



Glaucium grandiflorum Boiss. & A. Huet subsp. *refractum* (Nábělek) Mory
ALKALOİT EKSTRAKTLARININ KALSİYUM HOMEOSTAZI,
MİTOJENLE AKTİFLEŞTİRİLEN PROTEİN KİNAZ VE NÖRAL ÖLÜM
YOLAKLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Serap NİĞDELİOĞLU DOLANBAY

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MAYIS 2023

ETİK BEYAN

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

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Serap NİĞDELİOĞLU DOLANBAY

26/05/2023

Glaucium grandiflorum Boiss. & A. Huet subsp. *refractum* (Nábělek) Mory ALKALOİT
EKSTRAKTLARININ KALSİYUM HOMEOSTAZI, MİTOJENLE AKTİFLEŞTİRİLEN
PROTEİN KİNAZ VE NÖRAL ÖLÜM YOLAKLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI
(Doktora Tezi)

Serap NİĞDELİOĞLU DOLANBAY

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Mayıs 2023

ÖZET

Nörodejeneratif hastalıklar (NH'ler), mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyal yollarının aktivasyonu, hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) homeostazının ve nöral ölüm sinyal yollarının disregülasyonu gibi nöral ölümü indükleyen ortak mekanizmalara sahiptir. NH'lerin tedavisinde kullanılan mevcut ilaçların, yalnızca bir biyobelirteci hedef alması ve istenilen başarının elde edilememesi nedeniyle, günümüzde birden fazla mekanizmayı hedef alan alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine odaklanılmıştır. Bu tez çalışmada, izokinolin alkaloidlerini içeren *Glaucium grandiflorum* alkaloid ekstraktlarının NH'lerin ortak mekanizmaları üzerindeki etkisi araştırılarak, NH'ler için etkin bir ilacın geliştirilmesinde kullanılabilecek çoklu etki mekanizmasına sahip yeni bir ajanın bulunması amaçlanmıştır. *G. grandiflorum*'un kloroform, metanol ve su çözücülerıyla hazırlanan alkaloid ekstraktlarının kalitatif/kantitatif içerik analizi GC-MS ile belirlenmiştir. Alkaloid ekstraktlarının H_2O_2 ile oksidatif strese indüklenen farklılaştırılmış PC12 hücrelerinde, anti-oksidatif ve hücre döngüsü regüle edici etkileri flow sitometri, anti-apoptotik etkileri ise flow sitometri ve qRT-PCR ile belirlenmiştir. Kloroform alkaloid ekstraktı (KAE)'nin hücre içi Ca^{+2} homeostazını regüle edici etkisi flow sitometri, qRT-PCR ve Western blot, MAPK sinyal yollarının aktivasyonunu inhibe edici ve nöral ölüm sinyal yollarını regüle edici etkileri ise Western blot ile belirlenmiştir. Alkaloid ekstraktlarında majör alkaloid %46,4-91,5 allokriptopin olup, en yüksek allokriptopin kloroform çözücüsünün kullanıldığı alkaloid ekstraktında tespit edilmiştir. Çalışmalarda en iyi sonuçların elde edildiği KAE, hücre içi ROS seviyesini (5,7 kat), apoptotik hücreleri (3,0 kat) ve Sub G1 fazındaki hücreleri baskılarken (6,8 kat); G1 fazındaki hücreleri arttırmıştır (1,5 kat). KAE, Bcl-2 mRNA ekspresyon seviyesini artırırken (3,0 kat), Bax ve Kaspaz-9/-3 mRNA ekspresyon seviyelerini azaltmıştır (2,4-3,5 kat). KAE hücre içi Ca^{+2} seviyesini (3,4 kat), $Ca_v1.2$ ve $Ca_v1.3$ 'ü hem gen (2,5 ve 2,4 kat) hem de protein düzeyinde (2,4 ve 1,9 kat) baskılamıştır. KAE, MAPK sinyal yollarının aktivasyonunu inhibe ederken (ERK1/2: 2,4; JNK: 2,7 ve p38: 2,2 kat), nöral ölüm sinyal yollarını (Akt: 4,5 kat artış/GSK-3 β : 3,2 kat artış/Tau: Ser 396; 3,7 ve Thr 212; 2,0 kat baskılama) regüle etmiştir. Bu sonuçlar, allokriptopinin nöral ölümün farklı sinyal yollarında çoklu etki mekanizmalarına sahip olduğunu göstermiştir. Buna göre, allokriptopince zengin KAE ve allokriptopin NH'lerin tedavisinde kullanılan ilaçlara alternatif yeni bir nöroprotektif ve/veya terapötik farmakolojik ajan olma potansiyelini taşıyabilir.

