	0,035
	Anti-amiloidojenik	0,539	0,010
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,422	0,004
	A β agregasyon inhibitörü	0,410	0,006
	Antioksidan	0,374	0,014
D-(-)-Kinik asit	Kinaz inhibitörü	0,402	0,065
	Antioksidan	0,830	0,003
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,627	0,008
	Serbest radikal süpürücü	0,541	0,008
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,475	0,090
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,450	0,044
	Peroksidaz inhibitörü	0,424	0,048
	Kinaz inhibitörü	0,266	0,190

Çizelge 4.13. (devam) Seçilen doğal kaynaklı bileşiklerin AH'na karşı potansiyel biyolojik aktivite tahminleri

Elajik asit	Peroksidaz inhibitörü	0,861	0,004
	Kinaz inhibitörü	0,849	0,004
	Antioksidan	0,699	0,004
	Serbest radikal süpürücü	0,596	0,006
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,536	0,013
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,527	0,022
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,534	0,054
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,429	0,004
	A β agregasyon inhibitörü	0,225	0,013
	Kafeik asit	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,803
Peroksidaz inhibitörü		0,753	0,007
Serbest radikal süpürücü		0,647	0,005
Antioksidan		0,603	0,005
Lipit peroksidaz inhibitörü		0,570	0,011
Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan		0,482	0,086
Sistationin β -sentaz inhibitörü		0,300	0,007
Kinaz inhibitörü		0,264	0,194
A β agregasyon inhibitörü		0,187	0,018
<i>p</i> -Kumarik asit	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,824	0,003
	Peroksidaz inhibitörü	0,740	0,008
	Serbest radikal süpürücü	0,627	0,005
	Antioksidan	0,553	0,005
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,529	0,014
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,474	0,091
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,320	0,006
	Kinaz inhibitörü	0,246	0,225
	A β agregasyon inhibitörü	0,176	0,020
<i>Trans</i> -Ferulik asit	Serbest radikal süpürücü	0,731	0,004
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,721	0,005
	Peroksidaz inhibitörü	0,708	0,011
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,618	0,008
	Antioksidan	0,540	0,005
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,490	0,081
	Kinaz inhibitörü	0,283	0,165
	A β agregasyon inhibitörü	0,186	0,018
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,177	0,021
Klorojenik asit	Serbest radikal süpürücü	0,856	0,002
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,855	0,003
	Antioksidan	0,785	0,004
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,622	0,009
	Peroksidaz inhibitörü	0,141	0,140

Çizelge 4.13. (devam) Seçilen doğal kaynaklı bileşiklerin AH'na karşı potansiyel biyolojik aktivite tahminleri

Rozmarinik asit	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,751	0,004
	Serbest radikal süpürücü	0,745	0,003
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,719	0,005
	Peroksidaz inhibitörü	0,550	0,032
	Antioksidan	0,539	0,005
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,305	0,209
	A β agregasyon inhibitörü	0,101	0,066
<i>p</i> -Tirozol	Peroksidaz inhibitörü	0,798	0,005
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,675	0,006
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,597	0,024
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,452	0,023
	Antioksidan	0,341	0,018
	Serbest radikal süpürücü	0,380	0,019
	Kinaz inhibitörü	0,366	0,085
	Anti-amiloidojenik	0,241	0,126
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,247	0,010
A β agregasyon inhibitörü	0,195	0,016	
3-Hidroksitirozol	Peroksidaz inhibitörü	0,809	0,004
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,649	0,008
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,602	0,022
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,487	0,018
	Serbest radikal süpürücü	0,425	0,015
	Antioksidan	0,411	0,011
	Kinaz inhibitörü	0,380	0,077
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,232	0,012
	Anti-amiloidojenik	0,258	0,111
	A β agregasyon inhibitörü	0,208	0,015
Oleuropein	Serbest radikal süpürücü	0,659	0,005
	Antioksidan	0,497	0,007
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,437	0,026
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,360	0,105
Apigenin	Kinaz inhibitörü	0,941	0,002
	Peroksidaz inhibitörü	0,924	0,002
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,866	0,001
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,826	0,003
	Antioksidan	0,732	0,004
	Serbest radikal süpürücü	0,719	0,004
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,695	0,005
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,598	0,023
	A β agregasyon inhibitörü	0,232	0,012

Çizelge 4.13. (devam) Seçilen doğal kaynaklı bileşiklerin AH'na karşı potansiyel biyolojik aktivite tahminleri

Luteolin	Kinaz inhibitörü	0,940	0,002
	Peroksidaz inhibitörü	0,936	0,002
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,897	0,001
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,822	0,003
	Antioksidan	0,775	0,004
	Serbest radikal süpürücü	0,755	0,003
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,740	0,004
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,570	0,035
	A β agregasyon inhibitörü	0,282	0,009
Diosmetin	Kinaz inhibitörü	0,922	0,002
	Peroksidaz inhibitörü	0,922	0,002
	Serbest radikal süpürücü	0,808	0,003
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,767	0,004
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,751	0,002
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,753	0,004
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,571	0,034
	A β agregasyon inhibitörü	0,276	0,010
Tangeretin	Kinaz inhibitörü	0,914	0,003
	Peroksidaz inhibitörü	0,736	0,009
	Serbest radikal süpürücü	0,715	0,004
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,682	0,005
	Antioksidan	0,645	0,004
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,599	0,023
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,451	0,044
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,266	0,009
	A β agregasyon inhibitörü	0,108	0,059
Trisin	Peroksidaz inhibitörü	0,920	0,002
	Kinaz inhibitörü	0,919	0,002
	Serbest radikal süpürücü	0,797	0,003
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,760	0,004
	Antioksidan	0,737	0,004
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,726	0,005
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,714	0,002
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,573	0,034
	A β agregasyon inhibitörü	0,269	0,010
İzokersitrin	Serbest radikal süpürücü	0,978	0,001
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,976	0,002
	Antioksidan	0,913	0,003
	Kinaz inhibitörü	0,843	0,004
	Peroksidaz inhibitörü	0,676	0,015
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,581	0,013
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,243	0,011

Çizelge 4.13. (devam) Seçilen doğal kaynaklı bileşiklerin AH'na karşı potansiyel biyolojik aktivite tahminleri

Orientin	Serbest radikal süpürücü	0,955	0,001
	Kinaz inhibitörü	0,852	0,004
	Antioksidan	0,828	0,003
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,760	0,004
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,684	0,005
	Peroksidaz inhibitörü	0,558	0,031
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,188	0,018
Viteksin	Serbest radikal süpürücü	0,901	0,002
	Kinaz inhibitörü	0,847	0,004
	Antioksidan	0,780	0,004
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,741	0,004
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,716	0,005
	Peroksidaz inhibitörü	0,538	0,034
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,167	0,023
Hiperozit	Serbest radikal süpürücü	0,978	0,001
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,976	0,002
	Antioksidan	0,913	0,003
	Kinaz inhibitörü	0,843	0,004
	Peroksidaz inhibitörü	0,676	0,015
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,581	0,013
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,243	0,011
Fisetin	Peroksidaz inhibitörü	0,953	0,001
	Kinaz inhibitörü	0,950	0,002
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,903	0,001
	Antioksidan	0,787	0,004
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,755	0,004
	Serbest radikal süpürücü	0,753	0,003
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,629	0,009
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,570	0,035
	A β agregasyon inhibitörü	0,195	0,017
Kemferol	Kinaz inhibitörü	0,959	0,001
	Peroksidaz inhibitörü	0,956	0,001
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,926	0,001
	Antioksidan	0,856	0,003
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,783	0,004
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,777	0,004
	Serbest radikal süpürücü	0,771	0,003
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,545	0,048
	A β agregasyon inhibitörü	0,182	0,019

Çizelge 4.13. (devam) Seçilen doğal kaynaklı bileşiklerin AH'na karşı potansiyel biyolojik aktivite tahminleri

Kersetin	Peroksidaz inhibitörü	0,962	0,001
	Antioksidan	0,872	0,003
	Serbest radikal süpürücü	0,811	0,003
	Kinaz inhibitörü	0,809	0,005
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,788	0,004
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,776	0,004
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,512	0,067
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,386	0,004
	A β agregasyon inhibitörü	0,213	0,014
Mirisetin	Peroksidaz inhibitörü	0,966	0,001
	Kinaz inhibitörü	0,958	0,001
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,944	0,001
	Antioksidan	0,924	0,003
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,836	0,003
	Serbest radikal süpürücü	0,832	0,002
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,761	0,004
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,482	0,086
	A β agregasyon inhibitörü	0,232	0,012
Morin	Kinaz inhibitörü	0,959	0,001
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,904	0,001
	Antioksidan	0,850	0,003
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,783	0,004
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,777	0,004
	Serbest radikal süpürücü	0,759	0,003
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,491	0,080
	Peroksidaz inhibitörü	0,439	0,047
	A β agregasyon inhibitörü	0,152	0,028
Hesperetin	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,885	0,003
	Serbest radikal süpürücü	0,878	0,002
	Kinaz inhibitörü	0,818	0,005
	Peroksidaz inhibitörü	0,812	0,004
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,778	0,004
	Antioksidan	0,746	0,004
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,419	0,126
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,267	0,009
	A β agregasyon inhibitörü	0,183	0,019
Naringin	Serbest radikal süpürücü	0,981	0,001
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,978	0,002
	Antioksidan	0,851	0,003
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,591	0,012
	Kinaz inhibitörü	0,477	0,039

Çizelge 4.13. (devam) Seçilen doğal kaynaklı bileşiklerin AH'na karşı potansiyel biyolojik aktivite tahminleri

Taksifolin	Antioksidan	0,938	0,002
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,915	0,002
	Serbest radikal süpürücü	0,877	0,002
	Kinaz inhibitörü	0,850	0,004
	Peroksidaz inhibitörü	0,826	0,004
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,434	0,116
	A β agregasyon inhibitörü	0,219	0,013
EGCG	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,946	0,002
	Serbest radikal süpürücü	0,934	0,001
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,856	0,003
	Antioksidan	0,814	0,003
	Peroksidaz inhibitörü	0,759	0,007
	Kinaz inhibitörü	0,586	0,022
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,270	0,009
Kateşin	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,888	0,003
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,863	0,003
	Serbest radikal süpürücü	0,842	0,002
	Antioksidan	0,810	0,003
	Kinaz inhibitörü	0,743	0,009
	Peroksidaz inhibitörü	0,721	0,010
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,440	0,112
	A β agregasyon inhibitörü	0,428	0,006
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,267	0,009
	Hyaluronik asit agonisti	0,266	0,070
	Astrenjan	0,085	0,069
Daidzein	Peroksidaz inhibitörü	0,797	0,005
	Kinaz inhibitörü	0,722	0,011
	Antioksidan	0,623	0,004
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,564	0,015
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,547	0,047
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,537	0,013
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,430	0,004
	Serbest radikal süpürücü	0,353	0,022
	A β agregasyon inhibitörü	0,109	0,057
	Anti-amiloidojenik	0,202	0,174
	Genistein	Kinaz inhibitörü	0,844
Peroksidaz inhibitörü		0,842	0,004
Antioksidan		0,765	0,004
<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı		0,726	0,005
Sistationin β -sentaz inhibitörü		0,674	0,003
Lipit peroksidaz inhibitörü		0,667	0,006
Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan		0,485	0,084
Serbest radikal süpürücü		0,458	0,013
A β agregasyon inhibitörü		0,118	0,048

Çizelge 4.13. (devam) Seçilen doğal kaynaklı bileşiklerin AH'na karşı potansiyel biyolojik aktivite tahminleri

Glisitein	Peroksidaz inhibitörü	0,791	0,005
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,734	0,004
	Kinaz inhibitörü	0,712	0,012
	Antioksidan	0,607	0,004
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,533	0,021
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,516	0,065
	Serbest radikal süpürücü	0,506	0,010
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,291	0,007
	A β agregasyon inhibitörü	0,124	0,043
	<i>Trans-Resveratrol</i>	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,923
Peroksidaz inhibitörü		0,825	0,004
Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan		0,587	0,028
Lipit peroksidaz inhibitörü		0,585	0,010
Serbest radikal süpürücü		0,572	0,007
Antioksidan		0,546	0,005
Kinaz inhibitörü		0,521	0,031
Sistationin β -sentaz inhibitörü		0,379	0,005
A β agregasyon inhibitörü		0,361	0,007
Antiamiloidojenik		0,286	0,092
Amentoflavon	Kinaz inhibitörü	0,929	0,002
	Peroksidaz inhibitörü	0,859	0,004
	Sistationin β -sentaz inhibitörü	0,801	0,002
	<i>APOA1</i> ekspresyonu artırıcı	0,726	0,005
	Serbest radikal süpürücü	0,658	0,005
	Antioksidan	0,652	0,004
	Lipit peroksidaz inhibitörü	0,582	0,010
	Asetilkolin nöromusküler bloke edici ajan	0,483	0,085
A β agregasyon inhibitörü	0,177	0,020	

^aP_a: Aktif olma ^bP_i: İnaktif olma ^cApolipoprotein A-1

4.13. *In Silico* Toksikite Tayinine Ait Bulgular

Tez gereçlerimizi teşkil eden fenolik bileşikler, sitotoksosite potansiyelleri ve insanlardaki olası toksik etkilerin tahmini amacıyla PASS yazılım programı ile taranmış, en yüksek olasılığa sahip ilk 3 advers/toksik etki belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.14.'te verilmiştir. PASS çevrimiçi yazılımının MNA tanımlayıcıları bazı kriterlerin sağlanması koşulu ile hesaplanabilmektedir. Bu kriterler arasında molekülün molekül ağırlığı, kovalent bağ varlığı, karbon atomu sayısı ve bileşik yükü gibi özellikler sayılmaktadır. Ancak pelargonidin, PASS yazılımı tarafından analiz edilememiştir. Moleküler yapının yüksüz olması durumunda MNA tanımlayıcılarının belirlenebileceği kriterine istinaden, pelargonidinde bulunan oksijen atomunun + yüklü olması nedeniyle, ilgili bileşiğe ait toksisite tahmini yapılamamıştır.

Çizelge 4.14. Seçilen fenolik bileşiklerin insanlarda oluşturabileceği potansiyel toksik veya advers etki tahminleri

Fenolik Bileşikler	Biyolojik Aktivite	Olasılık	
		P _a ^a	P _i ^b
Gallik asit	Hematemezis	0,939	0,003
	Aft	0,934	0,003
	Gastrointestinal kanama	0,887	0,003
Sirinjik asit	Gastrointestinal kanama	0,907	0,003
	Hematemezis	0,897	0,004
	Aft	0,888	0,004
Vanilik asit	Ülser, aft	0,913	0,003
	Gastrointestinal kanama	0,910	0,003
	Hematemez	0,899	0,004
D-(-)-Kinik asit	Solunum toksisitesi	0,932	0,014
	Titreme	0,871	0,013
	Aft	0,855	0,008
Elajik asit	Hematemezis	0,830	0,010
	Solunum toksisitesi	0,829	0,023
	Titreme	0,829	0,026
Kafeik asit	İdrarda renk değişikliği	0,902	0,004
	Hematemezis	0,885	0,005
	Aft	0,877	0,005
p-Kumarik asit	Hematemezis	0,901	0,004
	Titreme	0,896	0,007
	İdrarda renk değişikliği	0,853	0,005
Trans-Ferulik asit	İdrarda renk değişikliği	0,839	0,007
	İrritasyon	0,819	0,004
	Hiperkolesterolemi	0,812	0,004
Klorojenik asit	Nörotoksosite	0,874	0,008
	Sensitizasyon	0,832	0,004
	İrritasyon	0,801	0,005
Rozmarinik asit	İdrarda renk değişikliği	0,739	0,015
	Titreme	0,748	0,059
p-Tirozol	Hematemezis	0,904	0,004
	İdrarda renk değişikliği	0,899	0,004
	Titreme	0,888	0,008
3-Hidroksitirozol	İdrarda renk değişikliği	0,930	0,003
	Hematemezis	0,889	0,004
	Ortostotik hipotansiyon	0,884	0,005
Oleuropein	Hiperkolesterolemi	0,761	0,009
	Enflamasyon	0,646	0,032
	Bulantı	0,630	0,055
Apigenin	Vasküler toksisite	0,833	0,011
	Titreme	0,835	0,024
	Üreme bozukluğu	0,805	0,018
Luteolin	Genotoksosite	0,824	0,004
	Üreme bozukluğu	0,819	0,016
	Titreme	0,823	0,028

Çizelge 4.14. (devam) Seçilen fenolik bileşiklerin insanlarda oluşturabileceği potansiyel toksik veya advers etki tahminleri

Diosmetin	Vasküler toksisite	0,858	0,008
	Genotoksisite	0,780	0,004
	Üreme bozukluğu	0,785	0,020
Tangeretin	Vasküler toksisite	0,793	0,019
	Yoksunluk	0,638	0,037
	Hipotermi	0,625	0,027
Trisin	Vasküler toksisite	0,822	0,013
	Üreme bozukluğu	0,782	0,021
	Genotoksisite	0,713	0,004
İzokersitrin	Enflamasyon	0,930	0,005
	Hematotoksisite	0,919	0,009
	Diyare	0,905	0,010
Orientin	Diyare	0,907	0,010
	Vasküler toksisite	0,853	0,009
	Nörotoksisite	0,834	0,014
Viteksin	Diyare	0,903	0,010
	Vasküler toksisite	0,845	0,009
	Enflamasyon	0,803	0,015
Hiperozit	Enflamasyon	0,930	0,005
	Hematotoksisite	0,919	0,009
	Diyare	0,905	0,010
Fisetin	Titreme	0,823	0,028
	Genotoksisite	0,761	0,004
	Vasküler toksisite	0,755	0,026
Kemferol	Genotoksisite	0,843	0,003
	Vasküler toksisite	0,773	0,023
	Titreme	0,783	0,044
Kersetin	Vasküler toksisite	0,797	0,018
	Titreme	0,766	0,052
	Endokrin bozucu	0,706	0,014
Mirisetin	Enflamasyon	0,763	0,019
	Hematotoksisite	0,774	0,031
Morin	Genotoksisite	0,800	0,004
	Vasküler toksisite	0,773	0,023
	Titreme	0,783	0,044
Hesperetin	Enflamasyon	0,796	0,015
	Vasküler toksisite	0,791	0,019
	Genotoksisite	0,687	0,005
Naringin	Enflamasyon	0,965	0,004
	Diyare	0,906	0,010
	Nörotoksisite	0,886	0,007
	Genotoksisite	0,877	0,003
Taksifolin	Diyare	0,830	0,020
	Vasküler toksisite	0,796	0,018
	Enflamasyon	0,728	0,022

Çizelge 4.14. (devam) Seçilen fenolik bileşiklerin insanlarda oluşturabileceği potansiyel toksik veya advers etki tahminleri

Epigallokateşin gallat	Enflamasyon	0,811	0,014
	Vasküler toksisite	0,804	0,017
	Hipertermi	0,671	0,022
Kateşin	Vasküler toksisite	0,797	0,018
	Titreme	0,766	0,052
	Endokrin bozucu	0,706	0,014
Daidzein	Hipokalsemi	0,775	0,002
	Titreme	0,783	0,044
	Karsinojenite (IARC ^c Grup 3)	0,715	0,005
Genistein	Karsinojenite (IARC Grup 3)	0,832	0,004
	Hipotermi	0,798	0,006
	Diyare	0,762	0,031
Glisitein	Hipotermi	0,801	0,006
	Hipokalsemi	0,730	0,003
	Peptik ülser	0,589	0,011
<i>Trans</i> -Resveratrol	İdrarda renk değişikliği	0,905	0,004
	Hematemezis	0,901	0,004
	Titreme	0,899	0,006
	Hematemezis	0,797	0,014
Amentoflavon	Genotoksisite	0,886	0,003
	Vasküler toksisite	0,806	0,016
	Üreme bozukluğu	0,767	0,023

^aP_a: Aktif olma ^bP_i: İnaktif olma ^cInternational Agency for Research on Cancer

4.14. Moleküler Modelleme Çalışmalarına Ait Bulgular

4.14.1. AChE ile gerçekleştirilen moleküler modelleme çalışmalarına ait bulgular

AChE enzimine karşı inhibitör etkileri belirlenen kersetin, oleuropein, rozmarinik asit, 3-hidroksitirozol, gallik asit ve EGCG'ın enzim aktif bölgesini oluşturan amino asitlerle meydana getirdikleri etkileşimler moleküler kenetlenme çalışması ile incelenmiştir. Çalışmalarda reseptör olarak donepezil-bağlı insan AChE (PDB kodu: 4EY7) seçilmiştir (Cheung ve diğerleri 2012).

Moleküler kenetlenme sonuçlarına göre bileşiklerin enzim aktif bölgesinin katalitik üçlü cebine ulaşabildiği ve genel olarak oksanyon bölgesine ait amino asitlerle etkileştiği gözlenmiştir (Şekil 4.11.).

Kersetin, benzopiranon halkası ile enzimin katalitik bölgesine yönelmiştir. Bu yönelme sayesinde kersetinin benzopiranon halkası ile katalitik üçlü üyelerinden S203 ve H447 arasında sırasıyla hidrojen bağı ve π - π etkileşimi meydana gelmiştir. Kersetini aktif bölgede stabilize eden diğer π - π etkileşimleri ise yine benzopiranon halkası ile oksianyon bölgesine ait F338 arasında meydana gelmiştir. Bu etkileşimlere ek olarak, benzopiranon halkasına bağlı fenil halkasının 3. konumunda yer alan hidroksil grubu, açıl bağlama bölgesine ait F295 amino asiti ile hidrojen bağı üzerinden etkileşmiştir (Şekil 4.11.-A). Kersetin için AChE bağlanma enerjisi -12.24 kkal/mol olarak hesaplanmıştır.