Bilim Kodu : 20309

Anahtar Kelimeler : *Glaucium grandiflorum*, alkaloid ekstraktı, allokriptopin, nörodejeneratif hastalıklar, kalsiyum homeostazı, MAPK sinyal yolları, nöral ölüm yolları

Sayfa Adedi : 235

Danışman : Prof. Dr. Belma ASLIM

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF *Glaucium grandiflorum* Boiss. & A. Huet subsp.
refractum (Nábělek) Mory ALKALOID EXTRACTS ON CALCIUM HOMEOSTASIS,
 MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE AND NEURAL DEATH PATHWAYS
 (Ph. D. Thesis)

Serap NİĞDELİOĞLU DOLANBAY

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

May 2023

ABSTRACT

Neurodegenerative diseases (NDs) have common mechanisms that induce neural death, such as activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways, dysregulation of intracellular calcium (Ca^{+2}) homeostasis and neural death signaling pathways. Since, the current drugs used in the treatment of NDs target only one biomarker and the desired success cannot be achieved, the development of alternative treatment methods targeting more than one mechanism has been focused on. In this thesis, it was aimed to find a new agent with multiple action mechanisms that can be used in the development of an effective drug for NDs by investigating the effect of *Glaucium grandiflorum* alkaloid extracts containing isoquinoline alkaloids on the common mechanisms of NDs. Qualitative/quantitative content analysis of alkaloid extracts of *G. grandiflorum* prepared with chloroform, methanol and water solvents were determined by GC-MS. Anti-oxidative and cell cycle-regulating effects of alkaloid extracts in differentiated PC12 cells induced by oxidative stress with H_2O_2 were determined by flow cytometry, and anti-apoptotic effects were determined by flow cytometry and qRT-PCR. The regulating effect of chloroform alkaloid extract (CAE) on intracellular Ca^{+2} homeostasis was determined by flow cytometry, qRT-PCR and Western blot, and its inhibitory effects on MAPK signaling pathway activation and regulating neural death signaling pathways were determined by Western blot. The major alkaloid was 46.4-91.5% allocryptopine, and the highest allocryptopine was detected in the alkaloid extract using chloroform solvent. CAE, in which the best results were obtained in the studies, suppressed intracellular ROS level (5.7-fold), apoptotic cells (3.0-fold) and cells in Sub G1 phase (6.8-fold); it increased the cells in the G1 phase (1.5-fold). CAE increased the expression level of Bcl-2 mRNA (3.0-fold), while it decreased the expression levels of Bax and Caspase-9/-3 mRNA (2.4-3.5-fold). In addition, CAE suppressed intracellular Ca^{+2} level (3.4-fold), $\text{Ca}_v1.2$ and $\text{Ca}_v1.3$ at both gene (2.5 and 2.4-fold) and protein level (2.4 and 1.9-fold). CAE inhibited the activation of MAPK signaling pathways (ERK1/2: 2.4; JNK: 2.7, and p38: 2.2-fold) and regulated neural death signaling pathways (Akt: 4.5-fold increase/GSK-3 β : 3.2-fold increase/Tau: Ser 396; 3.7 and Thr 212; 2.0-fold suppression). These results demonstrated that allocryptopine has multiple mechanisms of action in different signaling pathways of neural death. Accordingly, allocryptopine-rich CAE and allocryptopine may have the potential to be a new neuroprotective and/or therapeutic pharmacological agent as an alternative to drugs used in the treatment of NDs.

Science Code : 20309

Key Words : *Glaucium grandiflorum*, alkaloid extract, allocryptopine, neurodegenerative diseases, calcium homeostasis, MAPK signaling pathways, neural death pathways

Page Number : 235

Supervisor : Prof. Dr. Belma ASLIM

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım ve doktora eğitimimin her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren, her türlü desteği ve araştırma olanağını sağlayan değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Belma ASLIM'a, çalışmalarımda kullandığım bitki materyalinin temini sağlayan Sayın Prof. Dr. Zeki AYTAÇ'a, tez izleme komitemde yer alan Sayın Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK ve Sayın Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na, tezimin nihai düzeltmelerinde katkılarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. İpek SÜNTAR ve Sayın Doç. Dr. Burak DERKUŞ'a, çalışmalarımı yaptığım Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoteknoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvarları ve ekibine, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Öğrenci İşleri personeli Sayın Doğan KARA'ya, hiçbir zaman yardım ve desteğini esirgemeyen Dr. Seda ŞİRİN'e, sevgisi ve sabrı ile her zaman yanımda olan eşim Fatih DOLANBAY'a, beni bugünlere getiren ve emeklerini asla ödeyemeyeceğim başta babam Zeki NİĞDELİOĞLU olmak üzere tüm aileme ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Bu doktora tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 1001 programı kapsamında 116S299 No'lu proje ve Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından FDK-2021-7249 No'lu proje ile desteklenmiştir. Tez çalışmama maddi katkılarından dolayı TÜBİTAK'a ve Gazi üniversitesi BAP birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	7
2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar.....	7
2.1.1. Alzheimer hastalığı.....	7
2.1.2. Parkinson hastalığı.....	8
2.1.3. Huntington hastalığı	8
2.1.4. Amyotrofik lateral skleroz.....	9
2.2. Nörodejeneratif Hastalıkların İnsidans, Prevalans ve Maliyeti	9
2.3. Nörodejeneratif Hastalıkların Ortak Mekanizmaları	12
2.3.1. Oksidatif stres	12
2.3.2. Mitokondriyal disfonksiyon	15
2.3.3. Hücre içi kalsiyum homeostazının disregülasyonu	17
2.3.4. Mitojenle aktiveleştirilen protein kinaz sinyal yollarının aktivasyonu ...	23
2.3.5. Nöral hücre döngüsünün disregülasyonu	26
2.3.6. Nöral ölüm sinyal yollarının disregülasyonu.....	29
2.3.7. Protein yanlış katlanması ve agregasyonu.....	32
2.3.8. Nöral ölüm.....	36

	Sayfa
2.4. Nörodejeneratif Hastalıkların Tedavisi.....	39
2.4.1. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlar	39
2.4.2. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için güncel yaklaşımlar	42
2.5. Nörodejeneratif Hastalıkların Tedavisinde Nöroprotektif Ajan Olarak Fitokimyasallar	52
2.5.1. Alkaloidler	53
2.6. <i>Glaucium grandiflorum</i> Boiss. & A. Huet subsp. <i>refractum</i> (Nábělek) Mory Bitkisi ve Sekonder Metabolitleri	61
2.6.1. <i>G. grandiflorum</i> 'un nörodejeneratif hastalıklar üzerindeki etkileri	63
3. GEREÇ VE YÖNTEM	65
3.1. Gereç	65
3.1.1. Çalışmada kullanılan bitki	65
3.1.2. Çalışmada kullanılan PC12 hücre hattı	65
3.2. Yöntem.....	66
3.2.1. Alkaloid ekstraktlarının elde edilmesi	66
3.2.2. Alkaloid ekstraktlarının kalitatif ve kantitatif içeriğinin GC-MS ile belirlenmesi	66
3.2.3. PC12 hücrelerinin geliştirilmesi, farklılaştırılması ve stoklanması.....	68
3.2.4. Sitotoksikite testi.....	69
3.2.5. Nörodejeneratif hücre modeli ve uygulama grupları.....	70
3.2.6. Flow sitometre analizleri	71
3.2.7. Gen ekspresyon çalışmaları	75
3.2.8. Western blot hidridizasyon tekniği ile protein ekspresyon çalışmaları	78
3.2.9. İstatistiksel analiz	86
4. DENEYSEL BULGULAR	89
4.1. Alkaloid Ekstraktlarının Elde Edilmesine İlişkin Bulgular	89
4.2. Alkaloid Ekstraktlarının İçerik Analizlerine İlişkin Bulgular	89