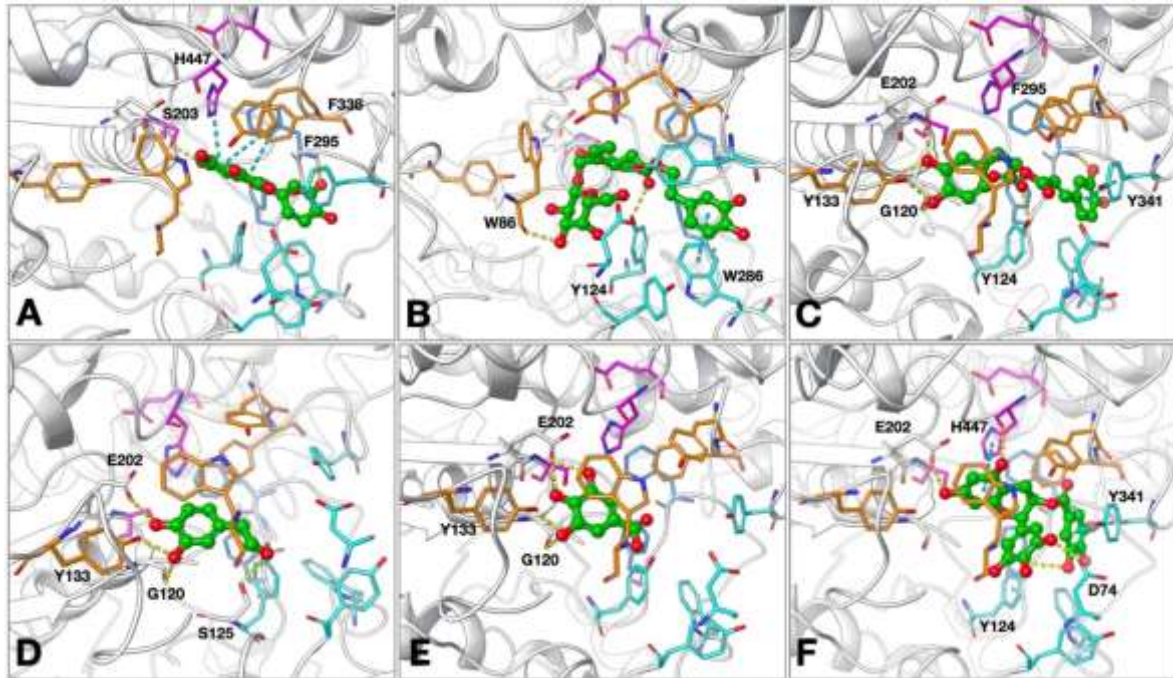
Oleuropein, oksianyon bölgesini işgal ederken PAS bölgesini oluşturan amino asitlerle de etkileşmektedir. Yapısında bulunan tetrahidropiran halkası üzerinde 4. konumda yer alan hidroksil grubu ile oksianyon bölgesinin üyesi W86 yan zinciri ile hidrojen bağı üzerinden etkileşmiştir. PAS bölgesiyle tespit edilen diğer etkileşimler ise karbonil grubu ile Y124 arasındaki hidrojen bağı, dihidroksifenil halkası ile W286 arasındaki π - π etkileşim olarak gözlenmiştir (Şekil 4.11.-B). Oleuropein için bağlanma enerjisi -11.58 kkal/mol olarak hesaplanmıştır.

Rozmarinik asit, AChE aktif bölgesine oksianyon ve PAS bölgelerini işgal ederek yerleşmiştir. Karboksilik asit grubuna yakın olan fenil halkası üzerindeki hidroksil grupları ile G120, Y133 ve E202 amino asitleri arasında hidrojen bağlarının varlığı gözlenmiştir. Karboksilik asit grubu, PAS bölgesinin üyesi olan Y124 ile hidrojen bağı üzerinden etkileşmiştir. Bileşik yapısındaki diğer dihidroksifenil halkası ise PAS bölgesine ait Y341 ile π - π etkileşimi oluşturmuştur (Şekil 4.11.-C). Rozmarinik asit için bağlanma enerjisi -11.26 kkal/mol olarak hesaplanmıştır.

Hidroksitirozol, oksianyon bölgesiyle etkileşerek enzim aktif bölgesine yerleşmiştir. Fenil halkasının 3. konumunda yer alan hidroksil grubu Y133 ve G120 amino asitleriyle, 4. konumunda yer alan hidroksil grubu E202 ile hidrojen bağı etkileşimine girerken, etil grubuna bağlı hidroksil grubu ise aktif bölge girişinde yer alan S125 ile hidrojen bağı oluşturmuştur (Şekil 4.11.-D). Hidroksitirozol için bağlanma enerjisi -6.45 kkal/mol olarak hesaplanmıştır.

Gallik asit, yapısal olarak küçük bir bileşik olduğundan enzim aktif bölgesinin derin kısmına kadar ilerleyebilmiş ve katalitik üçlüyü oluşturan amino asitlerin yakınında konumlanmıştır. Yapısındaki hidroksil grupları ile G120, Y133 ve E202 amino asitleriyle hidrojen bağları meydana getirerek enzim-inhibitör kompleksini stabilize etmiştir (Şekil 4.11.-E). Gallik asit için AChE bağlanma enerjisi -5.92 kkal/mol olarak hesaplanmıştır.

EGCG, benzopiran halkasında yer alan hidroksil grubu E202 ve katalitik üçlü üyesi H447 yan zinciri ile hidrojen bağları oluşturmuş, benzopiran halkası ile de H447 arasında π - π etkileşimi gözlenmiştir. Benzopiran halkasına doğrudan bağlanan trihidroksifenil halkasının hidroksil gruplarının PAS bölgesi üyesi D74 ile hidrojen bağları oluştururken, gallat kısmının Y341 ile π - π etkileşimi üzerinden bağlantı kurduğu görülmüştür (Şekil 4.11.-F). EGCG için AChE bağlanma enerjisi -12.95 kkal/mol olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.11. İnsan AChE aktif bölgesinde (PDB kodu: 4EY7) kersetin (A), oleuropein (B), rosmarinik asit (C), 3-hidroksitirozol (D), gallik asit (E) ve EGCG (F) için belirlenen bağlantı konformasyonları. Hidrojen bağları sarı, π - π etkileşimleri ise turkuaz kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

4.14.2. BChE ile gerçekleştirilen moleküler modelleme çalışmalarına ait bulgular

BChE enzimine karşı inhibitör etkileri belirlenen kersetin, oleuropein, rozmarinik asit, 3-hidroksitirozol, gallik asit ve EGCG'ın enzim aktif bölgesini oluşturan amino asitlerle meydana getirdikleri etkileşimler moleküler kenetlenme deneyleri ile incelenmiştir. Çalışmalarda reseptör olarak *N*-[(1-(2,3-dihidro-1H-inden-2-il)piperidin-3-il)metil]-*N*-(2-metoksietil)-2-naftamit bağlı insan BChE (PDB kodu: 4TPK) seçilmiştir (Brus ve diğerleri 2014).

Moleküler kenetlenme sonuçlarına göre bileşiklerin enzim aktif bölgesinin katalitik üçlü cebine ulaşabildiği ve ağırlıklı olarak oksianyon bölgesine ait amino asitlerle etkileştiği gözlenmiştir (Şekil 4.12.).

Kersetin, benzopiranon halkası üzerinde yer alan hidroksil grubu ile G117 ve katalitik üçlü üyesi S198 arasında su (HOH767)-aracılı hidrojen bağı ağı meydana getirmiştir. Benzopiranon halkasıyla oksianyon bölgesinde yer alan F329 arasında π - π etkileşimlerine ek olarak fenil halkasına ait hidroksil grupları H438 ve Y440 ile hidrojen bağı üzerinden etkileşime girmiştir (Şekil 4.12.-A). Kersetin için BChE bağlanma enerjisi -8.60 kkal/mol olarak hesaplanmıştır.

Oleuropein, tetrahidropirran halkası üzerindeki hidroksil grupları ile H438, Y440 arasında doğrudan hidrojen bağı etkileşimi göstererek enzim aktif bölgesinin katalitik üçlü kısmına yaklaşmıştır. Bileşik, u-şeklinde gösterdiği bağlanma modu ile PAS bölgesini de işgal ederken terminal dihidroksifenil halkası ile F329 arasında π - π etkileşimi oluşturarak oksianyon bölgesine tutunmuştur (Şekil 4.12.-B). Oleuropein için BChE bağlanma enerjisi -11.41 kkal/mol olarak hesaplanmıştır.

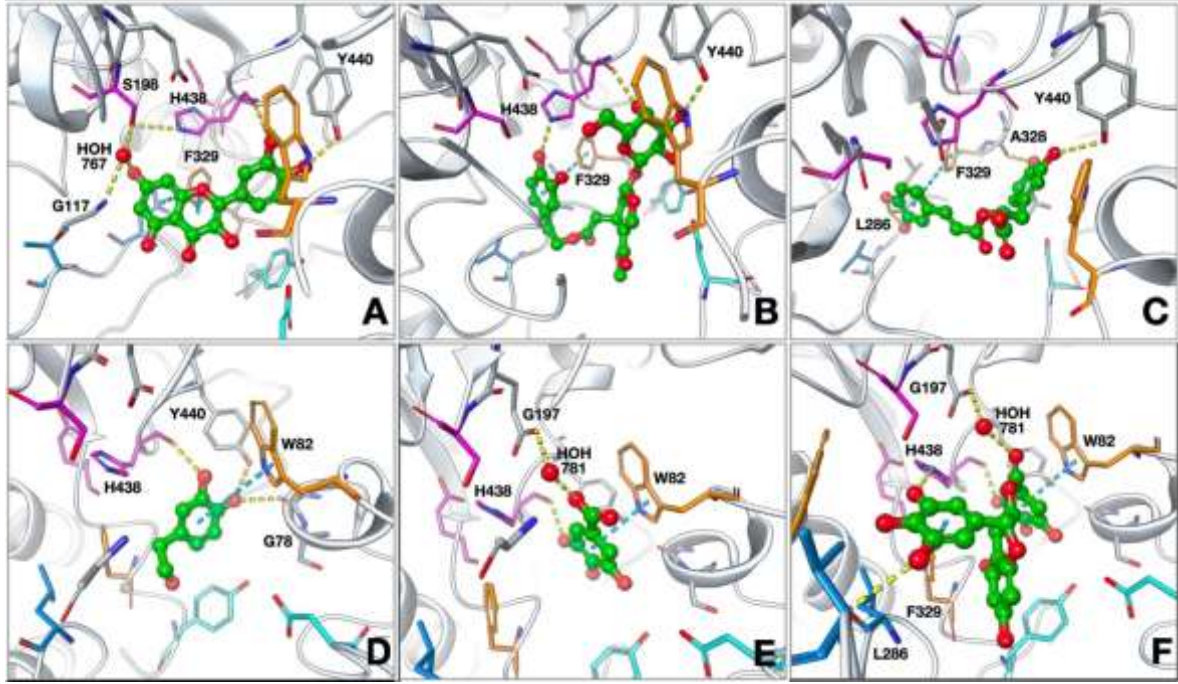
Rozmarinik asit için, BChE aktif bölgesinde aldığı konformasyon incelendiğinde terminal fenil halkası üzerindeki hidroksil grupları ile açıl bağlama bölgesi üyesi olan L286 arasında hidrojen bağları üzerinden bir etkileşim; karboksilik asit grubuna yakın konumlanan diğer fenil halkasındaki hidroksil grupları ile A328 ve Y440 arasında hidrojen bağları üzerinden etkileşimler gözlenmiştir. Ayrıca terminal fenil halkası F329 ile π - π etkileşimi meydana

getirmiştir (Şekil 4.12.-C). Rozmarinik asit için BChE bağlanma enerjisi -10.39 kkal/mol olarak hesaplanmıştır.

3-Hidroksitirozol, oksianyon bölgesiyle katalitik üçlü arasında yer alan bir bölgede konumlanarak aktif bölgeye yerleşmiştir. Fenil halkasının 3. konumunda yer alan hidroksil grubu katalitik üçlü üyesi H438 ile hidrojen bağı meydana getirirken, halka üzerindeki diğer hidroksil grubu G78 ve Y440 ile hidrojen bağı üzerinden etkileşime girmiştir. Halka ise oksianyon bölgesinin üyesi olan W82 ile π - π etkileşimde bulunmuştur (Şekil 4.12.-D). Hidroksitirozol için bağlanma enerjisi -6.14 kkal/mol olarak hesaplanmıştır.

Gallik asit, yapısındaki fenil halkası ile oksianyon bölgesinin üyesi W82 ile π - π etkileşimde bulunurken, halka üzerinde 3. konumda yer alan hidroksil grubu ile katalitik üçlü üyesi H438 ile hidrojen bağı meydana getirmiştir. Karboksilik asit grubu üzerinden E197 ile su (HOH781) köprülü hidrojen bağı oluşturarak enzim-inhibitör kompleksini stabilize etmiştir (Şekil 4.12.-E). Gallik asit için BChE bağlanma enerjisi -6.03 kkal/mol olarak hesaplanmıştır.

EGCG, benzopiran halkasına doğrudan bağlı trihidroksifenil halkası ile L286 ve H438 arasında hidrojen bağları, F329 ile de π - π etkileşimi oluşturmuştur. Terminal fenil halkası W82 ile π - π etkileşimi üzerinden bağlantı kurarken, yine bu halkaya bağlı karbonil grubu G197 ile su (HOH781) aracılı hidrojen bağı meydana getirmiştir. Enzim-inhibitör kompleksini stabilize eden bir diğer etkileşim ise terminal fenil halkasına bağlı hidroksil grubunun katalitik üçlü üyesi H438 amino asidinin yan zinciriyle oluşturduğu hidrojen bağıdır (Şekil 4.12.-F). EGCG için BChE bağlanma enerjisi -13.52 kkal/mol olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.12. İnsan BChE aktif bölgesinde (PDB kodu: 4TPK) kersetin (A), oleuropein (B), rozmarinik asit (C), 3-hidroksitirozol (D), gallik asit (E) ve EGCG (F) için belirlenen bağlantı konformasyonları. Hidrojen bağları sarı, π - π etkileşimleri ise turkuaz kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

4.14.3. BACE1 ile gerçekleştirilen moleküler modelleme çalışmalarına ait bulgular

BACE1 enzimine karşı inhibisyon etkileri belirlenen rozmarinik asit, EGCG, oleuropein, kersetin, gallik asit ve 3-hidroksitirozol bileşiklerinin enzim aktif bölgesini oluşturan amino asitlerle meydana getirdikleri etkileşimler moleküler modelleme çalışması ile incelenmiştir.

Çalışmalarda reseptör olarak sikloheksankarboksilik asit bağlı insan BACE1 (PDB kodu: 2WJO) seçilmiştir (Bao ve diğerleri 2023). Elde edilen sonuçlara göre tüm bileşiklerin BACE1 enziminin katalitik olmayan bölgesini işgal ettiği görülmüştür. Farklı olarak, rozmarinik asit ve EGCG, katalitik aspartik amino asitlerinden D228 ile hidrojen bağı üzerinden etkileşim göstermişlerdir (Şekil 4.13.).

Rozmarinik asit için belirlenen bağlantı moduna göre, fenolik hidroksil grupları ile D228 ve T231 arasında, karboksilik asit oksijeni ile de Y198 arasında hidrojen bağı gözlenmiştir (Şekil 4.13.-A). Rozmarinik asit için BACE1 bağlanma enerjisi -7.49 kkal/mol olarak hesaplanmıştır.

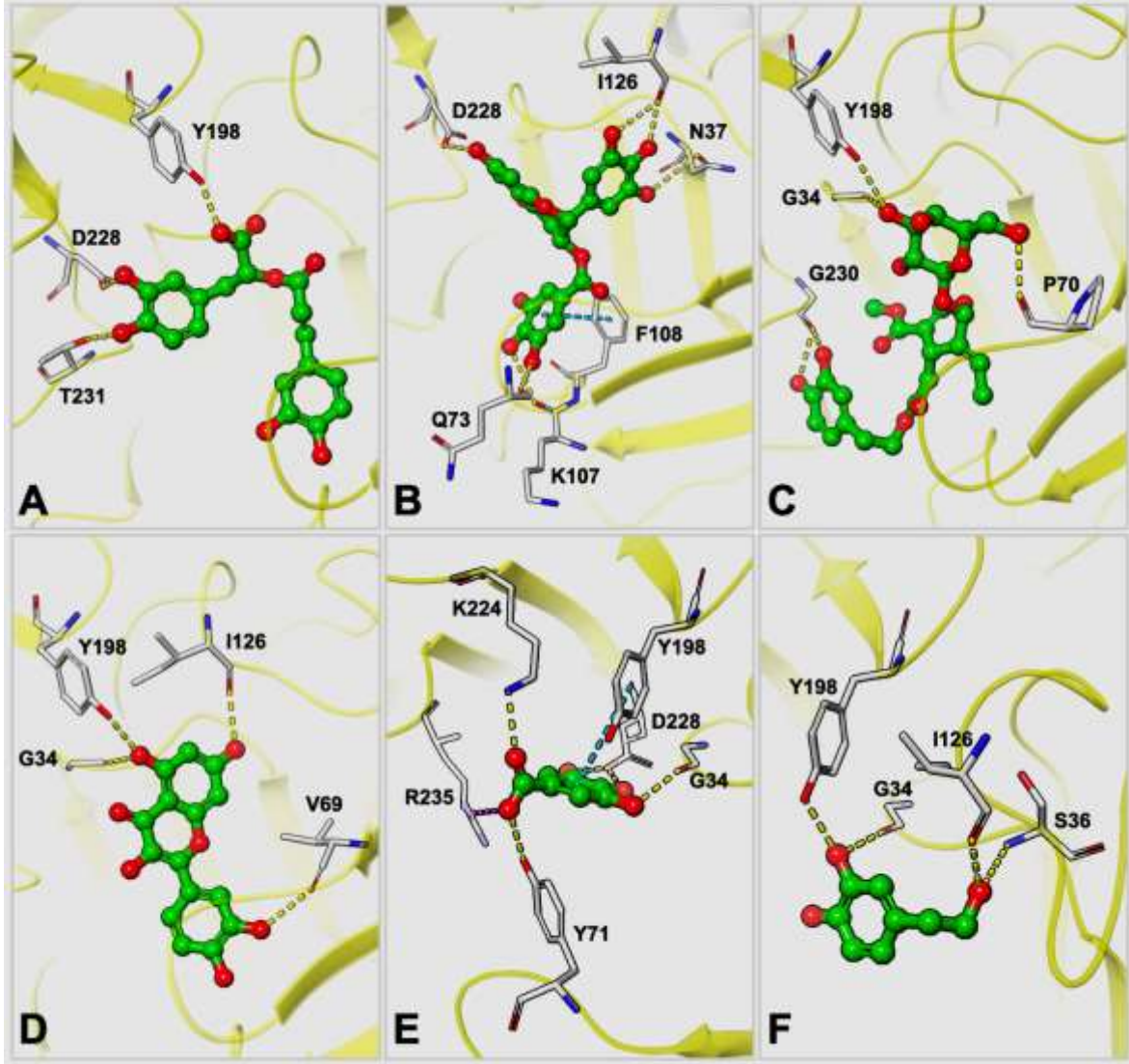
EGCG için sonuçlar incelendiğinde, benzopiran halkasında yer alan hidroksil grubunun katalitik D228 ile, benzopiran halkasına doğrudan bağlanan trihidroksifenil halkasının hidroksil gruplarının N37 ve I126 ile hidrojen bağ oluşturduğu, gallat kısmının ise Q73 ve K107 ile hidrojen bağ, F108 ile ise π - π etkileşimi kurduğu gözlenmiştir (Şekil 4.13.-B). EGCG için BACE1 bağlanma enerjisi -10.23 kkal/mol olarak hesaplanmıştır.

Oleuropein, dihidroksifenil grubu ile G230 amino asiti yakınına yerleşerek hidrojen bağ oluşturmuş, piran halkasına ait hidroksil grupları ile de G34, P70 ve Y198 amino asitleriyle hidrojen bağ üzerinden etkileşime girmiştir (Şekil 4.13.-C). Oleuropein için BACE1 bağlanma enerjisi -9.59 kkal/mol olarak hesaplanmıştır.

Kersetin, benzopiranon halkası ile oleuropein yapısındaki piran halkasına benzer bir konumlama göstererek, G34, I126 ve Y198 ile hidrojen bağ oluşturmuştur. Ayrıca benzopiranon halkasına bağlı fenil halkasının 3. konumunda yer alan hidroksil grubu, V69 birimi ile hidrojen bağ oluşturarak kersetin:BACE1 kompleksini stabilize etmiştir (Şekil 4.13.-D). Kersetin için BACE1 bağlanma enerjisi -9.04 kkal/mol olarak hesaplanmıştır.

Gallik asit, Y198 ile π - π etkileşimi oluştururken, karboksilik asit kalıntısı ile Y71 ve K224 ile hidrojen bağları, R235 ile ise tuz köprüsü meydana getirmiştir. Halka üzerindeki hidroksil grupları ile de G34 ve D228 amino asitleri arasında hidrojen bağları gözlenmiştir (Şekil 4.13.-E). Gallik asit için BACE1 bağlanma enerjisi -5.31 kkal/mol olarak hesaplanmıştır.

3-Hidroksitirozol, fenil halkasının 3. konumundaki hidroksil grubu ile hem G34 ile hem de Y198 ile hidrojen bağları üzerinden etkileşmiş, etil grubuna bağlı hidroksil grubu ile ise S36 ve I26 amino asitleri ile hidrojen bağları meydana getirmiştir (Şekil 4.13-F). 3-Hidroksitirozol için BACE1 bağlanma enerjisi -5.68 kkal/mol olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.13. İnsan BACE1 aktif bölgesinde (PDB kodu: 2WJO) rozmarinik asit (A), EGCG (B), oleuropein (C), kersetin (D), gallik asit (E) ve 3-hidroksitirozol (F) için belirlenen bağlantı konformasyonları. Hidrojen bağları sarı, π - π etkileşimleri turkuaz, tuz köprüsü ise pembe kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA

İlerleyici bir nörodejeneratif hastalık olan AH'nın dünya çapında yaklaşık 416 milyon insanı etkilediği ve demansın en yaygın tipi olduğu bilinmektedir (Gustavsson ve diğerleri 2022; Heneka ve diğerleri 2015). Sağlık alanında bugüne kadar yapılmış araştırmalar ve gelişen teknoloji yaşam süresi ve hayat kalitesini artırmış olsa da AH gibi yaşa bağlı hastalıkların görülme sıklığı artmıştır. AH tedavisinde mevcut farmakoterapi sadece semptomları gidermeye yöneliktir ve hastalığın seyrini geriye çevirmede sınırlı kalmaktadır (Alexander ve diğerleri 2014; Cooper ve Baculi, 1968; Venkatesan ve diğerleri 2015). Bu sebeple, AH patolojisinin karmaşıklığı ve görülme sıklığındaki artış da göz önüne alınırsa etkili bir tedavi geliştirmek halen önem arz etmektedir (Anderson ve diğerleri 2014). Konvansiyonel ilaçlar AH ve diğer birçok kronik hastalığın tedavisinde faydalı olsa da yan etkileri mevcuttur. Bu sebeple fitokimyasallar, antikolinesteraz, antioksidan, anti-enflamatuvar vb. etkilerinin yanısıra yan etkilerinin daha az olmasıyla terapötik açıdan umut vaat etmektedir (Rasool ve diğerleri 2014). Tıbbi ve aromatik bitkilerin, içerdikleri fitokimyasallar aracılığı ile AH'nın başlangıcını ve ilerlemesini yavaşlattığı, aynı zamanda antiamiloidojenik, anti-enflamatuvar ve antioksidatif özellikleriyle de hastalığın tedavisinde rol oynadığı etnofarmakolojide, özellikle geleneksel Çin tıbbındaki kullanımlarıyla bilinmektedir (Venkatesan ve diğerleri 2015). Hayvansal drogların da nöroprotektif etkilerine dair çalışmalar mevcuttur. Örneğin Kore tıbbında kullanılan arı zehrinin, hücre ölümüne karşı koruma ile nörodejeneratif hastalıklarda glutamaterjik nörotoksisiteye karşı umut verici etkisi olduğu ortaya konmuştur (Lee ve diğerleri 2012). Ayrıca, omurgasız deniz canlılarından izole edilen bazı bileşiklerin de AChE inhibisyonu ile AH tedavisinde umut verici olduğu rapor edilmiştir (Farrokhnia ve Nabipour, 2014). Günümüzde AH tedavisinde FDA tarafından onay alan AChE inhibitörleri ve NMDA reseptör antagonisti olan memantin, klinikte günümüzde ilaç tedavisi olarak kullanılmaktadır (Dou ve diğerleri 2018; Guo ve diğerleri 2020; Kishi ve diğerleri 2017; Reisberg ve diğerleri 2003).