Sayfa

4.3. H ₂ O ₂ ve Alkaloit Ekstraktlarının PC12 Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	93
4.4. H ₂ O ₂ ile İndüklenen PC12 Hücrelerinde Alkaloit Ekstraktlarının Hücre Canlılığı Üzerine Koruyucu Etkileri.....	96
4.5. Alkaloit Ekstraktlarının Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri Seviyesi Üzerine Baskılayıcı Etkileri	97
4.6. Alkaloit Ekstraktlarının Nöral Apoptoz Üzerine Baskılayıcı Etkileri	100
4.7. Alkaloit Ekstraktlarının Hücre Döngüsü Disregülasyonu Üzerine Baskılayıcı Etkileri	104
4.8. Alkaloit Ekstraktlarının Nöral Apoptoz Üzerine Gen Ekspresyonu Düzeyinde Baskılayıcı Etkileri	108
4.9. Kloroform Alkaloit Ekstraktının Hücre İçi Kalsiyum Seviyesi Üzerine Baskılayıcı Etkisi	111
4.10. Kloroform Alkaloit Ekstraktının L-tipi Voltaj-Kapılı Kalsiyum Kanalı Alt Tipleri Üzerine Gen Ekspresyonu Düzeyinde Baskılayıcı Etkisi.....	113
4.11. Kloroform Alkaloit Ekstraktının L-tipi Voltaj-Kapılı Kalsiyum Kanalı Alt Tipleri Üzerine Protein Ekspresyonu Düzeyinde Baskılayıcı Etkisi.....	114
4.12. Kloroform Alkaloit Ekstraktının Mitojenle Aktifleştirilen Protein Kinaz Sinyal Yolakları Aktivasyonu Üzerine Protein Ekspresyonu Düzeyinde Baskılayıcı Etkisi	116
4.12.1. Kloroform alkaloit ekstraktının p-ERK1/2 ve t-ERK1/2 protein seviyeleri üzerine etkisi	116
4.12.2. Kloroform alkaloit ekstraktının p-JNK ve t-JNK protein seviyeleri üzerine etkisi	117
4.12.3. Kloroform alkaloit ekstraktının p-p38 ve t-p38 protein seviyeleri üzerine etkisi	118
4.13. Kloroform Alkaloit Ekstraktının Akt/GSK-3 β /Tau Nöral Ölüm Sinyal Yolağı Disregülasyonu Üzerine Protein Ekspresyonu Düzeyinde Baskılayıcı Etkisi	120
4.13.1. H ₂ O ₂ ve kloroform alkaloit ekstraktının p-Akt ve t-Akt protein seviyeleri üzerine etkileri.....	120
4.13.2. Nörodejeneratif hücre modelinde kloroform alkaloit ekstraktının p-Akt ve t-Akt protein seviyeleri üzerine etkisi.....	122
4.13.3. H ₂ O ₂ ve kloroform alkaloit ekstraktının p-GSK-3 β ve t-GSK-3 β protein seviyeleri üzerine etkileri	124

Sayfa

4.13.4. Nörodejeneratif hücre modelinde kloroform alkaloit ekstraktının p-GSK-3 β ve t-GSK-3 β protein seviyeleri üzerine etkisi.....	126
4.13.5. H ₂ O ₂ ve kloroform alkaloit ekstraktının p-Tau ve t-Tau protein seviyeleri üzerine etkileri.....	128
4.13.6. Nörodejeneratif hücre modelinde kloroform alkaloit ekstraktının p-Tau ve t-Tau protein seviyeleri üzerine etkisi	131
5. TARTIŞMA	135
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	169
KAYNAKLAR	179
ÖZGEÇMİŞ	233

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Voltaj-kapılı kalsiyum kanallarının sınıflandırılması.....	20
Çizelge 2.2. Nörodejeneratif hastalıklar ve Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi onaylı ilaçlar.....	41
Çizelge 2.3. Nörodejeneratif hastalıklarda bitki alkaloidlerinin nöroprotektif etkileri ...	55
Çizelge 3.1. Allokriptopin standardının konsantrasyon ve ortalama alan değerleri	67
Çizelge 3.2. qRT-PCR reaksiyon koşulları.....	76
Çizelge 3.3. qRT-PCR’da kullanılan genler, genlere özgü primerler ve baz çifti sayıları	77
Çizelge 3.4. qRT-PCR’da kullanılan genler, genlere özgü primerler ve baz çifti sayıları	78
Çizelge 3.5. Western blot için kullanılan antikorlar, dilüsyon oranları ve molekül ağırlıkları	83
Çizelge 3.6. Western blot için kullanılan antikorlar, dilüsyon oranları ve molekül ağırlıkları	84
Çizelge 3.7. Western blot için kullanılan antikorlar, dilüsyon oranları ve molekül ağırlıkları	86
Çizelge 4.1. WILEY7 kütüphanesi veri tabanına göre kloroform alkaloid ekstraktının bileşen içeriği.....	90
Çizelge 4.2. WILEY7 kütüphanesi veri tabanına göre metanol alkaloid ekstraktının bileşen içeriği.....	91
Çizelge 4.3. WILEY7 kütüphanesi veri tabanına göre su alkaloid ekstraktının bileşen içeriği.....	92
Çizelge 4.4. GC-MS ile belirlenen alkaloid ekstraktlarındaki allokriptopin miktarları ..	93
Çizelge 4.5. Uygulanan kloroform, metanol ve su alkaloid ekstraktı dozlarındaki allokriptopin miktarı	93
Çizelge 4.6. H ₂ O ₂ uygulanmış PC12 hücrelerinin kontrole göre yüzde canlılıkları.....	94
Çizelge 4.7. Farklı konsantrasyon ve sürelerde alkaloid ekstraktları uygulanmış PC12 hücrelerinin kontrole göre yüzde canlılıkları.....	95
Çizelge 4.8. Alkaloid ekstraktları ve H ₂ O ₂ uygulanmış PC12 hücrelerinin kontrole göre yüzde canlılıkları	97

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Reaktif oksijen türleri/reaktif azot türlerinin oksidatif stresin biyobelirteçleri olan biyomoleküller üzerindeki etkisi.....	13
Şekil 2.2. Reaktif oksijen türleri/Reaktif azot türleri oksidatif stresi indükleyerek protein hasarına ve çeşitli nörodejeneratif hastalıklara neden olur	15
Şekil 2.3. Nörodejeneratif hastalıklarda mitokondriyal disfonksiyonun rolü.....	17
Şekil 2.4. Hücre içi kalsiyum homeostazı.....	18
Şekil 2.5. Mitojenle aktifleştirilen protein kinaz sinyal yolları.....	24
Şekil 2.6. Sağlıklı ve dejenere nöronlarda hücre döngüsünün şematik gösterimi	28
Şekil 2.7. Protein kinaz B/Glikojen sentaz kinaz-3 β sinyal yolağı aracılı anormal Tau fosforilasyonu	31
Şekil 2.8. Nörodejeneratif hastalıkların ortak moleküler patogenezi olarak protein yanlış katlanması ve agregasyonu	33
Şekil 2.9. Tau proteininin fizyolojik ve patolojik işlevi	35
Şekil 2.10. Apoptoza yol açan ana moleküler yolların şematik gösterimi.....	38
Şekil 3.1. Allokriptopin standart ölçü eğrisi ve regresyon denklemi.....	68
Şekil 3.2. Standart allokriptopine ait kromatogram.	68
Şekil 3.3. Hedef genler ve referans genin erime eğrileri. A: CACNA1C, B: CACNA1D, C: GAPDH; <i>Rattus norvegicus</i>	78
Şekil 3.4. BSA proteini standart eğrisi ve regresyon denklemi.	79
Şekil 4.1. Kloroform alkaloit ekstraktının kromatogramı.....	90
Şekil 4.2. Metanol alkaloit ekstraktının kromatogramı.	91
Şekil 4.3. Su alkaloit ekstraktının kromatogramı.	92
Şekil 4.4. H ₂ O ₂ ile indüklenen hücre içi ROS seviyesi üzerine kloroform alkaloit ekstraktının nöroprotektif etkisinin flow sitometri analizi ile belirlenmesi ...	98
Şekil 4.5. H ₂ O ₂ ile indüklenen hücre içi ROS seviyesi üzerine metanol alkaloit ekstraktının nöroprotektif etkisinin flow sitometri analizi ile belirlenmesi ...	99
Şekil 4.6. H ₂ O ₂ ile indüklenen hücre içi ROS seviyesi üzerine su alkaloit ekstraktının nöroprotektif etkisinin flow sitometri analizi ile belirlenmesi ...	100