Bunların yanında son yıllarda tedavide BACE, BChE, metal şelasyonu, tau proteini ve Aβ gibi hedeflerin yanında AH patogenezinde rol oynadıkları düşünülen östrojen, E vitamini, selejilin ve anti-enflamatuvar ilaçlar üzerinde de araştırmalar devam etmektedir (Darvesh,

2016; Das ve diğeri 2021; Ghosh ve Osswald, 2014; Ozben ve Ozben, 2019; Panek ve diğeri 2017; Wong ve diğeri 2019).

Tezimizde kolinesteraz enzim inhibisyonu, *Drosophila melanogaster* nöroprotektif etki modeli ile farelerde pasif kaçınma testi ile anti-amnezik aktivite tayini çalışmalarında referans ilaç olarak kullanılan galantamin; Amaryllidaceae familyasında yer alan *Galanthus nivalis* L., *Narcissus* spp. ve *Lycoris radiata* Herb. gibi tıbbi bitkilerden elde edilen bir alkaloiddir. Ayrıca, galantamin kompetitif ve selektif bir AChE inhibitörü olup, AH'nın klinik tedavisinde kullanılan rivastigmin ve donepezil gibi beyine selektif özellik gösterir ve sitokrom P450 enzimi ile metabolize edilmektedir (Atrahimovich ve diğeri 2021; Bickel ve diğeri 1991; Bullock, 2004; Gulcan ve diğeri 2015; Howes ve Houghton, 2003; Marco ve Carreiras, 2006; Prvulovic ve diğeri 2010; Scheltens ve diğeri 2021). Bunun yanında, galantaminin klinik kullanımında bulantı ve kusma gibi hafif yan etkileri yaygın olarak bildirilse de, hepatotoksisiteye sebep olmadığı gösterilmiştir (Sramek ve diğeri 2000).

Tez çalışmamızda, tıbbi bitkilerde bulunan en yaygın sekonder metabolit grubu olan fenolik bileşikler arasından, özellikle tezimizde kullanılan deney modellerinin çoğunda daha önce test edilmemiş olmalarına göre seçilen 38 adet bileşiğin (Çizelge 3.1.) AH'na karşı etkileri *in vitro*, *in vivo* ve *in silico* deney modelleri aracılığıyla incelenmiş ve elde edilen sonuçlar "Bulgular" başlığı altında detaylı şekilde verilmiştir. Bu sonuçlara göre; *in vitro* enzim inhibisyonu deneylerinde taradığımız fenolik bileşiklerden rozmarinik asit, kafeik asit, gallik asit, kersetin, apigenin, *trans*-resveratrol, oleuropein, fisetin, EGCG, 3-hidroksitirozol ve taksifolin 1 mM final konsantrasyonda AChE'ye karşı % 50'nin üzerinde inhibisyon gösterirken; rozmarinik asit, gallik asit, kersetin, *trans*-resveratrol, oleuropein, fisetin, EGCG ve 3-hidroksitirozol BChE'yi % 50'nin üzerinde inhibe eden bileşikler olmuştur (Çizelge 4.1.). Kolinesteraz enzimlerini % 50'nin üzerinde inhibe eden fenolik bileşiklere ait IC₅₀ değerleri de Çizelge 4.2.'de verilmiştir. Elde ettiğimiz verilere göre, aslında her iki enzimi de inhibe eden rozmarinik asit, gallik asit, kersetin, *trans*-resveratrol, oleuropein, fisetin, EGCG ve 3-hidroksitirozol dual inhibitör olarak *in vitro* enzim inhibisyon deney sonuçlarımızda ön plana çıkan fenolik bileşikler olarak saptanmıştır. Tezimizde elde ettiğimiz sonuçlarla uyumlu şekilde sonuçlar literatürde mevcuttur (Cheng, 2018; Kocakaya ve diğeri 2020;

Kuppusamy ve diğ erleri 2017; Nazir ve diğ erleri 2020; Nugroho ve diğ erleri 2017; Okello ve Mather, 2020; Omar ve diğ erleri 2018a; Orhan ve diğ erleri 2008; Pan ve diğ erleri 2014).

Yine bu bileş iklerin BACE1 enzim inhibisyon sonuç larına bakıld ığında; EGCG (IC_{50} : $0,162 \pm 0,012$ mM) ve *trans*-resveratrol'ün (IC_{50} : $0,180 \pm 0,017$ mM) referans olarak belirlenen kersetinden (IC_{50} : $0,316 \pm 0,030$ mM) daha yüksek inhibisyon gösterdiğ i, rozmarinik asit ve oleuropeinin de sı rasıyla IC_{50} : $0,406 \pm 0,068$ mM ve IC_{50} : $0,987 \pm 0,101$ mM inhibisyona sahip olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.3). Ayrıca, tezimizde yüksek BACE1 inhibitör aktivite gösteren EGCG'nin diğ er ç alışmalarda referans inhibitör olarak kullanıld ığı; sonuç larımızla paralel şekilde rozmarinik asit, kersetin, oleuropein ve *trans*-resveratrolün de yapılan ç alışmalarda BACE1'i inhibe ettiğ i bulunmuştur (Cheng, 2018; Choi ve diğ erleri 2011; Omar ve diğ erleri 2018a).

AH'nın patolojik bulgularından biri olarak, beyindeki nörotik plaklarda aş ırı miktarda metal birikimini (demir, bakır, ç inko ve alü minyum vb.) hedef olarak seç ilen fenolik bileş iklerin antioksidan kapasitesini ölç mek amacıyla, tezimiz kapsamında *in vitro* demir iyonu-ş elasyon etki, FRAP ve CUPRAC deneyleri de yapılmıştır. Mladěnka ve diğ erlerinin (2011) 26 adet flavonoit ile yaptığ ı ç alışmada, 24 adet flavonoitin farklı pH koşullarında demiri çeşitli oranlarda ş elatlayabildiğ i ve bu moleküllerde bulunan 6,7-dihidroksi yapısının en etkili demir bağ lama bölgesi olduğ unu bildirmiştir. Ayrıca, örneğ in gallik asit ve EGCG gibi, pirogallol grubu iç eren fenolik bileş iklerin, güçlü demir ş elasyonu gösterdiğ i tespit edilmiştir (Chan ve diğ erleri 2016). Tez ç alışmamızda ise, demir iyonu ş elatör etkisi test edilen fenolik bileş iklerin, referans olarak kullanılan EDTA'dan ($\% 93,35 \pm 0,01$) daha düşük ve $\% 50$ 'nin altında ş elasyon kapasitesine sahip olduğu bulunmakla birlikte; en yüksek ş elasyon kapasitesiye sahip bileş iđ in viteksin ($\% 44,12 \pm 0,09$) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4.). Yapılan ç alışmalar, viteksinin serebral iskemi de dahil olmak üzere oksidatif stresle ilişkili çeşitli hastalıklarda lipit peroksidasyonu, ROS ve diğ er nedenlerle oluşan oksidatif hasarlara karşı güçlü bir antioksidan ajan olarak işlev gördüğ ünü göstermiştir (Babaei ve diğ erleri 2020).

FRAP modelinde ise, taranan 38 adet fenolik bileş ik arasında taksifolin, morin, EGCG, fisetin ve 3-hidroksitirozol referans olarak kullanılan kersetinden de yüksek aktivite göstermiş

olup, bunu rozmarinik asit ve sirinjik asit takip etmiştir (Çizelge 4.5.). Fenolik bileşikler üzerinde daha önce yapılmış FRAP çalışmaları, elde ettiğimiz sonuçlarla uyumlu bulunmuştur (Firuzi ve diğerleri 2005; Skroza ve diğerleri 2022; Soobrattee ve diğerleri 2005).

DPPH radikal süpürücü aktivite deneyinde oleuropein (% 87,05 ± 0,05), referans bileşik olan kersetinden (% 86,20 ± 0,06) daha yüksek aktivite göstermiştir. Bunun yanında, kersetine en yakın ve % 84 üzeri inhibisyon gösteren 6 fenolik bileşik sırasıyla; kemferol, taksifolin, rozmarinik asit, gallik asit, *trans*-resveratrol ve EGCG olmuştur (Çizelge 4.6.).

Alzheimer hastalarının beyinlerindeki nörotik plaklarda biriken bir diğer metal elementi bakırdan yola çıkarak yapılan CUPRAC deneyi sonuçlarımıza göre, referans olarak kullanılan hidroksibenzoik asit türevi gallik asitten daha yüksek etkiye sahip olan bileşikler sırasıyla; çoğunlukla flavonol yapıdaki kersetin, izokersitrin, luteolin, mirisetin, kemferol ve morin olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7.). CUPRAC değerleri bakımından bu bileşikleri, kateşin, hiperozit, rozmarinik asit, fisetin, amentoflavon, klorojenik asit ve kafeik asit takip etmiştir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, Apak ve diğerlerinin (2007) çalışmasıyla uyumlu şekilde, flavonol yapıdaki bileşiklerin CUPRAC deneyinde etkili olduğu yönündedir.

Hücre kültürü yöntemi ile sitotoksitenin değerlendirildiği çalışmalar test edilen bileşikleri karşılaştırmak ve sıralamak için bir ön çalışma verisi sunan faydalı modellerdir. Ancak, bu testler *in vivo* toksisiteyi güvenilir bir şekilde tahmin edememektedir (Hamid ve diğerleri 2004). Tezimizde SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde MTT yöntemi ile sitotoksiteyi değerlendirmek amacıyla doksorubisine karşı test edilen fenolik bileşiklerden rozmarinik asit ile 3-hidroksitirozolün en düşük sitotoksiteyi gösterdiği tespit edilmiştir. Yine aynı hücre hattında, gen ekspresyonu tayininden önce % 8 hücre canlılığının gözlemlendiği (IC₀₈) dozu belirlemek için Alamar Blue yöntemiyle yapılan ön çalışmada, benzer şekilde rozmarinik asit ve 3-hidroksitirozolün en yüksek hücre canlılığını sağladığı belirlenmiştir. Literatürde, MTT ve Alamar Blue yöntemlerinin ilaç tarama çalışmalarında sitotoksik bileşikler tanımlamada yüksek kalitede ve uygun yöntemler olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, Alamar Blue yönteminin MTT'ye göre daha yüksek hassasiyette olduğu ve bu testlerin kullanımında hatalı pozitif veya negatif sonuç elde etmemek için ilaç metabolize

edici enzimlerin inhibisyonu veya indüksiyonlarının da dikkate alınması gerektiği vurgulanmıştır (Hamid ve diğerleri 2004; Page ve diğerleri 1993).

Nörodejeneratif hastalıkların tedavilerinde sıklıkla kullanılan bir model olarak SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinden elde edilen PCR sonuçlarına göre; rozmarinik asit dışında test edilen bileşiklerin nöroprotektif etki açısından olumlu sonuçlar verdiği görülmektedir (Çizelge 4.10. ve 4.11.). Sonuçlara göre, kersetin, oleuropein, EGCG, gallik asit ve 3-hidroksitirozol 14 adet genin gen ekspresyon seviyesinin değişiminde benzer modellere sahiptir. Doğrudan A β ile ilgili gen ifadesi önemli ölçüde değişmemesine rağmen, *MMP9* ile ilgili sinaptik aktivite, bağışıklık ile ilgili *TNF- α* , *CCL5*, *CD33* ve *CR1*'in ifade düzeyleri artmıştır. Ayrıca, *APP* ve *PSEN1* genlerinin fisetin tarafından baskılandığı tespit edilmiştir.

Antiamnezik aktivite tayini için skopolamin ile hafıza kaybı oluşturulan farelerde yapılan pasif kaçınma testinde en etkili fenolik bileşiğin 3-hidroksitirozol olduğu, bunu oleuropein, gallik asit, rozmarinik asitin takip ettiği, EGCG'nin ise referans ilaç galantamin hidrobromüre göre etkisinin daha zayıf olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.12.). Elde edilen *in vivo* sonuçlar, kolinesteraz enzim inhibisyonu sonuçlarıyla tutarlılık göstermiştir. Ayrıca, çalışma sonuçlarımızda galantamine göre pasif kaçınma tesinde farelerin hafızası üzerinde etkin olduğu belirlenen oleuropein, gallik asit ve rozmarinik asit bileşikleriyle pasif kaçınma hafızası üzerine yapılmış birçok çalışma olmasına rağmen, en yüksek antiamnezik aktiviteyi gösteren 3-hidroksitirozol ilk defa tezimiz dahilinde çalışılmıştır (Hasanein ve Mahtaj, 2015; Hasanein ve diğerleri 2017; Khodad ve diğerleri 2016; Nagpal ve diğerleri 2013; Sadate Hosseini ve diğerleri 2019; Salehi ve diğerleri 2019).

Bir diğer *in vivo* deney olan *D. melanogaster* nöroprotektif etki modelinde, AChE ve BChE inhibisyonunda referans ilaç olarak kullanılan galantamin için 20 μ M gibi düşük dozlarda etanolden daha yüksek V_{max} değeri gözlenirken; sinekler 1 mM ve 2 mM gibi daha yüksek konsantrasyonlar ile beslendiğinde, etanole kıyasla etkinliğin olduğu ve etkinin dozla doğru orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir. 10 mM konsantrasyonda ise aktivitenin önemli ölçüde arttığı gözlenmektedir. Test edilen fenolik bileşiklerden kersetin ve gallik asit AChE inhibisyonu için etanole yakın V_{max} değerlerine sahipken, 3-hidroksitirozol dozla ters orantılı şekilde beklenmeyen bir etki göstermiştir. BChE inhibisyonunda ise test edilen tüm fenolik

bileşiklerin etanolden daha yüksek V_{max} değeri gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.). Referans ilaç olarak kullanılan galantaminin farklı dozlarıyla *D. melanogaster*'de yapılan deneylerde, kullanılan doz belli bir eşğin üzerinde tutulduğunda etki ve tutarlılık gözlemlendiği sonucuna varılmıştır. Fenolik bileşikler için de daha yüksek dozlarla çalışmalar yapıldığında, etkinliğin ölçülebileceği ve sonuçlar arasında mukayese yapılabileceği düşünülmektedir.

AH için uygulanan deneysel *in vivo* modellerinden biri de zebra balığı kullanılarak yapılan davranışsal özelliklerin değerlendirildiği modeldir. Model organizma olarak zebra balığı, gelişim ve çoğalma hızlarının diğer *in vivo* modellere göre oldukça hızlı oluşu, birçok hücrel sinyal yolağının insana benzerlik göstermesi ve genetik manipülasyona yatkınlıkları gibi sebeplerle AH için oldukça avantajlı bir model olmuştur (Başak ve diğerleri 2023). Ayrıca, insana ait nörodejeneratif mekanizmaları simüle eden bir model olması dolayısıyla da potansiyel ilaç adaylarının hızlı bir şekilde taranması için kolaylık sağlamaktadır (Shenoy ve diğerleri 2022). Bu sebeple tezimizde uygulanan zebra balığı deney modeli sonuçlarına göre, EGCG ve rozmarinik asit lokomotor aktiviteyi önemli ölçüde etkilemeden YTT'de anksiyolitik özellikler sergilemiş ve kaygı durumunu azaltmıştır. Ayrıca, gallik asit, 3-hidroksitirozol, fisetin ve oleuropein Y-labirent testinde bilişsel performansı iyileştirmiş ve uzamsal bellek üzerinde olumlu etki göstermiştir. Yeniliğe tepki üzerinde ise, rozmarinik asit, oleuropein, 3-hidroksitirozol ve fisetin olumlu sonuçlar vermiştir. Bunun yanında, bilişsel işlevin gelişimi, lokomotor aktivitede önemli bir değişiklik olmaksızın gerçekleşmiştir (Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.). Yine oleuropein ve 3-hidroksitirozolün YNT'de tanıma hafızasını güçlendirdiği belirlenmiştir (Şekil 4.10.). Literatürde seçilen fenolik bileşikler ile zebra balıkları üzerinde oksidatif stresin önlenmesi, nöroproteksiyon, amneziyi önleme ve AH tedavisi üzerine yapılmış çalışmalar olmasına rağmen (Arteaga ve diğerleri 2021; Baldin ve diğerleri 2022; Dong ve diğerleri 2022; Giordo ve diğerleri 2020; Li ve diğerleri 2022; Richetti ve diğerleri 2011; Singh ve diğerleri 2023; Singh ve diğerleri 2022a), kullandığımız YTT, Y-labirent, YNT gibi modeller ile bu etkilerin değerlendirildiği kıyaslamalı çalışma ilk defa tezimizde yapılmıştır.

Tez gereçlerimizi oluşturan fenolik bileşiklerin AH'na karşı potansiyel biyolojik aktivite tahminleri *in silico* yöntemle PASS programında değerlendirilmiş ve olumlu sonuçlar

alınmıştır (Çizelge 4.13.). Bu sonuçlar *in silico* moleküler modelleme çalışmalarından alınan sonuçlarımızla da tutarlılık göstermiştir (Alam ve diğerleri 2018; Madeswaran, 2017). Moleküler kenetlenme deneylerinde, aktif kolinesteraz ve BACE1 inhibitörü olarak tespit edilen fenolik bileşikler, her 3 enzimin aktif bölgesindeki amino asit birimleriyle güçlü etkileşimler yapmıştır (Şekil 4.11., Şekil 4.12. ve Şekil 4.13.).

Test edilen fenolik bileşikler AChE ve BChE enzimlerinin katalitik üçlü cebine ulaşabilmiş ve oksanyon bölgesiyle etkileşmiştir. Diğer yandan bu bileşiklerin BACE1 enziminin katalitik olmayan bölgesini işgal ettikleri tespit edilmiştir. Ayrıca, EGCG ve rozmarinik asit BACE1 enziminde yer alan D228 aminoasiti ile hidrojen bağı oluşturarak etkileşmiştir. Madeswaran'ın (2017) EGCG ile AChE ve BChE üzerinden yaptığı moleküler kenetlenme çalışmasına kıyasla, çalışmamızda kaydedilen değerler (sırasıyla -12,95 ve -13,52 kkal/mol) EGCG'nin kolinesterazlarla daha stabil bir bağlanma gerçekleştirdiğini kanıtlar niteliktedir. Benzer şekilde, AChE, BChE ve BACE1 enzimleri için kersetin ve rozmarinik asitin hesaplanan bağlanma enerjileri önceki çalışmalara nazaran daha anlamlı bulunmuştur (Alam ve diğerleri 2018; Madeswaran, 2017).

Tezimiz kapsamında incelenen fenolik bileşiklerin nöroprotektif etkisine dair kümülatif sonuçlarımız irdelendiğinde, en ümit verici bileşikler olarak rozmarinik asit, gallik asit, 3-hidroksitrozol, oleuropein, EGCG ve kersetin ön plana çıkmaktadır.

Literatür taramamıza göre; rozmarinik asitin AChE ve BChE'ı güçlü şekilde inhibe ettiğine dair çalışmalar mevcuttur (Chao ve diğerleri 2022; Costa ve diğerleri 2014; Gülçin ve diğerleri 2016). Bazı bitkisel fenoliklerin kolinesteraz enzimlerine karşı inhibitör etkilerinin incelendiği Szwajgier'in (2013, 2015) çalışmalarında, en yüksek etkiyi rozmarinik asit göstermiş olup etki sıralaması; rozmarinik asit > kafeik asit > gallik asit = klorojenik asit şeklinde bildirilmiştir. Bu sonucun elde edilmesinde, CH₂-CH₂-COOH veya bir COOH grubundan ziyade, CH=CH-COOH varlığının kolinesteraz inhibisyonu sağlamada daha etkili olduğu vurgulanmıştır (Szwajgier, 2013). Ayrıca, rozmarinik asitteki hidroksil gruplarının BACE1 inhibitör aktivitesini artırdığı bilinmektedir (Paudel ve diğerleri 2020). Yapılan *in vitro* deneylerin yanında, hücre kültürü, *in silico* ve farelerde yapılan *in vivo* deneyler sonucu da rozmarinik asitin nöroprotektif etkileri ortaya konulmuştur (Bhatt ve diğerleri 2015; Coelho

ve diğerleri 2016; De Mello Andrade ve diğerleri 2016; Grigoletto ve diğerleri 2016; Khamse ve diğerleri 2015; Madeswaran, 2017; Shan ve diğerleri 2016; Shang ve diğerleri 2017; Szwajgier ve diğerleri 2017). Ancak, rozmarinik asit için literatürde NF- κ B bağımlı nöroprotektif etki bildirilmiş olmasına rağmen (Hase ve diğerleri 2019; Lee ve diğerleri 2006; Ma ve diğerleri 2020), tez çalışmamızda elde edilen PCR sonuçlarına göre anlamlı bir etki gözlenmemiştir.

“Zeytin (*Olea europaea* L.) polifenolleri” olarak bilinen oleuropein ve 3-hidroksitirozol de tezimiz kapsamında ümit vaat eden fenolik bileşiklerdendir. Oleuropeinin A β peptidine kovalent olmayan bir şekilde bağlanarak polimerizasyonunu ve fibril oluşumunu engellediği bilinmektedir; bu nedenle nöroprotektif etki açısından umut verici bir polifenol olarak kabul edilmektedir (Barbaro ve diğerleri 2014; Bazoti ve diğerleri 2008). Ayrıca, oleuropeinin sıçanlarda toksik agregat kalıntılarını nötralize ettiği, A β toksisitesini geriye çevirdiği, tau birikimini inhibe ettiği ve SH-SY5Y hücre hattında dikkate değer nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir (Daccache ve diğerleri 2011; Luccarini ve diğerleri 2014; Omar ve diğerleri 2018a; Rigacci ve diğerleri 2011). Ayrıca, morfin-nedenli nörotoksositeye karşı oleuropeinin sıçan hipokampusünde oksidatif stres ve apoptozu azalttığı görülmüştür (Shibani ve diğerleri 2019). Yang ve diğerlerinin (2023) yaptığı çalışmada, farelerde AH modeli oluşturulmuş ve oleuropeinden zengin zeytin yaprağı ekstresinin NF- κ B yolağının inhibisyonu yoluyla nöroenflamasyonu azalttığı bildirilmiştir. Diğer yandan, fareler üzerinde yapılan çalışmalarla hidroksitirozolün nöroprotektif etkileri, uzamsal-bilişsel yetenekleri önemli ölçüde artırdığı ve güçlü bir beyin antioksidanı olduğu bazı çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Arunsundar ve diğerleri 2015; González-Correa ve diğerleri 2008; Schaffer ve diğerleri 2007; Tasset ve diğerleri 2011; Zheng ve diğerleri 2015). Bunun yanında, nöroblastoma N2a, PC12 hücreleri, nöroblastoma IMR-32 ve histiyositik lenfoma U937 hücre dizilerinin kullanıldığı hücre kültürü çalışmaları ile de hidroksitirozolün β -amiloit-nedenli toksisite ve oksidatif strese karşı koruyucu etkileri bildirilmiştir (Hashimoto ve diğerleri 2004; St-Laurent-Thibault ve diğerleri 2011; Young ve diğerleri 2008). Ayrıca, bazı çalışmalar oleuropein ve 3-hidroksitirozolün TNF- α , IL-1 β ve nitrik oksit dahil olmak üzere monositik enflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu ve pro-enflamatuvar sitokin üretimini azaltma işlevi gördüğünü (Barbaro ve diğerleri 2014; Giamarellos-Bourboulis ve diğerleri 2006) ve her 2 bileşiğin de antikanser, antimikrobiyal, antiviral ve anti-anjiyogenik etkilerine

ek olarak nöroprotektif etkiye de sahip olabileceğini göstermiştir. Qosa ve diğerleri (2015) ise oleuropeinin APOE'ye bağlı amiloit klerensini artırdığını gözlemlemiş, ancak tezimizde bu bulgulardan farklı olarak, TNF- α ekspresyonu artarken *APOE* ekspresyonunda bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Bunun yanında, sonuçlarımıza göre oleuropeinin ve 3-hidroksitirozolün sinaptik aktivite ve immun yanıtla ilişkili genlerin ekspresyonunda artışa neden olduğu da gözlemlenmiştir. Literatür taramalarımıza göre; hidroksitirozolün *D. melanogaster* ve farelerde pasif kaçınma testi yöntemleri üzerinden nöroprotektif etkileri, ilk defa tezimiz dahilinde çalışılmıştır. Ayrıca, hidroksitirozol ve oleuropein ile zebra balığında mitokondriyal membran işlev bozukluğu ve oksidatif hasardan koruma üzerine yapılmış çalışmalar olsa da (Arteaga ve diğerleri 2021; Dong ve diğerleri 2022), bilişsel süreçlere etkisi yine ilk defa tezimiz kapsamında çalışılmıştır.

Kersetin de çeşitli etki mekanizmaları üzerinden nöroprotektif etkinliği oldukça dikkate değer fenolik bileşiklerden biridir. Literatürde bildirildiğine göre, kersetinin kolinesteraz inhibitör etkisinin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur (Abdel-Diam ve diğerleri 2019; Adedara ve diğerleri 2017; Ademosun ve diğerleri 2016; Khan ve diğerleri 2009; Orhan, 2021). Ayrıca, tezimizde farelerde gerçekleştirilen pasif kaçınma testinin, sıçanlarda yapılmış olan modelinde bildirilen sonuçlara göre; kersetin, donepezil ve bunların kombinasyonları ile Morris su labirenti, pasif kaçınma testi ve yükseltilmiş artı labirenti gibi bilişsel deneysel modellerinde, geçiş süresinin uzamasında önemli bir artışa neden olmuştur (Pattanashetti ve diğerleri 2017). Yine kersetinin farelerde hafıza ve öğrenme, bilişsel performans ve nöroprotektif etkileri üzerine yapılan çalışmalar bildirilmiştir (Li ve diğerleri 2019; Sabogal-Guáqueta ve diğerleri 2015; Singh ve diğerleri 2003; D. M. Wang ve diğerleri 2014). Bunun yanında, antioksidan etkinliğin ölçüldüğü çalışmalarda genellikle referans olarak kullanılan kersetin, birçok çalışmada olduğu gibi tez çalışmamızda da pozitif sonuçlar vermiştir (Firuzi ve diğerleri 2005; Nenadis ve Tsimidou, 2002; Nenadis ve diğerleri 2004; Nile ve diğerleri 2018; Perron ve diğerleri 2010; Skroza ve diğerleri 2015; Soobrattee ve diğerleri 2005; Vishwakarma ve diğerleri 2022). Yine literatürle uyumlu şekilde, kersetinin davranışsal değişiklikler üzerine etkisinin zebra balıklarında YTT ile ölçüldüğü çalışmalara benzer sonuçlar elde edilmiştir (Gupta ve diğerleri 2021; Singh ve diğerleri 2022b). Ayrıca, tezimizde 50 μ M ve 150 μ M dozda kersetin ile beslenen *D. melanogaster* sineklerinde anlamlı bir etki gözlenmese de; Kong ve diğerlerine (2016) göre, 0,44 g/L gibi daha yüksek

doz denendiğinde, sineklerin ömrünün uzadığı tespit edilmiştir. Tezimizde gen ekspresyonu ile elde edilen sonuçlara göre, kersetinin immün yanıtla ilişkili $TNF-\alpha$, *CCL5*, *CR1* ve *CD33* ile sinaptik aktiviteyle ilişkili *MMP9* ekspresyonunu artırdığı, ancak $A\beta$ regülasyonu ile ilişkili *APP*, *PSEN1* ve kolesterol metabolizması ile ilişkili *APOE*, *CLU* ve *ABCA7* ekspresyonlarında önemli bir değişikliğe yol açmadığı da tespit edilmiştir (Carter, 2011; Griciuc ve Tanzi, 2021; Reinhard ve diğerleri 2015).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, gallik asitin güçlü bir AChE inhibitörü olduğu ve gallik asidin 2. ve 4. konumlardaki hidroksil gruplarının siringik asit oluşturmak üzere metilasyonunun ve fenolik asite eklenecek uzun bir yan zincirin inhibisyon gücünü zayıflatacağı bildirilmiştir (Wu ve diğerleri 2022). Ayrıca, gallik asitin AH'na yönelik sıçan modelinde $A\beta$ oligomerizasyonunu inhibe ederek bilişsel işlevi artırdığı görülmüştür (Hajipour ve diğerleri 2016). Yapılan bir çalışmada, tezimizde kullandığımız pasif kaçınma testine benzer bir testle erkek sıçanlarda 10 ve 20 mg/kg dozlarla yapılan tedavide beyindeki oksidasyon durumu ve malondialdehit (MDA) düzeylerinin ölçümü yoluyla hafızanın geliştiği ortaya konulmuştur (Salehi ve diğerleri 2019). Yine 21 gün boyunca 5, 10 ve 20 mg/kg dozlarda erkek BALB/c farelerinde strese bağlı hafıza kaybı üzerinde denenen gallik asitin MDA seviyesinin düşüşü yoluyla nöroprotektif etkili olduğu bildirilmiştir (Salehi ve diğerleri 2018). Bunun yanında gallik asitin, AH transjenik *Drosophila* modelinde gözlenen nörokimyasal değişikliklere karşı koruduğu ispatlanmıştır (Ogunsuyi ve diğerleri 2020). Bir diğer *in vivo* model olan zebra balıklarında bilişsel performans ve uzamsal belleğin değerlendirildiği Y-labirent testinde gallik asit ilk defa tezimizde incelenmiş ve olumlu etki gösterdiği saptanmıştır. Gallik asitin gen ekspresyonu üzerinde etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, allogreft modelinde gallik asit varlığında düzenleyici T hücrelerinin sayısının arttığı ve anti-enflamatuvar etki gözlemlendiği kaydedilmiştir (Elreedy ve diğerleri 2023). Ayrıca sonuçlarımızı destekler şekilde, gallik asit uygulaması sonrasında nekroptoz yoluyla $TNF-\alpha$ ekspresyonu artmaktadır (Chang ve diğerleri 2015). Elde edilen sonuçlarda, doğuştan gelen bağışıklık ve fagositik reseptörlerle ilişkili *CD33* ve *CR1* (Griciuc ve Tanzi, 2021) ekspresyonu ve *MMP9* (Reinhard ve diğerleri 2015) ekspresyonu ile ilişkili sinaptik aktivite gallik asit uygulamasından sonra artmıştır. Ayrıca, *ABCA7* ve *CLU* gibi doğuştan gelen bağışıklıkla ilgili diğer genlerin ekspresyonunda bir artış görülmesi beklenirken bu genlerin ifadesinde önemli bir değişiklik olmamıştır. *APOE*, *PICALM*, *BIN1* ve *CD2AP* (Carter, 2011) gibi genom

çaplı ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) tarafından ortaya konan diğer AH ve lipoprotein ile ilişkili genlerin ifade düzeyinin değişmediği de gözlenmiştir.

Yeşil çayda yüksek miktarda bulunan bir polifenol olan EGCG özellikle nöroprotektif etki açısından tezimizde ön plana çıkan fenolik bileşiklerden biridir. Literatürde bildirildiğine göre, düzenli yeşil çay tüketiminin bilişsel bozukluk riskini azalttığı bilinmektedir (Cascella ve diğerleri 2017; Youn ve diğerleri 2022). Ayrıca, AH ve amiloitle ilişkili patolojilerde nöroprotektif etki gösterdiği, özellikle hayvan ve hüresel modeller üzerinde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Rezai-Zadeh ve diğerleri 2005; Singh ve diğerleri 2018). Bunun yanında, EGCG'nin antioksidatif etki, metal şelasyonu, PKC, PKB/Akt, PI3K ve ERK1/2 yollarının aktivasyonu yoluyla hücre sağkalımına bağlı moleküler yolların desteklenmesi gibi sinerjik etkilerle de nörodejenerasyonu önleyebileceği ortaya konulmuştur (Kim ve Choi, 2015; Koh ve diğerleri 2003; Rai ve diğerleri 2019; Renno ve diğerleri 2017; Sadiq, 2023; Sun ve Alkon, 2014; Valverde-Salazar ve diğerleri 2023; Wang ve diğerleri 2020; Weinreb ve diğerleri 2009). Benzer şekilde, EGCG'nin anti-enflamatuvar ve nöroprotektif özelliklere sahip olduğu ve TNF- α ile indüklenen monosit üretiminin EGCG uygulamasından sonra inhibe edildiği kanıtlanmıştır (Ahn ve diğerleri 2008; Cascella ve diğerleri 2017; Lee ve diğerleri 2004). Bu bulgudan farklı olarak, tezimizde elde ettiğimiz sonuç, EGCG'nin TNF- α ekspresyonunu artırdığı yönündedir. Benzer şekilde, tezimizde çalışılan genlerin çoğunun EGCG tarafından eksprese edildiği, *PSEN1* ve kolesterol metabolizmasıyla ilişkili *ABCA7*, *APOE* ve *CLU* gen ifadelerinde ise değişim olmadığı görülmüştür. Aynı zamanda, EGCG'nin *D. melanogaster* ve HH modeli oluşturulan sıçanlarda motor işlevi doğrudan iyileştirdiği; PH'nın *D. melanogaster* modellerinde bağırsak mikrobiyotasını ve *TotM* ekspresyonunu yeniden şekillendirerek nöronal ve davranışsal kusurları düzelttiği çalışmalarla tespit edilse de (Ehrnhoefer ve diğerleri 2006; Xu ve diğerleri 2020), farelerde yaptığımız pasif kaçınma testinde EGCG için anlamlı sonuç elde edilememiştir. Diğer yandan, EGCG'nin zebra balığı modelinde YTT ile güçlü anksiyolitik özellikler göstererek kaygı durumunu azalttığı elde ettiğimiz bulgular arasındadır. Zebra balıkları üzerinde 2023 yılında EGCG ile yapılan araştırmanın sonuçları da bulgularımızı desteklemektedir (Singh ve diğerleri 2023).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, bitkilerde yaygın olarak bulunan 38 adet fenolik bileşiğin AH'na karşı etkileri *in vitro*, *in vivo*, *in silico* ve hücre kültürü deneysel modellerin yanı sıra AH ile ilişkili genler üzerinde de araştırılmıştır. *In vitro* AChE, BChE ile BACE1 inhibisyonu ve antioksidan aktivite çalışmalarına göre (demir iyonu-şelasyon etki, DPPH radikal süpürücü etki, FRAP ve CUPRAC) rozmarinik asit, gallik asit, kersetin, *trans*-resveratrol, oleuropein, fisetin, EGCG ve 3-hidroksitirozol bileşiklerinin en iyi sonuçları verdiği gözlenmiştir. Daha sonra, *D. melanogaster* sineğinde nöroprotektif etki modeli, farelerde pasif kaçınma ve zebra balığı (*Danio rerio*) davranış modelleri gibi *in vivo* yöntemlerle, *in vitro* deneylerimizde en etkili olduğu tespit edilen bileşiklerden seçilerek test edilmiş ve 3-hidroksitirozol, oleuropein, rozmarinik asit, EGCG ve gallik asitin etkili olduğu tespit edilmiştir.

In vitro ve *in vivo* deney modellerimizde etkili oldukları belirlenen fenolik bileşiklerin AChE, BChE ve BACE1 enzimlerinin aktif bölgeleri ile etkileşimleri moleküler kenetlenme deneyleri ile incelenmiş ve etkileşim mekanizmalarına ait veriler elde edilmiştir. Ayrıca tez gereçlerimizi teşkil eden fenolik bileşiklerin biyolojik aktivite ve advers etki tahminleri de *in silico* olarak değerlendirilmiş ve olası advers etkilerine dair fikir elde edilmiştir. Ayrıca, MTT ve Alamar Blue yöntemleri ile SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattında inhibitör etkili bileşiklerin sitotoksitelerinin değerlendirildiği çalışmalarda, özellikle rozmarinik asit ve 3-hidroksitirozol en düşük sitotoksiteyi göstermiştir. Bunun yanında, AH patolojisinde yer alan düzensiz gen ifadelerinden yola çıkarak seçilen fenolik bileşiklerin bazı ilişkili genlerin ifade düzeylerine etkileri incelenmiştir.

Fenolik bileşiklerin anti-Alzheimer etki açısından rolünün *in vitro*, *in vivo*, *in silico* ve moleküler düzeyde seçilen farklı deney modelleri ile mukayeseli olarak ilk defa araştırıldığı tez çalışmamızda, 3-hidroksitirozol, EGCG, oleuropein, gallik asit, rozmarinik asit ve kersetin potansiyeli en yüksek olan fenolik bileşikler olarak öne çıkmaktadır.

Sonuç olarak; tez kapsamında incelediğimiz 38 adet bitkisel kökenli fenolik bileşiğin nöroprotektif etkinliğine dair *in vitro*, *in vivo*, *in silico* ve hücre kültürü yöntemleri ile ilişkili gen aktiviteleri incelenerek elde ettiğimiz bulgular, literatürde bildirilen bazı sonuçlar ile

uyumlu bulunmuş ve bazıları için ise kullandığımız deney modelleri literatürde ilk defa tezimizde uygulanmıştır. Bulgularımız, bitkisel kökenli fenolik bileşiklerin nöroprotektif etkileri açısından ümit verici moleküller olduğuna ve daha ileri çalışmalar yapılması gerektiğine işaret etmektedir.

KAYNAKLAR

- Abd El-Aziz, N.M., Shehata, M.G., Alsulami, T., Badr, A.N., Elbakatoshy, M.R., Ali, H.S., and El-Sohaimy, S.A. (2022). Characterization of orange peel extract and its potential protective effect against aluminum chloride-induced Alzheimer's disease. *Pharmaceuticals*, 16(1), 12.
- Abdel-Diam, M.M., Samak, D.H., El-Sayed, Y.S., Aleya, L., Alarifi, S., and Alkahtani, S. (2019). Curcumin and quercetin synergistically attenuate subacute diazinon-induced inflammation and oxidative neurohepatic damage, and acetylcholinesterase inhibition in albino rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 3659-3665.
- Adedara, I.A., Ego, V.C., Subair, T.I., Oyediran, O., and Farombi, E.O. (2017). Quercetin improves neurobehavioral performance through restoration of brain antioxidant status and acetylcholinesterase activity in manganese-treated rats. *Neurochemical Research*, 42, 1219-1229.
- 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), NP11-NP17.
- Ado, M.A., Mediani, A., Maulidiani, Ismail, I.S., Ghazali, H.M., and Abas, F. (2019). Flavonoids from *Cynometra cauliflora* and their antioxidant, α -glucosidase, and cholinesterase inhibitory activities. *Chemistry of Natural Compounds*, 55, 112-114.
- Ahn, H.Y., Xu, Y., and Davidge, S.T. (2008). Epigallocatechin-3-O-gallate inhibits TNF α -induced monocyte chemotactic protein-1 production from vascular endothelial cells. *Life Sciences*, 82(17-18), 964-968.
- Aisen, P.S. (2005). The development of anti-amyloid therapy for Alzheimer's disease: from secretase modulators to polymerisation inhibitors. *CNS Drugs*, 19, 989-996.
- Al Jitan, S., Alkhoori, S.A., and Yousef, L.F. (2018). Phenolic acids from plants: extraction and application to human health. *Studies in Natural Products Chemistry*, 58, 389-417.
- Alam, A., Tamkeen, N., Imam, N., Farooqui, A., Ahmed, M.M., Tazyeen, S., Ali, S., Malik, M.Z., and Ishrat, R. (2018). Pharmacokinetic and molecular docking studies of plant-derived natural compounds to exploring potential anti-Alzheimer activity. *In Silico Approach for Sustainable Agriculture*, Singapore: Springer, 217-238.
- Alexander, A.G., Marfil, V., and Li, C. (2014). Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Frontiers in Genetics*, 5, 279.

- Ali-Shtayeh, M.S., Jamous, R.M., Zaitoun, S.Y.A., and Qasem, I.B. (2014). *In-vitro* screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the treatment of Alzheimer's disease. *Functional Foods in Health and Disease*, 4(9), 381-400.
- Alonso, A.d.C., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1994). Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5562-5566.
- Alu'datt, M.H., Rababah, T., Alhamad, M.N., Al-Mahasneh, M.A., Almajwal, A., Gammoh, S., Ereifej, K., Johargy, A., and Alli, I. (2017). A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. *Food Chemistry*, 218, 99-106.
- Anand, P., and Singh, B. (2013). A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacal Research*, 36(4), 375-399.
- Anantharaju, P.G., Gowda, P.C., Vimalambike, M.G., and Madhunapantula, S.V. (2016). An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutrition Journal*, 15(1), 1-16.
- Anderson, K.M., Olson, K.E., Estes, K.A., Flanagan, K., Gendelman, H.E., and Mosley, R.L. (2014). Dual destructive and protective roles of adaptive immunity in neurodegenerative disorders. *Translational Neurodegeneration*, 3, 1-25.
- Anter, J., Tasset, I., Demyda-Peyrás, S., Ranchal, I., Moreno-Millán, M., Romero-Jimenez, M., Muntané, J., de Castro, M.D.L., Muñoz-Serrano, A., and Alonso-Moraga, Á. (2014). Evaluation of potential antigenotoxic, cytotoxic and proapoptotic effects of the olive oil by-product "alperujo", hydroxytyrosol, tyrosol and verbascoside. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 772, 25-33.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I., and Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7), 1496-1547.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., and Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Arteaga, C., Boix, N., Teixido, E., Marizande, F., Cadena, S., and Bustillos, A. (2021). The zebrafish embryo as a model to test protective effects of food antioxidant compounds. *Molecules*, 26(19), 5786.
- Arunsondar, M., Shanmugarajan, T.S., and Ravichandran, V. (2015). 3, 4-dihydroxyphenylethanol attenuates spatio-cognitive deficits in an Alzheimer's disease mouse model: modulation of the molecular signals in neuronal survival-apoptotic programs. *Neurotoxicity Research*, 27(2), 143-155.

- Atamna, H., and Boyle, K. (2006). Amyloid- β peptide binds with heme to form a peroxidase: Relationship to the cytopathologies of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(9), 3381-3386.
- Atay, M. (2014). *İnsan serum bütirilkolinesterazı ve eritrosit asetilkolinesterazının statin türevleri ile etkileşiminin incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Atrahimovich, D., Harris, R., Eitan, R., Cohen, M., and Khatib, S. (2021). Galantamine quantity and alkaloid profile in the bulbs of *Narcissus tazetta* and daffodil cultivars (Amaryllidaceae) Grown in Israel. *Metabolites*, 11(3), 185.
- Babaei, F., Moafizad, A., Darvishvand, Z., Mirzababaei, M., Hosseinzadeh, H., and Nassiri-Asl, M. (2020). Review of the effects of vitexin in oxidative stress-related diseases. *Food Science & Nutrition*, 8(6), 2569-2580.
- Baldin, S.L., de Pieri Pickler, K., de Farias, A.C.S., Bernardo, H.T., Scussel, R., da Costa Pereira, B., Pacheco, S.D., Dondossola, E.R., Machado-de-Ávila, R.A., and Wanderley, A.G. (2022). Gallic acid modulates purine metabolism and oxidative stress induced by ethanol exposure in zebrafish brain. *Purinergic Signalling*, 18(3), 307-315.
- Bao, L.Q., Baecker, D., Mai Dung, D.T., Phuong Nhung, N., Thi Thuan, N., Nguyen, P.L., Phuong Dung, P.T., Huong, T.T.L., Rasulev, B., and Casanola-Martin, G.M. (2023). Development of activity rules and chemical fragment design for *in silico* discovery of AChE and BACE1 dual inhibitors against Alzheimer's disease. *Molecules*, 28(8), 3588.
- Barbaro, B., Toietta, G., Maggio, R., Arciello, M., Tarocchi, M., Galli, A., and Balsano, C. (2014). Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 18508-18524.
- Barros, L., Baptista, P., and Ferreira, I.C. (2007). Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. *Food and Chemical Toxicology*, 45(9), 1731-1737.
- Baruah, J. (2008). Effects of acetylcholinesterase inhibitor therapy for Alzheimer's disease on neuromuscular blockade. *British Journal of Anaesthesia*, 101 (eLetters Supplement), 420.
- Başak, A., Develioğlu, A., Gürel, G., ve Demirel, G.Y. (2023). Alzheimer Hastalığında *in vivo* ve *in vitro* modeller. *Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı Dergisi*, 6(1), 54-77.
- Bauer, J. H., Goupil, S., Garber, G.B., and Helfand, S.L. (2004). An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(35), 12980-12985.
- Baydar, N.G., Özkan, G., and Sağdıç, O. (2004). Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*, 15(5), 335-339.

- Bazoti, F.N., Bergquist, J., Markides, K., and Tzarbopoulos, A. (2008). Localization of the noncovalent binding site between amyloid- β -peptide and oleuropein using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *19*, 1078-1085.
- Bazyar, Y., Rafiei, S., Hosseini, A., and Edalatmanesh, M.A. (2015). Effect of endurance exercise training and gallic acid on tumor necrosis factor- α in an animal model of Alzheimer's disease. *Neuroscience Journal of Shefaye Khatam*, *3*(3), 21-26.
- Beg, T., Jyoti, S., Naz, F., Ali, F., Ali, S.K., Reyad, A.M., and Siddique, Y.H. (2018). Protective effect of kaempferol on the transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*, *17*(6), 421-429.
- Behl, C., and Moosmann, B. (2002). Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radical Biology and Medicine*, *33*(2), 182-191.
- Benzie, I.F., and Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, *239*(1), 70-76.
- Berdowska, I., Zieliński, B., Fecka, I., Kulbacka, J., Saczko, J., and Gamian, A. (2013). Cytotoxic impact of phenolics from Lamiaceae species on human breast cancer cells. *Food Chemistry*, *141*(2), 1313-1321.
- Beyer, K., Lao, J.I., Carrato, C., Rodriguez-Vila, A., Latorre, P., Mataro, M., Llopis, M.A., Mate, J.L., and Ariza, A. (2004). Cystathionine beta synthase as a risk factor for Alzheimer disease. *Current Alzheimer Research*, *1*(2), 127-133.
- Bhatt, P.R., and Benzeroual, K.E. (2013). Neuroprotective effects of fisetin and diosmetin, alone and in combination, on lipopolysaccharide-induced neuronal cells. *The FASEB Journal*, *27*(S1), 14.1-lb895.
- Bhatt, R., Singh, D., Prakash, A., and Mishra, N. (2015). Development, characterization and nasal delivery of rosmarinic acid-loaded solid lipid nanoparticles for the effective management of Huntington's disease. *Drug Delivery*, *22*(7), 931-939.
- Bhattacharjee, A. (2020). *β -Secretase (BACE1) Inhibitors From Natural Products*. In *Phytomedicine and Alzheimer's Disease* (First edition), London: CRC Press, 295-312
- Bickel, U., Thomsen, T., Fischer, J., Weber, W., and Kewitz, H. (1991). Galanthamine: pharmacokinetics, tissue distribution and cholinesterase inhibition in brain of mice. *Neuropharmacology*, *30*(5), 447-454.
- Blennow, K., de Leon, M.J., and Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *The Lancet*, *368*(9533), 387-403.
- Bleve, M., Ciurlia, L., Erroi, E., Lionetto, G., Longo, L., Rescio, L., Schettino, T., and Vasapollo, G. (2008). An innovative method for the purification of anthocyanins

from grape skin extracts by using liquid and sub-critical carbon dioxide. *Separation and Purification Technology*, 64(2), 192-197.

- Boiangiu, R.S., Bagci, E., Dumitru, G., Hritcu, L., and Todirascu-Ciornea, E. (2022). *Angelica purpurascens* (Avé-Lall.) Gilli. Essential oil improved brain function *via* cholinergic modulation and antioxidant effects in the scopolamine-induced zebrafish (*Danio rerio*) model. *Plants*, 11(8), 1096.
- Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 82(4), 239-259.
- Bramblett, G.T., Goedert, M., Jakes, R., Merrick, S.E., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1993). Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron*, 10(6), 1089-1099.
- Brezani, V., Smejkal, K., Hosek, J., and Tomasova, V. (2018). Anti-inflammatory natural prenylated phenolic compounds-potential lead substances. *Current Medicinal Chemistry*, 25(10), 1094-1159.
- Broomfield, C.A., Maxwell, D., Solana, R., Castro, C., Finger, A., and Lenz, D. (1991). Protection by butyrylcholinesterase against organophosphorus poisoning in nonhuman primates. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 259(2), 633-638.
- Brus, B., Kosak, U., Turk, S., Pisljar, A., Coquelle, N., Kos, J., Stojan, J., Colletier, J.P., and Gobec, S. (2014). Discovery, biological evaluation, and crystal structure of a novel nanomolar selective butyrylcholinesterase inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(19), 8167-8179.
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., and Velić, D. (2007). Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 236-242.
- Bullock, R. (2004). Galantamine: use in Alzheimer's disease and related disorders. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 4(2), 153-163.
- Burns, A., and Iliffe, S. (2009). Alzheimer's disease. *British Medical Journal*, 338, b158.
- Bush, A.I. (2013). The metal theory of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 33(s1), S277-S281.
- Cachat, J., Stewart, A., Grossman, L., Gaikwad, S., Kadri, F., Chung, K. M., Wu, N., Wong, K., Roy, S., and Suci, C. (2010). Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nature Protocols*, 5(11), 1786-1799.
- Cano, A., Ettcheto, M., Chang, J.H., Barroso, E., Espina, M., Kühne, B.A., Barenys, M., Auladell, C., Folch, J., and Souto, E.B. (2019). Dual-drug loaded nanoparticles of epigallocatechin-3-gallate (EGCG)/ascorbic acid enhance therapeutic efficacy of

EGCG in a APP^{swe}/PS1^{dE9} Alzheimer's disease mice model. *Journal of Controlled Release*, 301, 62-75.

Cao, Q., Qin, L., Huang, F., Wang, X., Yang, L., Shi, H., Wu, H., Zhang, B., Chen, Z., and Wu, X. (2017). Amentoflavone protects dopaminergic neurons in MPTP-induced Parkinson's disease model mice through PI3K/Akt and ERK signaling pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 319, 80-90.

Capatina, L., Napoli, E.M., Ruberto, G., and Hritcu, L. (2021). *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Lamiaceae) essential oil prevents behavioral and oxidative stress changes in the scopolamine zebrafish model. *Molecules*, 26(23), 7085.

Carter, C. (2011). Alzheimer's disease: *APP*, gamma secretase, *APOE*, *CLU*, *CR1*, *PICALM*, *ABCA7*, *BIN1*, *CD2AP*, *CD33*, *EPHA1*, and *MS4A2*, and their relationships with *Herpes simplex*, *C. pneumoniae*, other suspect pathogens, and the immune system. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011, 1-34.

Cascella, M., Bimonte, S., Muzio, M.R., Schiavone, V., and Cuomo, A. (2017). The efficacy of Epigallocatechin-3-gallate (green tea) in the treatment of Alzheimer's disease: an overview of pre-clinical studies and translational perspectives in clinical practice. *Infectious Agents and Cancer*, 12(1), 1-7.

Castejón, M.L., Rosillo, M.Á., Montoya, T., González-Benjumea, A., Fernández-Bolaños, J. M., and Alarcón-de-la-Lastra, C. (2017). Oleuropein down-regulated IL-1 β -induced inflammation and oxidative stress in human synovial fibroblast cell line SW982. *Food & Function*, 8(5), 1890-1898.

Cha, S.J., Do, H.A., Choi, H.J., Lee, M., and Kim, K. (2019). The *Drosophila* model: exploring novel therapeutic compounds against neurodegenerative diseases. *Antioxidants*, 8(12), 623.

Chan, S., Kantham, S., Rao, V.M., Palanivelu, M.K., Pham, H.L., Shaw, P.N., McGeary, R.P., and Ross, B.P. (2016). Metal chelation, radical scavenging and inhibition of A β ₄₂ fibrillation by food constituents in relation to Alzheimer's disease. *Food Chemistry*, 199, 185-194.

Chang, Y.J., Hsu, S.L., Liu, Y.T., Lin, Y.H., Lin, M.H., Huang, S.J., Ho, J.a.A., and Wu, L.C. (2015). Gallic acid induces necroptosis via *TNF- α* signaling pathway in activated hepatic stellate cells. *PLoS One*, 10(3), e0120713.

Chao, W.W., Chan, W.C., Ma, H.T., and Chou, S.T. (2022). Phenolic acids and flavonoids-rich *Glechoma hederacea* L. (Lamiaceae) water extract against H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells. *Journal of Food Biochemistry*, 46(1), e14032.

Chávez, M.N., Aedo, G., Fierro, F.A., Allende, M.L., and Egaña, J.T. (2016). Zebrafish as an emerging model organism to study angiogenesis in development and regeneration. *Frontiers in Physiology*, 7, 56.

- Chen, S.Y., Zheng, K., and Wang, Z.q. (2016). Neuroprotective effects of ellagic acid on neonatal hypoxic brain injury *via* inhibition of inflammatory mediators and down-regulation of JNK/p38 MAPK activation. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15(2), 241-251.
- Cheng, Y. (2018). *Effects of constituents identified in the adults of Tenebrio molitor on antioxidant and anti-BACE-1 activities*. M.Sc. Thesis, Seoul National University, Korea, 1-207.
- Cheung, J., Rudolph, M.J., Burshteyn, F., Cassidy, M.S., Gary, E.N., Love, J., Franklin, M.C., and Height, J.J. (2012). Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(22), 10282-10286.
- Cheyrier, V., Comte, G., Davies, K.M., Lattanzio, V., and Martens, S. (2013). Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 1-20.
- Choi, J.S., Islam, M.N., Ali, M.Y., Kim, E.J., Kim, Y.M., and Jung, H.A. (2014a). Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin. *Food and Chemical Toxicology*, 64, 27-33.
- Choi, J.S., Islam, M.N., Ali, M.Y., Kim, Y.M., Park, H.J., Sohn, H.S., and Jung, H.A. (2014b). The effects of C-glycosylation of luteolin on its antioxidant, anti-Alzheimer's disease, anti-diabetic, and anti-inflammatory activities. *Archives of Pharmacol Research*, 37, 1354-1363.
- Clark, M., Centner, A.M., Ukhanov, V., Nagpal, R., and Salazar, G. (2022). Gallic acid ameliorates atherosclerosis and vascular senescence and remodels the microbiome in a sex-dependent manner in *ApoE*^{-/-} mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 110, 109132.
- Coelho, V.R., Vieira, C.G., de Souza, L.P., da Silva, L.L., Pflüger, P., Regner, G.G., Papke, D.K.M., Picada, J.N., and Pereira, P. (2016). Behavioral and genotoxic evaluation of rosmarinic and caffeic acid in acute seizure models induced by pentylentetrazole and pilocarpine in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 389(11), 1195-1203.
- Coelho, V.R., Vieira, C.G., de Souza, L.P., Moysés, F., Basso, C., Papke, D.K.M., Pires, T.R., Siqueira, I.R., Picada, J.N., and Pereira, P. (2015). Antiepileptogenic, antioxidant and genotoxic evaluation of rosmarinic acid and its metabolite caffeic acid in mice. *Life Sciences*, 122, 65-71.
- Cong-Cong, X., Bing, W., Yi-Qiong, P., Jian-Sheng, T., and Zhang, T. (2017). Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 15(10), 721-731.
- Conway, M.E. (2020). Alzheimer's disease: targeting the glutamatergic system. *Biogerontology*, 21(3), 257-274.

- Cooper, E.L., and Baculi, B.S. (1968). Degenerative changes in the annelid, *Lumbricus terrestris*. *Journal of Gerontology*, 23(3), 375-381.
- Costa, P., Grevenstuk, T., da Costa, A.M.R., Gonçalves, S., and Romano, A. (2014). Antioxidant and anti-cholinesterase activities of *Lavandula viridis* L'Hér extracts after *in vitro* gastrointestinal digestion. *Industrial Crops and Products*, 55, 83-89.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., and Clifford, M.N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001-1043.
- Çat, M. (2019). *Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılabilecek Yeni Sentezlenmiş Bileşikler ile Asetilkolinesteraz Enziminin İnhibisyonunun İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-101
- Çelik, S.E., Özyürek, M., Güçlü, K., and Apak, R. (2010). Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. *Talanta*, 81(4-5), 1300-1309.
- Daccache, A., Lion, C., Sibille, N., Gerard, M., Slomianny, C., Lippens, G., and Cotelle, P. (2011). Oleuropein and derivatives from olives as tau aggregation inhibitors. *Neurochemistry International*, 58(6), 700-707.
- Dai, J., and Mumper, R.J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- Danysz, W., Parsons, C.G., Möbius, H.J., StÖffler, A., and Quack, G. (2000). Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease-a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. *Neurotoxicity Research*, 2(2-3), 85-97.
- Darvesh, S. (2016). Butyrylcholinesterase as a diagnostic and therapeutic target for Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 13(10), 1173-1177.
- Das, N., Raymick, J., and Sarkar, S. (2021). Role of metals in Alzheimer's disease. *Metabolic Brain Disease*, 36(7), 1627-1639.
- Datla, K.P., Christidou, M., Widmer, W.W., Rooprai, H.K., and Dexter, D.T. (2001). Tissue distribution and neuroprotective effects of *Citrus* flavonoid tangeretin in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroreport*, 12(17), 3871-3875.
- De Bruin, N., and Pouzet, B. (2006). Beneficial effects of galantamine on performance in the object recognition task in Swiss mice: deficits induced by scopolamine and by prolonging the retention interval. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 85(1), 253-260.
- De Mello Andrade, J.M., dos Santos Passos, C., Rubio, M.A.K., Mendonça, J.N., Lopes, N.P., and Henriques, A.T. (2016). Combining *in vitro* and *in silico* approaches to evaluate the multifunctional profile of rosmarinic acid from *Blechnum brasiliense* on targets related to neurodegeneration. *Chemico-Biological Interactions*, 254, 135-145.

- De Souza, P.A.L., Marcadenti, A., and Portal, V.L. (2017). Effects of olive oil phenolic compounds on inflammation in the prevention and treatment of coronary artery disease. *Nutrients*, *9*(10), 1087.
- Del Castillo Frias, M.P. (2017). *Optimisation and use of cell-based assays and in vivo assay for screening drugs for Alzheimer's disease*, PhD thesis, University of Manchester, United Kingdom, 1-199.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P., Tognolini, M., Borges, G., and Crozier, A. (2013). Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, *18*(14), 1818-1892.
- DeToma, A.S., Choi, J.S., Braymer, J.J., and Lim, M.H. (2011). Myricetin: a naturally occurring regulator of metal-induced amyloid- β aggregation and neurotoxicity. *ChemBioChem*, *12*(8), 1198-1201.
- Dias, C.P., De Lima, M.M., Presti-Torres, J., Dornelles, A., Garcia, V., Scalco, F.S., Guimarães, M.R., Constantino, L., Budni, P., and Dal-Pizzol, F. (2007). Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. *Neuroscience*, *146*(4), 1719-1725.
- Dong, Y., Yu, M., Wu, Y., Xia, T., Wang, L., Song, K., Zhang, C., Lu, K., and Rahimnejad, S. (2022). Hydroxytyrosol promotes the mitochondrial function through activating mitophagy. *Antioxidants*, *11*(5), 893.
- Dou, K.X., Tan, M.S., Tan, C.C., Cao, X.P., Hou, X.H., Guo, Q.H., Tan, L., Mok, V., and Yu, J.T. (2018). Comparative safety and effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for Alzheimer's disease: a network meta-analysis of 41 randomized controlled trials. *Alzheimer's Research & Therapy*, *10*(1), 1-10.
- Dugger, B.N., and Dickson, D.W. (2017). Pathology of neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *9*(7).
- Duyckaerts, C., Delatour, B., and Potier, M.C. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathologica*, *118*, 5-36.
- Działo, M., Mierziak, J., Korzun, U., Preisner, M., Szopa, J., and Kulma, A. (2016). The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(2), 160.
- Ehrnhoefer, D.E., Duennwald, M., Markovic, P., Wacker, J.L., Engemann, S., Roark, M., Legleiter, J., Marsh, J. L., Thompson, L.M., and Lindquist, S. (2006). Green tea (-)-epigallocatechin-gallate modulates early events in huntingtin misfolding and reduces toxicity in Huntington's disease models. *Human Molecular Genetics*, *15*(18), 2743-2751.

- Eilenberger, C., Kratz, S.R.A., Rothbauer, M., Ehmoser, E.K., Ertl, P., and Küpcü, S. (2018). Optimized Alamar Blue assay protocol for drug dose-response determination of 3D tumor spheroids. *MethodsX*, 5, 781-787.
- Elfiky, A.M., Mahmoud, A.A., Elreedy, H.A., Ibrahim, K.S., and Ghazy, M.A. (2021). Quercetin stimulates the non-amyloidogenic pathway *via* activation of *ADAM10* and *ADAM17* gene expression in aluminum chloride-induced Alzheimer's disease rat model. *Life Sciences*, 285, 119964.
- Ellman, G., Courtney, K., Andres, V., and Featherstone, R. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry and Pharmacology*, 7, 88–95. In.
- Elreedy, H.A., Elfiky, A.M., Mahmoud, A.A., Ibrahim, K.S., and Ghazy, M.A. (2023). Neuroprotective effect of quercetin through targeting key genes involved in aluminum chloride induced Alzheimer's disease in rats. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 10(1), 174-184.
- Ercan, L., and Doğru, M. (2022). Antioxidant and antimicrobial capacity of quinic acid. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 11(4), 1018-1025.
- Erkekoğlu, P., ve Baydar, T. (2021). Güncel *in vitro* sitotoksisite testleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 41(1), 45-63.
- Everse, J., and Coates, P.W. (2009). Neurodegeneration and peroxidases. *Neurobiology of Aging*, 30(7), 1011-1025.
- Fang, J., Liu, C., Wang, Q., Lin, P., and Cheng, F. (2018). *In silico* polypharmacology of natural products. *Briefings in Bioinformatics*, 19(6), 1153-1171.
- Farber, N.B., Newcomer, J.W., and Olney, J.W. (1998). The glutamate synapse in neuropsychiatric disorders: focus on schizophrenia and Alzheimer's disease. *Progress in Brain Research*, 116, 421-437.
- Farbood, Y., Sarkaki, A., Dolatshahi, M., Mansouri, S.M.T., and Khodadadi, A. (2015). Ellagic acid protects the brain against 6-hydroxydopamine induced neuroinflammation in a rat model of Parkinson's disease. *Basic and Clinical Neuroscience*, 6(2), 83.
- Farrokhnia, M., and Nabipour, I. (2014). Marine natural products as acetylcholinesterase inhibitor: comparative quantum mechanics and molecular docking study. *Current Computer-Aided Drug Design*, 10(1), 83-95.
- Feig, M., Onufriev, A., Lee, M.S., Im, W., Case, D.A., and Brooks III, C.L. (2004). Performance comparison of generalized born and Poisson methods in the calculation of electrostatic solvation energies for protein structures. *Journal of Computational Chemistry*, 25(2), 265-284.

- Feng, J., Zheng, Y., Guo, M., Ares, I., Martínez, M., Lopez-Torres, B., Martínez-Larrañaga, M.R., Wang, X., Anadón, A., and Martínez, M.A. (2023). Oxidative stress, the blood–brain barrier and neurodegenerative diseases: the critical beneficial role of dietary antioxidants. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 13(10), 3988-4024.
- Filimonov, D., Lagunin, A., Glorizova, T., Rudik, A., Druzhilovskii, D., Pogodin, P., and Poroikov, V. (2014). Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 50, 444-457.
- Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., and Saso, L. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1721(1-3), 174-184.
- Fonnum, F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *Journal of Neurochemistry*, 42(1), 1-11.
- 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 & Psychiatry*, 66(2), 137-147.
- Fredj, D., and Francois, D. (1990). Purification of colored substances, especially anthocyanosides, from berries. *Patent No. FR, 2641283*.
- Friesner, R.A., Murphy, R.B., Repasky, M.P., Frye, L.L., Greenwood, J.R., Halgren, T.A., Sanschagrin, P.C., and Mainz, D.T. (2006). Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein–ligand complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(21), 6177-6196.
- Fuccelli, R., Fabiani, R., and Rosignoli, P. (2018). Hydroxytyrosol exerts anti-inflammatory and anti-oxidant activities in a mouse model of systemic inflammation. *Molecules*, 23(12), 3212.
- Fuster-Matanzo, A., Llorens-Martín, M., Hernández, F., and Avila, J. (2013). Role of neuroinflammation in adult neurogenesis and Alzheimer disease: therapeutic approaches. *Mediators of Inflammation*, 2013, 1-9.
- Fys, F., Awantu, F., Dawe, A., Bankeu, K., Shaiq, M., and Lateef, M. (2017). Butyrylcholinesterase inhibitors from two *Ficus* species (Moraceae). *The Journal of Phytopharmacology*, 6(4), 220-226.
- Gallardo-Fernandez, M., Garcia, A.R., Hornedo-Ortega, R., Troncoso, A.M., Garcia-Parrilla, M.C., and Brito, M.A. (2024). *In vitro* study of the blood–brain barrier transport of bioactives from Mediterranean foods. *Food & Function*, 15(7), 3420-3432.
- Ganesh, A. (2023). A combination of epigallocatechin gallate and *Ginkgo biloba* delays the onset of Alzheimer's disease symptoms in a *Drosophila* model. *International Journal of High School Research*, 5(5), 27-33.

- Ghosh, and Osswald. (2014). BACE1 (β -secretase) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Chemical Society Reviews*, 43(19), 6765-6813.
- Ghosh, A.K., Brindisi, M., and Tang, J. (2012). Developing β -secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 120, 71-83.
- Giamarellos-Bourboulis, E.J., Geladopoulos, T., Chrisofos, M., Koutoukas, P., Vassiliadis, J., Alexandrou, I., Tsaganos, T., Sabracos, L., Karagianni, V., and Pelekanou, E. (2006). Oleuropein: a novel immunomodulator conferring prolonged survival in experimental sepsis by: *Pseudomonas aeruginosa*. *Shock*, 26(4), 410-416.
- Ginting, C.N., Lister, I.N.E., Girsang, E., Riastawati, D., Kusuma, H.S.W., and Widowati, W. (2020). Antioxidant activities of *Ficus elastica* leaves ethanol extract and its compounds. *Molecular and Cellular Biomedical Sciences*, 4(1), 27-33.
- Giordo, R., Nasrallah, G.K., Al-Jamal, O., Paliogiannis, P., and Pintus, G. (2020). Resveratrol inhibits oxidative stress and prevents mitochondrial damage induced by zinc oxide nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*). *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 3838.
- Goldman, B.B., and Wipke, W.T. (2000). QSD quadratic shape descriptors. 2. Molecular docking using quadratic shape descriptors (QSDock). *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 38(1), 79-94.
- Gomes, K.K., Macedo, G.E., Rodrigues, N.R., Ziech, C.C., Martins, I.K., Rodrigues, J.F., de Brum Vieira, P., Boligon, A.A., de Brito Junior, F.E., and de Menezes, I.R. (2020). *Croton campestris* A. St.Hill methanolic fraction in a chlorpyrifos-induced toxicity model in *Drosophila melanogaster*: protective role of gallic acid. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1-10.
- Gómez-Ramos, P., and Moran, M. (1997). Ultrastructural localization of butyrylcholinesterase in senile plaques in the brains of aged and Alzheimer disease patients. *Molecular and Chemical Neuropathology*, 30(3), 161-173.
- González-Correa, J.A., Navas, M.D., Lopez-Villodres, J.A., Trujillo, M., Espartero, J.L., and De La Cruz, J.P. (2008). Neuroprotective effect of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Neuroscience Letters*, 446(2-3), 143-146.
- Gouras, G.K., Olsson, T.T., and Hansson, O. (2015). Beta-amyloid peptides and amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 12(1), 3-11.
- Graf, U., Würigler, F., Katz, A., Frei, H., Juon, H., Hall, C., and Kale, P. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, 6(2), 153-188.
- Griciuc, A., and Tanzi, R.E. (2021). The role of innate immune genes in Alzheimer's disease. *Current Opinion in Neurology*, 34(2), 228.

- Grigoletto, J., de Oliveira, C.V., Grauncke, A.C.B., de Souza, T.L., Souto, N.S., de Freitas, M.L., Furian, A.F., Santos, A.R.S., and Oliveira, M.S. (2016). Rosmarinic acid is anticonvulsant against seizures induced by pentylentetrazol and pilocarpine in mice. *Epilepsy & Behavior*, 62, 27-34.
- Gulcan, H., Orhan, I., and Sener, B. (2015). Chemical and molecular aspects on interactions of galanthamine and its derivatives with cholinesterases. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 16(3), 252-258.
- Guo, J., Wang, Z., Liu, R., Huang, Y., Zhang, N., and Zhang, R. (2020). Memantine, donepezil, or combination therapy—what is the best therapy for Alzheimer's disease? A network meta-analysis. *Brain and Behavior*, 10(11), e01831.
- Gupta, A., Kumar, R., Ganguly, R., Singh, A.K., Rana, H.K., and Pandey, A.K. (2021). Antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective activities of *Terminalia bellirica* and its bioactive component ellagic acid against diclofenac induced oxidative stress and hepatotoxicity. *Toxicology Reports*, 8, 44-52.
- Gupta, S.C., Siddique, H.R., Mathur, N., Vishwakarma, A.L., Mishra, R.K., Saxena, D.K., and Chowdhuri, D.K. (2007). Induction of hsp70, alterations in oxidative stress markers and apoptosis against dichlorvos exposure in transgenic *Drosophila melanogaster*: modulation by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770(9), 1382-1394.
- Gustavsson, A., Norton, N., Fast, T., Frölich, L., Georges, J., Holzapfel, D., Kirabali, T., Krolak-Salmon, P., Rossini, P. M., and Ferretti, M. T. (2023). Global estimates on the number of persons across the Alzheimer's disease continuum. *Alzheimer's & Dementia*, 19(2), 658-670.
- Gülçin, İ., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Koksal, Z., Turkan, F., Çetinkaya, S., Bingöl, Z., Huyut, Z., and Alwasel, S.H. (2016). Rosmarinic acid inhibits some metabolic enzymes including glutathione S-transferase, lactoperoxidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(6), 1698-1702.
- Haas, C. (2012). Strategies, development, and pitfalls of therapeutic options for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimers Disease*, 28(2), 241-281.
- Hajjalyani, M., Hosein Farzaei, M., Echeverría, J., Nabavi, S.M., Uriarte, E., and Sobarzo-Sánchez, E. (2019). Hesperidin as a neuroprotective agent: a review of animal and clinical evidence. *Molecules*, 24(3), 648.
- Hajipour, S., Sarkaki, A., Farbood, Y., Eidi, A., Mortazavi, P., and Valizadeh, Z. (2016). Effect of gallic acid on dementia type of Alzheimer disease in rats: electrophysiological and histological studies. *Basic and Clinical Neuroscience*, 7(2), 97.
- Hamaguchi, T., Ono, K., and Yamada, M. (2006). Anti-amyloidogenic therapies: strategies for prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63, 1538-1552.

- Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., and Bullock, P. (2004). Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology In Vitro*, *18*(5), 703-710.
- Hasanein, P., and Mahtaj, A.K. (2015). Ameliorative effect of rosmarinic acid on scopolamine-induced memory impairment in rats. *Neuroscience Letters*, *585*, 23-27.
- Hasanein, P., Seifi, R., Hajinezhad, M.R., and Emamjomeh, A. (2017). Rosmarinic acid protects against chronic ethanol-induced learning and memory deficits in rats. *Nutritional Neuroscience*, *20*(9), 547-554.
- Hase, T., Shishido, S., Yamamoto, S., Yamashita, R., Nukima, H., Taira, S., Toyoda, T., Abe, K., Hamaguchi, T., and Ono, K. (2019). Rosmarinic acid suppresses Alzheimer's disease development by reducing amyloid β aggregation by increasing monoamine secretion. *Scientific Reports*, *9*(1), 1-13.
- Hashimoto, T., Ibi, M., Matsuno, K., Nakashima, S., Tanigawa, T., Yoshikawa, T., and Yabe-Nishimura, C. (2004). An endogenous metabolite of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylethanol, acts as a unique cytoprotective agent against oxidative stress-induced injury. *Free Radical Biology and Medicine*, *36*(5), 555-564.
- Hassanzadeh-Taheri, M., Ahmadi-Zohan, A., Mohammadifard, M., and Hosseini, M. (2021). Rosmarinic acid attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and cognitive impairment in rats. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *117*, 102008.
- He, W.B., Abe, K., and Akaishi, T. (2018). Oral administration of fisetin promotes the induction of hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Journal of Pharmacological Sciences*, *136*(1), 42-45.
- Heinrich, M., and Teoh, H.L. (2004). Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, *92*(2-3), 147-162.
- Heneka, M.T., Golenbock, D.T., and Latz, E. (2015). Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nature Immunology*, *16*(3), 229-236.
- 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.
- Howes, M.J.R., and Houghton, P.J. (2003). Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *75*(3), 513-527.
- Huang, Y., and Mucke, L. (2012). Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*, *148*(6), 1204-1222.

- Hur, J.Y., Soh, Y., Kim, B.H., Suk, K., Sohn, N.W., Kim, H.C., Kwon, H.C., Lee, K.R., and Kim, S.Y. (2001). Neuroprotective and neurotrophic effects of quinic acids from *Aster scaber* in PC12 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24(8), 921-924.
- Ignat, I., Volf, I., and Popa, V.I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821-1835.
- Inoue, T., Saito, S., Tanaka, M., Yamakage, H., Kusakabe, T., Shimatsu, A., Ihara, M., and Satoh-Asahara, N. (2019). Pleiotropic neuroprotective effects of taxifolin in cerebral amyloid angiopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(20), 10031-10038.
- Issac, P.K., Guru, A., Velayutham, M., Pachaiappan, R., Arasu, M.V., Al-Dhabi, N.A., Choi, K.C., Harikrishnan, R., and Arockiaraj, J. (2021). Oxidative stress induced antioxidant and neurotoxicity demonstrated *in vivo* zebrafish embryo or larval model and their normalization due to morin showing therapeutic implications. *Life Sciences*, 283, 119864.
- Jacobo-Velázquez, D.A., and Cisneros-Zevallos, L. (2017). Recent advances in plant phenolics. *Molecules*, 22(8), 1249.
- Jäger, A.K., and Saaby, L. (2011). Flavonoids and the CNS. *Molecules*, 16(2), 1471-1485.
- Jang, M.J. (2015). *Effects of Lotus-derived constituents on learning and memory activity of scopolamine-induced mice*, PhD thesis, Seoul National University, Korea, 1-97.
- Jänicke, B., and Coper, H. (1996). Tests in rodents for assessing sensorimotor performance during aging. *In Advances in Psychology*, 114, 201-233.
- Jiang, W.-., Xu, Y., Zhang, S.-., Zhu, H., and Hou, J. (2012). Tricin 7-glucoside protects against experimental cerebral ischemia by reduction of *NF-κB* and *HMGB1* expression. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(1-2), 50-57.
- Jiménez-Aliaga, K., Bermejo-Bescós, P., Benedí, J., and Martín-Aragón, S. (2011). Quercetin and rutin exhibit antiamyloidogenic and fibril-disaggregating effects *in vitro* and potent antioxidant activity in APP_{swe} cells. *Life Sciences*, 89(25-26), 939-945.
- Jing, P., Zhao, S.J., Jian, W.J., Qian, B.J., Dong, Y., and Pang, J. (2012). Quantitative studies on structure-DPPH• scavenging activity relationships of food phenolic acids. *Molecules*, 17(11), 12910-12924.
- Kalagatur, N.K., Abd_Allah, E.F., Poda, S., Kadirvelu, K., Hashem, A., Mudili, V., and Siddaiah, C. (2021). Quercetin mitigates the deoxynivalenol mycotoxin induced apoptosis in SH-SY5Y cells by modulating the oxidative stress mediators. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 465-477.

- Kamli, M.R., Sharaf, A.A.M., Sabir, J.S., and Rather, I.A. (2022). Phytochemical screening of *Rosmarinus officinalis* L. as a potential anticholinesterase and antioxidant–medicinal plant for cognitive decline disorders. *Plants*, *11*(4), 514.
- Karch, C.M., Cruchaga, C., and Goate, A.M. (2014). Alzheimer’s disease genetics: from the bench to the clinic. *Neuron*, *83*(1), 11-26.
- Keske, E. (2023). *Alzheimer hastalığı tanısında APP ilişkili gen ve miRNA seviyelerinin biyolojik belirteç olarak kullanılmasının SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Haliç Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-55.
- Khadka, B., Lee, J.Y., Park, D.H., Kim, K.T., and Bae, J.S. (2020). The role of natural compounds and their nanocarriers in the treatment of CNS inflammation. *Biomolecules*, *10*(10), 1401.
- Khamchai, S., Chumboatong, W., Hata, J., Tocharus, C., Suksamrarn, A., and Tocharus, J. (2020). Morin protects the blood–brain barrier integrity against cerebral ischemia reperfusion through anti-inflammatory actions in rats. *Scientific Reports*, *10*(1), 13379.
- Khamse, S., Sadr, S.S., Roghani, M., Hasanzadeh, G., and Mohammadian, M. (2015). Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect in the kainate rat model of temporal lobe epilepsy: underlying mechanisms. *Pharmaceutical Biology*, *53*(12), 1818-1825.
- Khan, A., Ikram, M., Hahm, J.R., and Kim, M.O. (2020). Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Citrus* flavonoid hesperetin: special focus on neurological disorders. *Antioxidants*, *9*(7), 609.
- Khan, M.T.H., Orhan, I., Şenol, F., Kartal, M., Şener, B., Dvorská, M., Šmejkal, K., and Šlapetová, T. (2009). Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chemico-Biological Interactions*, *181*(3), 383-389.
- Khatri, D.K., and Juvekar, A.R. (2016). Abrogation of locomotor impairment in a rotenone-induced *Drosophila melanogaster* and zebrafish model of Parkinson's disease by ellagic acid and curcumin. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, *6*(2), 90.
- Khelifi, I., Hayouni, E.A., Cazaux, S., Ksouri, R., and Bouajila, J. (2020). Evaluation of *in vitro* biological activities: antioxidant; anti-inflammatory; anti-cholinesterase; anti-xanthine oxidase, anti-superoxyde dismutase, anti- α -glucosidase and cytotoxic of 19 bioflavonoids. *Cellular and Molecular Biology*, *66*(1), 9-19.
- Khodad, S.P., Jahromi, M.M., Khanpour, Z., and Karami, M. (2016). The effect of oleuropein on passive avoidance memory in colchicine-induced rat model of Alzheimers disease. *Journals of Shahed University*, *23*(124).

- Kim, D.O., and Lee, C.Y. (2004). Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 253-273.
- Kim, D.S., and Lim, S.B. (2020). Semi-continuous subcritical water extraction of flavonoids from *Citrus unshiu* peel: their antioxidant and enzyme inhibitory activities. *Antioxidants*, 9(5), 360.
- Kim, E.K., and Choi, E.J. (2015). Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Archives of Toxicology*, 89, 867-882.
- Kim, M.J., Hwang, E.S., Kim, K.J., Maeng, S., Heo, H.J., Park, J.H., and Kim, D.O. (2021). Anti-amnesic effects of epigallocatechin gallate on scopolamine-induced learning and memory dysfunction in Sprague-Dawley rats. *Antioxidants*, 11(1), 1.
- Kim, Y.A., Kim, G.Y., Park, K.Y., and Choi, Y.H. (2007). Resveratrol inhibits nitric oxide and prostaglandin E₂ production by lipopolysaccharide-activated C6 microglia. *Journal of Medicinal Food*, 10(2), 218-224.
- Kishi, T., Matsunaga, S., Oya, K., Nomura, I., Ikuta, T., and Iwata, N. (2017). Memantine for Alzheimer's disease: an updated systematic review and meta-analysis. *Journal of Alzheimers Disease*, 60(2), 401-425.
- Kitchen, D.B., Decornez, H., Furr, J.R., and Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews-Drug Discovery*, 3(11), 935-949.
- Klafki, H.W., Staufenbiel, M., Kornhuber, J., and Wiltfang, J. (2006). Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Brain*, 129(11), 2840-2855.
- Kocakaya, S.O., Ertas, A., Yener, I., Ercan, B., Oral, E.V., Akdeniz, M., Kaplaner, E., Topcu, G., and Kolak, U. (2020). Selective *in-vitro* enzymes' inhibitory activities of fingerprints compounds of *Salvia* species and molecular docking simulations. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 19(2), 187.
- Koh, S.H., Kim, S.H., Kwon, H., Park, Y., Kim, K.S., Song, C.W., Kim, J., Kim, M.H., Yu, H.J., and Henkel, J.S. (2003). Epigallocatechin gallate protects nerve growth factor differentiated PC12 cells from oxidative-radical-stress-induced apoptosis through its effect on phosphoinositide 3-kinase/Akt and glycogen synthase kinase-3. *Molecular Brain Research*, 118(1-2), 72-81.
- Kong, Y., Li, K., Fu, T., Wan, C., Zhang, D., Song, H., Zhang, Y., Liu, N., Gan, Z., and Yuan, L. (2016). Quercetin ameliorates A β toxicity in *Drosophila* AD model by modulating cell cycle-related protein expression. *Oncotarget*, 7(42), 67716.
- Koul, B., Farooq, U., Yadav, D., and Song, M. (2023). Phytochemicals: a promising alternative for the prevention of Alzheimer's disease. *Life*, 13(4), 999.

- Kuppusamy, A., Arumugam, M., and George, S. (2017). Combining *in silico* and *in vitro* approaches to evaluate the acetylcholinesterase inhibitory profile of some commercially available flavonoids in the management of Alzheimer's disease. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 199-203.
- Lam, K.Y., Ling, A.P.K., Koh, R.Y., Wong, Y.P., and Say, Y.H. (2016). A review on medicinal properties of orientin. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2016, 1-9.
- Lantto, T.A., Dorman, H.D., Shikov, A.N., Pozharitskaya, O.N., Makarov, V.G., Tikhonov, V.P., Hiltunen, R., and Raasmaja, A. (2009). Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of a Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) extract. *Food Chemistry*, 112(4), 936-943.
- Lee, H., Bae, J.H., and Lee, S.R. (2004). Protective effect of green tea polyphenol EGCG against neuronal damage and brain edema after unilateral cerebral ischemia in gerbils. *Journal of Neuroscience Research*, 77(6), 892-900.
- Lee, J., Jung, E., Kim, Y., Lee, J., Park, J., Hong, S., Hyun, C.G., Park, D., and Kim, Y.S. (2006). Rosmarinic acid as a downstream inhibitor of *IKK- β* in *TNF- α* -induced upregulation of CCL11 and CCR3. *British Journal of Pharmacology*, 148(3), 366-375.
- Lee, K.H., Do, H.K., Kim, D.Y., and Kim, W. (2021). Impact of chlorogenic acid on modulation of significant genes in dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 583, 22-28.
- Lee, S., Bang, S.M., Lee, J.W., and Cho, K.S. (2014). Evaluation of traditional medicines for neurodegenerative diseases using *Drosophila* models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1-14.
- Lee, S., Youn, K., Lim, G., Lee, J., and Jun, M. (2018). *In silico* docking and *in vitro* approaches towards BACE1 and cholinesterases inhibitory effect of *Citrus* flavanones. *Molecules*, 23(7), 1509.
- Lee, S.H., ve Min, K.J. (2019). *Drosophila melanogaster* as a model system in the study of pharmacological interventions in aging. *Translational Medicine of Aging*, 3, 98-103.
- Lee, S.M., Yang, E.J., Choi, S.M., Kim, S.H., Baek, M.G., and Jiang, J.H. (2012). Effects of bee venom on glutamate-induced toxicity in neuronal and glial cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1-9.
- Lee, Y.J., Choi, D.Y., Yun, Y.P., Han, S.B., Oh, K.W., and Hong, J.T. (2013). Epigallocatechin-3-gallate prevents systemic inflammation-induced memory deficiency and amyloidogenesis *via* its anti-neuroinflammatory properties. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(1), 298-310.
- Lengauer, T., and Rarey, M. (1996). Computational methods for biomolecular docking. *Current Opinion in Structural Biology*, 6(3), 402-406.

- Leri, M., Bertolini, A., Stefani, M., and Bucciantini, M. (2021). EVOO polyphenols relieve synergistically autophagy dysregulation in a cellular model of Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7225.
- Li, M., Cao, X., Yan, H., Wang, M., Tashibolati, A., and Maiwulanjiang, M. (2022). Integrating zebrafish model to screen active ingredients and network pharmacology methods to explore the mechanism of *Lavandula angustifolia* therapy for Alzheimer's disease. *ChemistrySelect*, 7(28), e202201364.
- Li, Q., Yang, H., Chen, Y., and Sun, H. (2017). Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 132, 294-309.
- Li, Y., Jiao, Q., Xu, H., Du, X., Shi, L., Jia, F., and Jiang, H. (2017). Biometal dyshomeostasis and toxic metal accumulations in the development of Alzheimer's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 339.
- Li, Y., Tian, Q., Li, Z., Dang, M., Lin, Y., and Hou, X. (2019). Activation of Nrf2 signaling by sitagliptin and quercetin combination against β -amyloid induced Alzheimer's disease in rats. *Drug Development Research*, 80(6), 837-845.
- Lima, L., Pereira, S., Junior, R., Santos, F., Nascimento, A., Feitosa, C., Figueredo, J., Cavalcante, A., Araujo, E., and Rai, M. (2018). A brief review on the neuroprotective mechanisms of vitexin. *BioMed Research International*, 2018, 1-8.
- Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., Kong, M., Li, L., Zhang, Q., and Liu, Y. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, 21(10), 1374.
- Lin, Q., Cao, Y., and Gao, J. (2015). Decreased expression of the *APOA1–APOC3–APOA4* gene cluster is associated with risk of Alzheimer's disease. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 5421.
- Lindwall, G., and Cole, R.D. (1984). Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 259(8), 5301-5305.
- 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, Y., and Schubert, D. (1997). Cytotoxic amyloid peptides inhibit cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction by enhancing MTT formazan exocytosis. *Journal of Neurochemistry*, 69(6), 2285-2293.
- Lockridge, O. (2015). Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacology & Therapeutics*, 148, 34-46.

- Luccarini, I., Dami, T.E., Grossi, C., Rigacci, S., Stefani, M., and Casamenti, F. (2014). Oleuropein aglycone counteracts A β ₄₂ toxicity in the rat brain. *Neuroscience Letters*, 558, 67-72.
- Lucon-Xiccato, T., and Dadda, M. (2014). Assessing memory in zebrafish using the one-trial test. *Behavioural Processes*, 106, 1-4.
- Ma, Y., and Huang, H. (2014). Characterisation and comparison of phenols, flavonoids and isoflavones of soymilk and their correlations with antioxidant activity. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(10), 2290-2298.
- Ma, Z., Lu, Y., Yang, F., Li, S., He, X., Gao, Y., Zhang, G., Ren, E., Wang, Y., and Kang, X. (2020). Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect on spinal cord injury by suppressing oxidative stress and inflammation *via* modulating the *Nrf2*/HO-1 and *TLR4*/*NF- κ B* pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 397, 115014.
- Mackay, T.F., Richards, S., Stone, E.A., Barbadilla, A., Ayroles, J.F., Zhu, D., Casillas, S., Han, Y., Magwire, M.M., and Cridland, J.M. (2012). The *Drosophila melanogaster* genetic reference panel. *Nature*, 482(7384), 173-178.
- Madeswaran, A. (2017). *In silico, in vitro and in vivo memory enhancing activity of certain commercially available flavonoids in scopolamine and aluminium-induced learning impairment in mice*, PhD thesis, The Tamil Nadu Dr. M.G.R. Medical University, Chennai, 1-203.
- Maeda, H., and Dudareva, N. (2012). The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 73-105.
- Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1998). Tau in Alzheimer's disease. *Trends in Cell Biology*, 8(11), 425-427.
- Mangialasche, F., Solomon, A., Winblad, B., Mecocci, P., and Kivipelto, M. (2010). Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *The Lancet Neurology*, 9(7), 702-716.
- Marco, L., and Carreiras, M.D.C. (2006). Galanthamine, a natural product for the treatment of Alzheimer's disease. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 1(1), 105-111.
- Marcucci, C., Rademacher, M., Kamecki, F., Pastore, V., Bach, H.G., Ricco, R.A., Wagner, M.L., Knez, D., Gobec, S., and Colettis, N. (2023). Biological evaluation of *Valeriana* extracts from Argentina with potent cholinesterase inhibition for the treatment of neurodegenerative disorders and their comorbidities-The case of *Valeriana carnos*a Sm. (Caprifoliaceae) studied in mice. *Pharmaceuticals*, 16(1), 129.
- Markow, T.A., and O'Grady, P. (2005). *Drosophila: a guide to species identification and use*, Netherlands: Elsevier, 215-225.

- Masson, P., and Lockridge, O. (2010). Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 494(2), 107-120.
- May, Z., Morrill, A., Holcombe, A., Johnston, T., Gallup, J., Fouad, K., Schalomon, M., and Hamilton, T.J. (2016). Object recognition memory in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 296, 199-210.
- McGurk, L., Berson, A., and Bonini, N.M. (2015). *Drosophila* as an *in vivo* model for human neurodegenerative disease. *Genetics*, 201(2), 377-402.
- Mendiola-Precoma, J., Berumen, L., Padilla, K., and Garcia-Alcocer, G. (2016). Therapies for prevention and treatment of Alzheimer's disease. *BioMed Research International*, 2016, 1-17.
- Meng, E.C., Shoichet, B.K., and Kuntz, I.D. (1992). Automated docking with grid-based energy evaluation. *Journal of Computational Chemistry*, 13(4), 505-524.
- Miliauskas, G., van Beek, T.A., Venskutonis, P.R., Linsen, J.P., and de Waard, P. (2004). Antioxidative activity of *Geranium macrorrhizum*. *European Food Research and Technology*, 218, 253-261.
- Mladěnka, P., Macáková, K., Filipický, T., Zatloukalová, L., Jahodář, L., Bovicelli, P., Silvestri, I.P., Hrdina, R., and Saso, L. (2011). *In vitro* analysis of iron chelating activity of flavonoids. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105(5), 693-701.
- Mo, J.J., Li, J.Y., Yang, Z., Liu, Z., ve Feng, J.S. (2017). Efficacy and safety of anti-amyloid- β immunotherapy for Alzheimer's disease: a systematic review and network meta-analysis. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 4(12), 931-942.
- Moghadas, M., Edalatmanesh, M.A., and Robati, R. (2016). Histopathological analysis from gallic acid administration on hippocampal cell density, depression, and anxiety related behaviors in a trimethyltin intoxication model. *Cell Journal (Yakhteh)*, 17(4), 659.
- Moghaddam, A.H., and Zare, M. (2018). Neuroprotective effect of hesperetin and nano-hesperetin on recognition memory impairment and the elevated oxygen stress in rat model of Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 1096-1101.
- Mohs, R.C., Davis, B.M., Johns, C.A., Mathé, A.A., Greenwald, B.S., Horvath, T.B., and Davis, K.L. (1985). Oral physostigmine treatment of patients with Alzheimer's disease. *The American Journal of Psychiatry*, 142(1), 28-33.
- Montemitro, C., Spano, M., Lorusso, M., Baroni, G., and Di Iorio, G. (2017). Efficacy of memantine in schizophrenic patients: a systematic review. *European Psychiatry*, 41(S1), s824-s824.
- Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K., and Olson, A.J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an

empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14), 1639-1662.

- 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.
- Moussa, C.E. (2017). Beta-secretase inhibitors in phase I and phase II clinical trials for Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 26(10), 1131-1136.
- 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.
- Nagpal, I., and Abraham, S.K. (2017). Ameliorative effects of gallic acid, quercetin and limonene on urethane-induced genotoxicity and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 27(4), 286-292.
- Nagpal, K., Singh, S., and Mishra, D. (2013). Nanoparticle mediated brain targeted delivery of gallic acid: *in vivo* behavioral and biochemical studies for protection against scopolamine-induced amnesia. *Drug Delivery*, 20(3-4), 112-119.
- Naguy, A., Husain, K., and Alamiri, B. (2022). Galantamine beyond Alzheimer's disease-A fact or artefact? *CNS Spectrums*, 27(3), 268-271.
- Nahar, L., and Sarker, S.D. (2012). Supercritical fluid extraction in natural products analyses. *Natural Products Isolation*, 864, 43-74.
- Nazir, N., Zahoor, M., Nisar, M., Karim, N., Latif, A., Ahmad, S., and Uddin, Z. (2020). Evaluation of neuroprotective and anti-amnesic effects of *Elaeagnus umbellata* Thunb. On scopolamine-induced memory impairment in mice. *BMC complementary Medicine and Therapies*, 20, 1-17.
- Nenadis, N., and Tsimidou, M. (2002). Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH*) tests. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79, 1191-1195.
- Nenadis, N., Wang, L.F., Tsimidou, M., and Zhang, H.Y. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS** assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4669-4674.
- Newman, M., Ebrahimie, E., and Lardelli, M. (2014). Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. *Frontiers in Genetics*, 5, 189.
- Nile, S.H., Keum, Y.S., Nile, A.S., Jalde, S.S., and Patel, R.V. (2018). Antioxidant, anti-inflammatory, and enzyme inhibitory activity of natural plant flavonoids and their synthesized derivatives. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(1), e22002.

- Niu, H., Álvarez-Álvarez, I., Guillén-Grima, F., and Aguinaga-Ontoso, I. (2017). Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: a meta-analysis. *Neurología (English Edition)*, 32(8), 523-532.
- Nugroho, A., Choi, J.S., Hong, J.P., and Park, H.J. (2017). Anti-acetylcholinesterase activity of the aglycones of phenolic glycosides isolated from *Leonurus japonicus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(10), 849-854.
- Núñez-Sánchez, M.A., González-Sarrías, A., Romo-Vaquero, M., García-Villalba, R., Selma, M.V., Tomás-Barberán, F.A., García-Conesa, M.T., and Espín, J.C. (2015). Dietary phenolics against colorectal cancer—From promising preclinical results to poor translation into clinical trials: pitfalls and future needs. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(7), 1274-1291.
- Obregon, D.F., Rezai-Zadeh, K., Bai, Y., Sun, N., Hou, H., Ehrhart, J., Zeng, J., Mori, T., Arendash, G.W., and Shytle, D. (2006). ADAM10 activation is required for green tea (–)-epigallocatechin-3-gallate-induced α -secretase cleavage of amyloid precursor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 281(24), 16419-16427.
- Ogunsuyi, O.B., Oboh, G., Oluokun, O.O., Ademiluyi, A.O., and Ogunraku, O.O. (2020). Gallic acid protects against neurochemical alterations in transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Advances in Traditional Medicine*, 20, 89-98.
- Ojha, S., Javed, H., Azimullah, S., Khair, S.B.A., and Haque, M.E. (2015). Neuroprotective potential of ferulic acid in the rotenone model of Parkinson's disease. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 5499.
- Okello, E.J., and Mather, J. (2020). Comparative kinetics of acetyl- and butyrylcholinesterase inhibition by green tea catechins - relevance to the symptomatic treatment of Alzheimer's disease. *Nutrients*, 12(4), 1090.
- Olğaç, A., Orhan, I.E., and Banoglu, E. (2017). The potential role of *in silico* approaches to identify novel bioactive molecules from natural resources. *Future Medicinal Chemistry*, 9(14), 1665-1686.
- Omar, S.H., Scott, C.J., Hamlin, A.S., and Obied, H.K. (2018a). Biophenols: enzymes (β -secretase, cholinesterases, histone deacetylase and tyrosinase) inhibitors from olive (*Olea europaea* L.). *Fitoterapia*, 128, 118-129.
- Omar, S.H., Scott, C.J., Hamlin, A.S., and Obied, H.K. (2018b). Olive biophenols reduces alzheimer's pathology in SH-SY5Y cells and APPswe mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1), 125.
- Orhan, I., and Aslan, M. (2009). Appraisal of scopolamine-induced anti-amnesic effect in mice and *in vitro* antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of some traditionally used Lamiaceae plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(2), 327-332.

- Orhan, I., Aslan, S., Kartal, M., Şener, B., and Başer, K.H.C. (2008). Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis* L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. *Food Chemistry*, 108(2), 663-668.
- Orhan, I.E. (2021). Cholinesterase inhibitory potential of quercetin towards Alzheimer's disease-a promising natural molecule or fashion of the day?-A narrowed review. *Current Neuropharmacology*, 19(12), 2205.
- Orrego, F., and Villanueva, S. (1993). The chemical nature of the main central excitatory transmitter: a critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization. *Neuroscience*, 56(3), 539-555.
- Ortega-Arellano, H.F., Jimenez-Del-Rio, M., and Velez-Pardo, C. (2013). Dmp53, basket and drICE gene knockdown and polyphenol gallic acid increase life span and locomotor activity in a *Drosophila* Parkinson's disease model. *Genetics and Molecular Biology*, 36, 608-615.
- Ozben, T., and Ozben, S. (2019). Neuro-inflammation and anti-inflammatory treatment options for Alzheimer's disease. *Clinical Biochemistry*, 72, 87-89.
- Özyürek, M., Bektaşoğlu, B., Güçlü, K., Güngör, N., and Apak, R. (2010). A novel hydrogen peroxide scavenging assay of phenolics and flavonoids using cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(7), 689-698.
- Page, B., Page, M., and Noel, C. (1993). A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements *in-vitro*. *International Journal of Oncology*, 3(3), 473-476.
- Palma, M., and Taylor, L. (1999). Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. *Journal of Chromatography A*, 849(1), 117-124.
- Pan, L.F., Wang, X.B., Xie, S.S., Li, S.Y., and Kong, L.Y. (2014). Multitarget-directed resveratrol derivatives: anti-cholinesterases, anti- β -amyloid aggregation and monoamine oxidase inhibition properties against Alzheimer's disease. *MedChemComm*, 5(5), 609-616.
- Panek, D., Wichur, T., Godyń, J., Pasięka, A., and Malawska, B. (2017). Advances toward multifunctional cholinesterase and β -amyloid aggregation inhibitors. *Future Medicinal Chemistry*, 9(15), 1835-1854.
- Parkinson, L., and Cicerale, S. (2016). The health benefiting mechanisms of virgin olive oil phenolic compounds. *Molecules*, 21(12), 1734.
- Paroni, G., Bisceglia, P., and Seripa, D. (2019). Understanding the amyloid hypothesis in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 68(2), 493-510.
- Parsons, C.G., Stöffler, A., and Danysz, W. (2007). Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the

glutamatergic system-too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology*, 53(6), 699-723.

- Pasban-Aliabadi, H., Esmaeili-Mahani, S., Sheibani, V., Abbasnejad, M., Mehdizadeh, A., and Yaghoobi, M.M. (2013). Inhibition of 6-hydroxydopamine-induced PC12 cell apoptosis by olive (*Olea europaea* L.) leaf extract is performed by its main component oleuropein. *Rejuvenation Research*, 16(2), 134-142.
- Pattanashetti, L.A., Taranalli, A.D., Parvatrao, V., Malabade, R.H., and Kumar, D. (2017). Evaluation of neuroprotective effect of quercetin with donepezil in scopolamine-induced amnesia in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 49(1), 60.
- Paudel, P., Park, C.H., Jung, H.A., Yokozawa, T., and Choi, J.S. (2020). A systematic review on anti-Alzheimer's disease activity of prescription Kangen-karyu. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 14(2), 61-66.
- Peng, Y., Hou, C., Yang, Z., Li, C., Jia, L., Liu, J., Tang, Y., Shi, L., Li, Y., and Long, J. (2016). Hydroxytyrosol mildly improve cognitive function independent of APP processing in APP/PS1 mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(11), 2331-2342.
- Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., and Scalbert, A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(3), S112-S120.
- Perron, N.R., Wang, H.C., DeGuire, S.N., Jenkins, M., Lawson, M., and Brumaghim, J.L. (2010). Kinetics of iron oxidation upon polyphenol binding. *Dalton Transactions*, 39(41), 9982-9987.
- Pinho, B.R., Ferreres, F., Valentão, P., and Andrade, P.B. (2013). Nature as a source of metabolites with cholinesterase-inhibitory activity: an approach to Alzheimer's disease treatment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(12), 1681-1700.
- Pohanka, M. (2011). Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*, 155(3), 219-229.
- Porquet, D., Grinan-Ferre, C., Ferrer, I., Camins, A., Sanfeliu, C., Del Valle, J., and Pallas, M. (2014). Neuroprotective role of *trans*-resveratrol in a murine model of familial Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 42(4), 1209-1220.
- Prajapati, R., Park, S E., Park, H.J., Jung, H.A., and Choi, J.S. (2021). Identification of a potent and selective human monoamine oxidase-A inhibitor, glycitein, an isoflavone isolated from *Pueraria lobata* flowers. *ACS Food Science & Technology*, 1(4), 538-550.
- Prince, M.J., Wimo, A., Guerchet, M.M., Ali, G.C., Wu, Y.T., and Prina, M. (2015). World Alzheimer report 2015-The global impact of dementia: an analysis of prevalence, incidence, cost and trends, ADI, London, 68-79.

- Prvulovic, D., Hampel, H., and Pantel, J. (2010). Galantamine for Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 6(3), 345-354.
- Qiu, C., Kivipelto, M., and Von Strauss, E. (2022). Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 11(2), 111-128.
- Qosa, H., Batarseh, Y.S., Mohyeldin, M.M., El Sayed, K.A., Keller, J.N., and Kaddoumi, A. (2015). Oleocanthal enhances amyloid- β clearance from the brains of TgSwDI mice and *in vitro* across a human blood-brain barrier model. *ACS Chemical Neuroscience*, 6(11), 1849-1859.
- Querfurth, H.W., and LaFerla, F.M. (2010). Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 362(4), 329-344.
- Rai, S.N., Dilnashin, H., Birla, H., Singh, S.S., Zahra, W., Rathore, A.S., Singh, B.K., and Singh, S.P. (2019). The role of PI3K/Akt and ERK in neurodegenerative disorders. *Neurotoxicity Research*, 35, 775-795.
- Rampersad, S.N. (2012). Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*, 12(9), 12347-12360.
- Rani, R., Arora, S., Kaur, J., and Manhas, R.K. (2018). Phenolic compounds as antioxidants and chemopreventive drugs from *Streptomyces cellulosa* strain TES17 isolated from rhizosphere of *Camellia sinensis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 1-15.
- Rasool, M., Malik, A., Qureshi, M.S., Manan, A., Pushparaj, P.N., Asif, M., Qazi, M.H., Qazi, A.M., Kamal, M.A., and Gan, S.H. (2014). Recent updates in the treatment of neurodegenerative disorders using natural compounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 979730.
- Rege, S.D., Geetha, T., Griffin, G.D., Broderick, T.L., and Babu, J.R. (2014). Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, 218.
- Reinhard, S.M., Razak, K., and Ethell, I.M. (2015). A delicate balance: role of MMP-9 in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 280.
- Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., and Möbius, H.J. (2003). Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 348(14), 1333-1341.
- Renno, W.M., Benov, L., and Khan, K.M. (2017). Possible role of antioxidative capacity of (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment in morphological and neurobehavioral recovery after sciatic nerve crush injury. *Journal of Neurosurgery: Spine*, 27(5), 593-613.

- Rezai-Zadeh, K., Shytle, D., Sun, N., Mori, T., Hou, H., Jeanniton, D., Ehrhart, J., Townsend, K., Zeng, J., and Morgan, D. (2005). Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates amyloid precursor protein cleavage and reduces cerebral amyloidosis in Alzheimer transgenic mice. *Journal of Neuroscience*, 25(38), 8807-8814.
- Richetti, S., Blank, M., Capiotti, K., Piato, A., Bogo, M., Vianna, M., and Bonan, C. (2011). Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 217(1), 10-15.
- Rigacci, S., Guidotti, V., Bucciantini, M., Nichino, D., Relini, A., Berti, A., and Stefani, M. (2011). A β (1-42) aggregates into non-toxic amyloid assemblies in the presence of the natural polyphenol oleuropein aglycon. *Current Alzheimer Research*, 8(8), 841-852.
- Roy, M., Chakraborty, S., Siddiqi, M., and Bhattacharya, R.K. (2002). Induction of apoptosis in tumor cells by natural phenolic compounds. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 3(1), 61-67.
- 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.
- Sadate Hosseini, P., Rafieirad, M., and Esmaeili, S. (2019). The effect of oleuropein on working and passive avoidance memory in the pentylenetetrazole-induced seizure animal model. *Journal of Basic Research in Medical Sciences*, 6(1), 41-48.
- Sadiq, I.Z. (2023). Free radicals and oxidative stress: signaling mechanisms, redox basis for human diseases, and cell cycle regulation. *Current Molecular Medicine*, 23(1), 13-35.
- Salehi, A., Rabiei, Z., and Setorki, M. (2018). Effect of gallic acid on chronic restraint stress-induced anxiety and memory loss in male BALB/c mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(12), 1232.
- Salehi, A., Rabiei, Z., and Setorki, M. (2019). Effects of gallic acid and physical exercise on passive avoidance memory in male rat. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, e18261.
- Sánchez-Martínez, J.D., Garcia, A.R., Alvarez-Rivera, G., Valdés, A., Brito, M.A., and Cifuentes, A. (2022). In vitro study of the blood–brain barrier transport of natural compounds recovered from agrifood by-products and microalgae. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 533.
- Sani, G., Serra, G., Kotzalidis, G.D., Romano, S., Tamorri, S.M., Manfredi, G., Caloro, M., Telesforo, C.L., Caltagirone, S.S., and Panaccione, I. (2012). The role of memantine in the treatment of psychiatric disorders other than the dementias: a review of current preclinical and clinical evidence. *CNS Drugs*, 26, 663-690.

- Sarkaki, A., Farbood, Y., Gharib-Naseri, M.K., Badavi, M., Mansouri, M.T., Haghparast, A., and Mirshekar, M.A. (2015). Gallic acid improved behavior, brain electrophysiology, and inflammation in a rat model of traumatic brain injury. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 93(8), 687-694.
- Sartor, L., Pezzato, E., Dell'Aica, I., Caniato, R., Biggin, S., and Garbisa, S. (2002). Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochemical Pharmacology*, 64(2), 229-237.
- Saxena, M., and Dubey, R. (2019). Target enzyme in Alzheimer's disease: acetylcholinesterase inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 19(4), 264-275.
- Sawmiller, D., Li, S., Shahaduzzaman, M., Smith, A.J., Obregon, D., Giunta, B., Borlongan, C.V., Sanberg, P.R., and Tan, J. (2014). Luteolin reduces Alzheimer's disease pathologies induced by traumatic brain injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(1), 895-904.
- Schaffer, S., Podstawa, M., Visioli, F., Bogani, P., Müller, W.E., and Eckert, G.P. (2007). Hydroxytyrosol-rich olive mill wastewater extract protects brain cells *in vitro* and *ex vivo*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5043-5049.
- Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C.E., Cummings, J., and van der Flier, W.M. (2021). Alzheimer's disease. *The Lancet*, 397(10284), 1577-1590.
- Sghaier, M.B., Skandrani, I., Nasr, N., Franca, M.G.D., Chekir-Ghedira, L., and Ghedira, K. (2011). Flavonoids and sesquiterpenes from *Teucrium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure-activity relationship study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32(3), 336-348.
- Shan, Y., Wang, D.D., Xu, Y.X., Wang, C., Cao, L., Liu, Y.S., and Zhu, C.Q. (2016). Aging as a precipitating factor in chronic restraint stress-induced tau aggregation pathology, and the protective effects of rosmarinic acid. *Journal of Alzheimer's Disease*, 49(3), 829-844.
- Shang, A.J., Yang, Y., Wang, H.Y., Tao, B.Z., Wang, J., Wang, Z.F., and Zhou, D.B. (2017). Spinal cord injury effectively ameliorated by neuroprotective effects of rosmarinic acid. *Nutritional Neuroscience*, 20(3), 172-179.
- Sharma, K. (2019). Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics. *Molecular Medicine Reports*, 20(2), 1479-1487.
- Sharma, P., Kumari, S., Sharma, J., Purohit, R., and Singh, D. (2021). Hesperidin interacts with CREB-BDNF signaling pathway to suppress pentylenetetrazole-induced convulsions in zebrafish. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 607797.

- Shenoy, A., Banerjee, M., Upadhya, A., Bagwe-Parab, S., and Kaur, G. (2022). The brilliance of the zebrafish model: perception on behavior and Alzheimer's disease. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *16*, 861155.
- Shibani, F., Sahamsizadeh, A., Fatemi, I., Allahtavakoli, M., Hasanshahi, J., Rahmani, M., Azin, M., Hassanipour, M., Mozafari, N., and Kaeidi, A. (2019). Effect of oleuropein on morphine-induced hippocampus neurotoxicity and memory impairments in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *392*, 1383-1391.
- Shimizu, E., Tang, Y.P., Rampon, C., and Tsien, J.Z. (2000). NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science*, *290*(5494), 1170-1174.
- Siddique, Y.H., Mantasha, I., Shahid, M., Jyoti, S., and Varshney, H. (2023). Effect of Acetylcholinesterase inhibitors on the cognitive impairments in transgenic model of Alzheimer's disease. *The Open Biology Journal*, *11*(1), e187503622305290.
- Siddique, Y.H., Naz, F., and Varshney, H. (2022). Comparative study of rivastigmine and galantamine on the transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, *3*, 100120.
- Singh, A., Bhargav, G.K., Suresh, S., and Vellapandian, C. (2023). Epigallocatechin gallate attenuates neurocognitive impairment in CRISPR-CAS9-induced knockout of *DYRK1A* gene in zebrafish model. *Advances in Traditional Medicine*, *2023*, 1-15.
- Singh, A., Naidu, P.S., and Kulkarni, S.K. (2003). Reversal of aging and chronic ethanol-induced cognitive dysfunction by quercetin a bioflavonoid. *Free Radical Research*, *37*(11), 1245-1252.
- Singh, M.P., Mishra, M., Sharma, A., Shukla, A., Mudiam, M., Patel, D., Ram, K.R., and Chowdhuri, D.K. (2011). Genotoxicity and apoptosis in *Drosophila melanogaster* exposed to benzene, toluene and xylene: attenuation by quercetin and curcumin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *253*(1), 14-30.
- Singh, N.A., Bhardwaj, V., Ravi, C., Ramesh, N., Mandal, A.K.A., and Khan, Z.A. (2018). EGCG nanoparticles attenuate aluminum chloride induced neurobehavioral deficits, beta amyloid and tau pathology in a rat model of Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *10*, 244.
- Singh, R., Zahra, W., Singh, S., Birla, H., Rathore, A., Keshri, P., and Singh, S. (2023). Oleuropein confers neuroprotection against rotenone-induced model of Parkinson's disease via BDNF/CREB/Akt pathway. *Scientific Reports* *13* (1), 2452
- Singh, S.A., Bhargav, G.K., Suresh, S., and Vellapandian, C. (2023). Epigallocatechin gallate attenuates neurocognitive impairment in CRISPR-CAS9-induced knockout of *DYRK1A* gene in zebrafish model. *Advances in Traditional Medicine*, *2023*, 1-15.

- Singh, S.K., Balendra, V., Obaid, A.A., Esposito, J., Tikhonova, M.A., Gautam, N.K., and Poeggeler, B. (2022). Copper-mediated β -amyloid toxicity and its chelation therapy in Alzheimer's disease. *Metallomics*, 14(6), mfac018.
- Sinha, K., Sadhukhan, P., Saha, S., Pal, P.B., and Sil, P.C. (2015). Morin protects gastric mucosa from nonsteroidal anti-inflammatory drug, indomethacin induced inflammatory damage and apoptosis by modulating *NF- κ B* pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850(4), 769-783.
- Sinyor, B., Mineo, J., and Ochner, C. (2020). Alzheimer's disease, inflammation, and the role of antioxidants. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, 4(1), 175-183.
- Skroza, D., Mekinić, I.G., Svilović, S., Šimat, V., and Katalinić, V. (2015). Investigation of the potential synergistic effect of resveratrol with other phenolic compounds: a case of binary phenolic mixtures. *Journal of Food Composition and Analysis*, 38, 13-18.
- Skroza, D., Šimat, V., Vrdoljak, L., Jolić, N., Skelin, A., Čagalj, M., Frleta, R., and Generalić Mekinić, I. (2022). Investigation of antioxidant synergisms and antagonisms among phenolic acids in the model matrices using FRAP and ORAC methods. *Antioxidants*, 11(9), 1784.
- Slot, R.E., Van Harten, A.C., Kester, M.I., Jongbloed, W., Bouwman, F.H., Teunissen, C.E., Scheltens, P., Veerhuis, R., and Van Der Flier, W.M. (2017). Apolipoprotein A1 in cerebrospinal fluid and plasma and progression to Alzheimer's disease in non-demented elderly. *Journal of Alzheimer's Disease*, 56(2), 687-697.
- Smach, M.A., Zarrouk, A., Hafsa, J., Gaffrej, H., Ben Abdallah, J., Charfeddine, B., and Limem, K. (2021). Maillard reaction products and phenolic compounds from roasted peanut flour extracts prevent scopolamine-induced amnesia *via* cholinergic modulation and antioxidative effects in mice. *Journal of Medicinal Food*, 24(6), 645-652.
- Song, L.L., Qu, Y.Q., Tang, Y.P., Chen, X., Lo, H.H., Qu, L.Q., Yun, Y.X., Wong, V.K. W., Zhang, R.L., and Wang, H.M. (2023). Hyperoside alleviates toxicity of β -amyloid *via* endoplasmic reticulum-mitochondrial calcium signal transduction cascade in APP/PS1 double transgenic Alzheimer's disease mice. *Redox Biology*, 61, 102637.
- Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., and Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 579(1-2), 200-213.
- Soto-Mercado, V., Mendivil-Perez, M., Velez-Pardo, C., and Jimenez-Del-Rio, M. (2023). Neuroprotective effect of combined treatment with epigallocatechin 3-gallate and melatonin on familial Alzheimer's disease *PSEN1* E280A cerebral spheroids derived from menstrual mesenchymal stromal cells. *Journal of Alzheimer's Disease*, 99(s1), 51-66.

- Spagnuolo, C., Moccia, S., and Russo, G.L. (2018). Anti-inflammatory effects of flavonoids in neurodegenerative disorders. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 153, 105-115.
- Sramek, J.J., Frackiewicz, E.J., and Cutler, N.R. (2000). Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 9(10), 2393-2402.
- Sroka, Z., Żbikowska, B., and Hładyszowski, J. (2015). The antiradical activity of some selected flavones and flavonols. Experimental and quantum mechanical study. *Journal of Molecular Modeling*, 21, 1-11.
- St-Laurent-Thibault, C., Arseneault, M., Longpre, F., and Ramassamy, C. (2011). Tyrosol and hydroxytyrosol two main components of olive oil, protect N2a cells against amyloid- β -induced toxicity. Involvement of the *NF- κ B* signaling. *Current Alzheimer Research*, 8(5), 543-551.
- Stankevičius, M., Akuņeca, I., Jākobsone, I., and Maruška, A. (2011). Comparative analysis of radical scavenging and antioxidant activity of phenolic compounds present in everyday use spice plants by means of spectrophotometric and chromatographic methods. *Journal of Separation Science*, 34(11), 1261-1267.
- Stefani, M., and Rigacci, S. (2013). Protein folding and aggregation into amyloid: the interference by natural phenolic compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 12411-12457.
- Strober, W. (2015). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, 111(1), A3. B. 1-A3. B. 3.
- Sun, M.K., and Alkon, D.L. (2014). The “memory kinases”: roles of PKC isoforms in signal processing and memory formation. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 122, 31-59.
- Szwajgier, D. (2013). Anticholinesterase activity of phenolic acids and their derivatives. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 68(3-4), 125-132.
- Szwajgier, D. (2015). Anticholinesterase activity of selected phenolic acids and flavonoids-interaction testing in model solutions. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22(4), 690-694.
- Szwajgier, D., Borowiec, K., and Pustelniak, K. (2017). The neuroprotective effects of phenolic acids: molecular mechanism of action. *Nutrients*, 9(5), 477.
- Tamfu, A.N., Kucukaydin, S., Yeskaliyeva, B., Ozturk, M., and Dinica, R.M. (2021). Non-alkaloid cholinesterase inhibitory compounds from natural sources. *Molecules*, 26(18), 5582.
- Tan, F.H.P., Najimudin, N., Watanabe, N., Shamsuddin, S., and Azzam, G. (2023). *p*-coumaric acid attenuates the effects of A β ₄₂ *in vitro* and in a *Drosophila* Alzheimer's disease model. *Behavioural Brain Research*, 452, 114568.

- Tasset, I., Pontes, A., Hinojosa, A., De la Torre, R., and Túnez, I. (2011). Olive oil reduces oxidative damage in a 3-nitropropionic acid-induced Huntington's disease-like rat model. *Nutritional Neuroscience*, *14*(3), 106-111.
- Tell, V., and Hilgeroth, A. (2013). Recent developments of protein kinase inhibitors as potential AD therapeutics. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*, 189.
- Terry, A.V., and Buccafusco, J.J. (2003). The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *306*(3), 821-827.
- Thayumanavan, G., Jeyabalan, S., Fuloria, S., Sekar, M., Ravi, M., Selvaraj, L.K., Bala, L., Chidambaram, K., Gan, S.H., and Rani, N.N.I.M. (2022). Silibinin and naringenin against bisphenol A-induced neurotoxicity in zebrafish model-Potential flavonoid molecules for new drug design, development, and therapy for neurological disorders. *Molecules*, *27*(8), 2572.
- Thomford, N.E., Senthebane, D.A., Rowe, A., Munro, D., Seele, P., Maroyi, A., and Dzobo, K. (2018). Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(6), 1578.
- Valverde-Salazar, V., Ruiz-Gabarre, D., and García-Escudero, V. (2023). Alzheimer's disease and green tea: epigallocatechin-3-gallate as a modulator of inflammation and oxidative stress. *Antioxidants*, *12*(7), 1460.
- Venkatesan, R., Ji, E., and Kim, S.Y. (2015). Phytochemicals that regulate neurodegenerative disease by targeting neurotrophins: a comprehensive review. *BioMed Research International*, *2015*, 1-22.
- Vishwakarma, P., Rai, G., Jain, N., Pandey, V., and Shukla, R. (2022). *Morus alba* (the mulberry fruit): budding and unrecognised potential. *Advance Pharmaceutical Journal*, *7*(3), 73-86.
- Walker, P.R., Smith, B., Liu, Q.Y., Famili, A.F., Valdés, J.J., Liu, Z., and Lach, B. (2004). Data mining of gene expression changes in Alzheimer brain. *Artificial Intelligence in Medicine*, *31*(2), 137-154.
- Wang, C., Ouyang, S., Zhu, X., Jiang, Y., Lu, Z., and Gong, P. (2023). Myricetin suppresses traumatic brain injury-induced inflammatory response *via* EGFR/AKT/STAT pathway. *Scientific Reports*, *13*(1), 22764.
- Wang, D.M., Li, S.Q., Wu, W.L., Zhu, X.Y., Wang, Y., and Yuan, H.Y. (2014). Effects of long-term treatment with quercetin on cognition and mitochondrial function in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurochemical Research*, *39*, 1533-1543.
- Wang, J., Ho, L., Zhao, Z., Seror, I., Humala, N., Dickstein, D. L., Thiyagarajan, M., Percival, S. S., Talcott, S. T., and Maria Pasinetti, G. (2006). Moderate consumption of

Cabernet Sauvignon attenuates A neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*, 20(13), 2313-2320.

Wang, L., Yin, Y.L., Liu, X.Z., Shen, P., Zheng, Y.G., Lan, X.R., Lu, C.B., and Wang, J.Z. (2020). Current understanding of metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Translational Neurodegeneration*, 9(1), 1-13.

Wang, Q., Yu, X., Li, L., and Zheng, J. (2014). Inhibition of amyloid- β aggregation in Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design*, 20(8), 1223-1243.

Wang, Y.H., Gao, X.H., Li, X., Ding, Y.J., Shi, Q., Yang, Z.Y., Peng, D., and Liu, H.R. (2023). Design, synthesis and the evaluation of cholinesterase inhibition and blood-brain permeability of daidzein derivatives or analogs. *Chemical Biology & Drug Design*, 102(49), 718-729.

Wąsik, A., and Antkiewicz-Michaluk, L. (2017). The mechanism of neuroprotective action of natural compounds. *Pharmacological Reports*, 69(5), 851-860.

Wei, B.B., Liu, M.Y., Zhong, X., Yao, W.F., and Wei, M.J. (2019). Increased BBB permeability contributes to EGCG-caused cognitive function improvement in natural aging rats: pharmacokinetic and distribution analyses. *Acta Pharmacologica Sinica*, 40(11), 1490-1500.

Weinreb, O., Amit, T., Mandel, S., and Youdim, M.B. (2009). Neuroprotective molecular mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate: a reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neuritogenic properties. *Genes & Nutrition*, 4(4), 283-296.

Weinreb, O., Mandel, S., Amit, T., and Youdim, M.B. (2004). Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(9), 506-516.

Wong, K.H., Riaz, M.K., Xie, Y., Zhang, X., Liu, Q., Chen, H., Bian, Z., Chen, X., Lu, A., and Yang, Z. (2019). Review of current strategies for delivering Alzheimer's disease drugs across the blood-brain barrier. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 381.

Wu, M., Liu, M., Wang, F., Cai, J., Luo, Q., Li, S., Zhu, J., Tang, Z., Fang, Z., and Wang, C. (2022). The inhibition mechanism of polyphenols from *Phyllanthus emblica* Linn. fruit on acetylcholinesterase: an interaction, kinetic, spectroscopic, and molecular simulation study. *Food Research International*, 158, 111497.

Wu, W., Ji, Y., Wang, Z., Wu, X., Li, J., Gu, F., Chen, Z., and Wang, Z. (2023). The FDA-approved anti-amyloid- β monoclonal antibodies for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *European Journal of Medical Research*, 28(1), 544.

- Xing, S., Li, Q., Xiong, B., Chen, Y., Feng, F., Liu, W., and Sun, H. (2021). Structure and therapeutic uses of butyrylcholinesterase: application in detoxification, Alzheimer's disease, and fat metabolism. *Medicinal Research Reviews*, 41(2), 858-901.
- Xu, Y., Xie, M., Xue, J., Xiang, L., Li, Y., Xiao, J., Xiao, G., and Wang, H.L. (2020). EGCG ameliorates neuronal and behavioral defects by remodeling gut microbiota and TotM expression in *Drosophila* models of Parkinson's disease. *The FASEB Journal*, 34(4), 5931-5950.
- Yamamoto, S., Kayama, T., Noguchi-Shinohara, M., Hamaguchi, T., Yamada, M., Abe, K., and Kobayashi, S. (2021). Rosmarinic acid suppresses tau phosphorylation and cognitive decline by downregulating the JNK signaling pathway. *NPJ Science of Food*, 5(1), 1.
- Yaman, T., and Kuleaşan, Ş. (2016). Uçucu yağ elde etmede gelişmiş ekstraksiyon yöntemleri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(Özel sayı 1), 78-83.
- Yanez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-García, O., Canteras, M., and Teruel, J.A.L. (2004). Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. *Nutrition and Cancer*, 49(2), 191-199.
- Yang, Y., Bai, L., Li, X., Xiong, J., Xu, P., Guo, C., and Xue, M. (2014). Transport of active flavonoids, based on cytotoxicity and lipophilicity: An evaluation using the blood-brain barrier cell and Caco-2 cell models. *Toxicology In Vitro*, 28(3), 388-396.
- Yang, Z., Liu, J., Wei, S., Deng, J., Feng, X., Liu, S., and Liu, M. (2023). A novel strategy for bioactive natural products targeting *NLRP3* inflammasome in Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 1077222.
- Yıldız, M. (2013). *Timol ve karvakrolün Drosophila melanogaster asetilkolinesteraz enzimi üzerine etkilerinin araştırılması*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-57.
- Youn, K., Ho, C.T., and Jun, M. (2022). Multifaceted neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in Alzheimer's disease: an overview of pre-clinical studies focused on β -amyloid peptide. *Food Science and Human Wellness*, 11(3), 483-493.
- Youn, K., Park, J.H., Lee, J., Jeong, W.S., Ho, C.T., and Jun, M. (2016). The identification of biochanin A as a potent and selective β -site app-cleaving enzyme 1 (BACE1) inhibitor. *Nutrients*, 8(10), 637.
- Young, J., Wahle, K.W., and Boyle, S.P. (2008). Cytoprotective effects of phenolic antioxidants and essential fatty acids in human blood monocyte and neuroblastoma cell lines: surrogates for neurological damage *in vivo*. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 78(1), 45-59.

- Yu, M., Chen, X., Liu, J., Ma, Q., Zhuo, Z., Chen, H., Zhou, L., Yang, S., Zheng, L., and Ning, C. (2019). Gallic acid disruption of A β ₁₋₄₂ aggregation rescues cognitive decline of APP/PS1 double transgenic mouse. *Neurobiology of Disease*, 124, 67-80.
- Zahoor, M., Khan, I., Zeb, A., Sahibzada, M.U.K., Naz, S., Bari, W.U., and Kamran, A.W. (2021). Pharmacological evaluation and *in-silico* modeling study of compounds isolated from *Ziziphus oxyphylla*. *Heliyon*, 7(2), e06367.
- Zarotsky, V., Sramek, J. J., and Cutler, N. R. (2003). Galantamine hydrobromide: an agent for Alzheimer's disease. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 60(5), 446-452.
- Zeng, K.W., Wang, X.M., Ko, H., Kwon, H.C., Cha, J.W., and Yang, H.O. (2011). Hyperoside protects primary rat cortical neurons from neurotoxicity induced by amyloid β -protein *via* the PI3K/Akt/Bad/BclXL-regulated mitochondrial apoptotic pathway. *European Journal of Pharmacology*, 672(1-3), 45-55.
- Zhang, X., Hu, J., Zhong, L., Wang, N., Yang, L., Liu, C.C., Li, H., Wang, X., Zhou, Y., and Zhang, Y. (2016). Quercetin stabilizes apolipoprotein E and reduces brain A β levels in amyloid model mice. *Neuropharmacology*, 108, 179-192.
- Zhao, D., Islam, M.N., Ahn, B.R., Jung, H.A., Kim, B.W., and Choi, J.S. (2012). *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of *Angelica decursiva*. *Archives of Pharmacal Research*, 35, 179-192.
- Zheng, A., Li, H., Cao, K., Xu, J., Zou, X., Li, Y., Chen, C., Liu, J., and Feng, Z. (2015). Maternal hydroxytyrosol administration improves neurogenesis and cognitive function in prenatally stressed offspring. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(2), 190-199.
- Zheng, C.D., Li, G., Li, H.Q., Xu, X.J., Gao, J.M., and Zhang, A.L. (2010). DPPH-scavenging activities and structure-activity relationships of phenolic compounds. *Natural Product Communications*, 5(11), 1934578X1000501112.
- Zhou, D., Bai, Z., Guo, T., Li, J., Li, Y., Hou, Y., Chen, G., and Li, N. (2022). Dietary flavonoids and human top-ranked diseases: The perspective of *in vivo* bioactivity and bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*, 120, 374-386.
- Zorić, N., Kopjar, N., Vuković Rodriguez, J., Tomić, S., and Kosalec, I. (2021). Protective effects of olive oil phenolics oleuropein and hydroxytyrosol against hydrogen peroxide-induced DNA damage in human peripheral lymphocytes. *Acta Pharmaceutica*, 71(1), 131-141.
- Zun-Qiu, W., Gui-Zhou, Y., Qing-Ping, Z., You-Jun, J., Kai-Yu, T., Hua-Ping, C., Ze-Shen, Y., and Qian-Ming, H. (2015). Purification, dynamic changes and antioxidant activities of oleuropein in olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Journal of Food Biochemistry*, 39(5), 566-574.

Zwane, R.E., Parker, A., Kudanga, T., Davids, L.M., and Burton, S.G. (2012). Novel, biocatalytically produced hydroxytyrosol dimer protects against ultraviolet-induced cell death in human immortalized keratinocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(46), 11509-11517.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : UÇAR AKYÜREK, Tuğba
Uyruğu : T.C.

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi ABD	
Yüksek lisans	University College London, Pharmacy School	
Lisans	Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	
Lise	Şehitler Fen Lisesi	

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
	Türkiye Milli Botanik Bahçesi Müdürlüğü	Eczacı
	Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Tarla Bitkileri Araştırmaları Daire Başkanlığı/ANKARA	Eczacı
	Memorial Şişli Hastanesi	Eczacı
	BezmiAlem Tıp Fakültesi Hastanesi	Eczacı

Yabancı Dili

İngilizce (YDS: 91,25; IELTS:7,5)

Yayınlar

- Uçar, T. (2016) *Essential Oils for the Inhibition of Acetylcholinesterase: A Critical Appraisal Applying Multiple Regression Analysis and Artificial Intelligence Tools*. Yüksek Lisans Tezi, University College London, İngiltere.
- Uçar, T. Prieto, J.M.A, Heinrich, M. (2017) *Salvia officinalis* L. and its constituents, pharmaceutical forms and therapeutic use in terms of efficacy and safety, International Symposium on Biodiversity and Edible Wild Species, Poster sunumu, Antalya, Türkiye.
- Uçar Akyürek, T., Acar P. (2020) Potential of Turkish *Salix* L. species: bioactivity and phytochemistry-a review, 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020) 19-20 March 2020, Ankara, Türkiye, Proceeding Book, ISBN: 978-605-69426-1-7.
- Uçar Akyürek, T., Erdoğan Orhan, İ. Neuroprotective and Nootropic Effect of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. (Brahmi) through Its In vivo Data Focused on Alzheimer's Disease. *Journal of Gazi University Health Sciences Institute* (2024, Kabul edildi).
- Uçar Akyürek, T., Erdoğan Orhan, İ., Süntar, İ., Şenol Deniz, F.S., Eren, G., Emerce, E. Neuroprotective profiling of thirty-seven plant phenolics *via* cholinesterase inhibition, passive avoidance test, molecular docking simulations, and *in silico* toxicity analysis. *Current Neuropharmacology* (2024, Hakem değerlendirmesinde).
- Uçar Akyürek, T., Karaküçük, M., Emerce, E., Erdoğan Orhan, İ. Antioxidant profiling, *in silico* toxicity, and virtual bioactivity assessment of selected plant-derived phenolics. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* (2024, Hakem değerlendirmesinde).
- Uçar Akyürek, T., Erdoğan Orhan, İ., Şenol Deniz, F.S., Eren, G., Acar, B., Şen, A. Evaluation of selected plant phenolics *via* β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme-1 (BACE1, beta-secretase) inhibition, molecular docking, and gene expression related to Alzheimer's disease. *Journal of Natural Medicines* (2024, Hakem değerlendirmesinde).

Yürütülen projeler

- Çorum İli Boğazkale, Alaca ve Ortaköy İlçelerinde Halk İlacı Araştırması (TAGEM Projesi, Proje Lideri), 2021-devam ediyor
- İç Anadolu'da Yayılış Gösteren Bazı Endemik *Astragalus* L. Türlerinin Çoğaltımı ve Kimyasal İçeriklerinin Belirlenmesi (TAGEM Projesi, Araştırmacı), 2023-devam ediyor, 2023-devam ediyor

Bazı Endemik *Salvia* L. ve *Seseli* L. Taksonlarının Türkiye Milli Botanik Bahçesine Kazandırılması ve Fitokimyasal İçeriklerinin Belirlenmesi (TAGEM Projesi, Araştırmacı), 2022-devam ediyor

Türkiye Angiospermleri Hayat Ağacının (Mega Filogeni) Oluşturulması (TAGEM Projesi, Araştırmacı), 2021-devam ediyor

Türkiye Bitkileri DNA ve Doku Bankasının Oluşturulması (TAGEM Projesi, Araştırmacı), 2021-devam ediyor

Türkiye Milli Botanik Bahçesi, Bitki Genetik Kaynaklarının Yönetimi Projesi (TAGEM Projesi, Araştırmacı), 2020-devam ediyor

Türkiye Söğüt Genetik Kaynaklarının Türkiye Milli Botanik Bahçesinde (TMBB) Muhafazası ve Peyzajı (TAGEM Projesi, Araştırmacı), 2020-devam ediyor

Çalıştay ve Kurs Deneyimi

Kurs, Saki Yenili Deney Hayvanları Laboratuvarı Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Kursu, 2022

Çalıştay, Etnobotanik Araştırma Teknikleri, 2021

Eğitim Toplantısı, 'Etnobotanik Buluşması', Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi, İstanbul/Türkiye, 2019

Çalıştay, 'Parfüm Bitkileri Çalıştayı', Eğirdir, Isparta, 2019

Çalıştay, 'III. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Çalıştayı', Afyonkarahisar, Türkiye, 2018

Sempozyum, 'Uluslararası Tıbbi Aromatik Ve Boya Bitkileri Sempozyumu', Malatya, Türkiye, 2017

Eğitim Toplantısı, 'Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Eğitim Toplantısı', Antalya, Türkiye, 2017

Çalıştay, 'Tıbbi ve Aromatik Bitki Yetiştiriciliği, İşlenmesi ve Pazarlanmasında Karşılaşılabilecek Sorunlar ve Çözüm Yolları', Kızılcahamam, Ankara, 2017

Hobiler

Seyahat etmek, kitap okumak, el sanatları, bisiklet sürmek



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