Şekil	Sayfa
Şekil 4.7. H ₂ O ₂ ile indüklenen nöral apoptoz üzerine kloroform alkaloit ekstraktının nöroprotektif etkisinin flow sitometri analizi ile belirlenmesi	102
Şekil 4.8. H ₂ O ₂ ile indüklenen nöral apoptoz üzerine metanol alkaloit ekstraktının nöroprotektif etkisinin flow sitometri analizi ile belirlenmesi	103
Şekil 4.9. H ₂ O ₂ ile indüklenen nöral apoptoz üzerine su alkaloit ekstraktının nöroprotektif etkisinin flow sitometri analizi ile belirlenmesi	104
Şekil 4.10. H ₂ O ₂ ile nöral apoptoza indüklenen fPC12 hücrelerinin hücre döngüsüne kloroform alkaloit ekstraktının etkisinin oransal değişim sonuçlarının flow sitometri analizi ile belirlenmesi	106
Şekil 4.11. H ₂ O ₂ ile nöral apoptoza indüklenen fPC12 hücrelerinin hücre döngüsüne metanol alkaloit ekstraktının etkisinin oransal değişim sonuçlarının flow sitometri analizi ile belirlenmesi	107
Şekil 4.12. H ₂ O ₂ ile nöral apoptoza indüklenen fPC12 hücrelerinin hücre döngüsüne su alkaloit ekstraktının etkisinin oransal değişim sonuçlarının flow sitometri analizi ile belirlenmesi	108
Şekil 4.13. H ₂ O ₂ ile nöral apoptoza indüklenen fPC12 hücrelerinde kloroform alkaloit ekstraktının Bax (A), Bcl-2 (B), Kaspaz-9 (C) ve Kaspaz-3 (D) geninin ifade düzeylerine etkisi.....	110
Şekil 4.14. H ₂ O ₂ ile nöral apoptoza indüklenen fPC12 hücrelerinde metanol alkaloit ekstraktının Bax (A), Bcl-2 (B), Kaspaz-9 (C) ve Kaspaz-3 (D) geninin ifade düzeylerine etkisi.....	110
Şekil 4.15. H ₂ O ₂ ile nöral apoptoza indüklenen fPC12 hücrelerinde su alkaloit ekstraktının Bax (A), Bcl-2 (B), Kaspaz-9 (C) ve Kaspaz-3 (D) geninin ifade düzeylerine etkisi.....	111
Şekil 4.16. H ₂ O ₂ ile indüklenen hücre içi Ca ⁺² seviyesi üzerine kloroform alkalot ekstraktının baskılayıcı etkisinin flow sitometri analizi ile belirlenmesi	113
Şekil 4.17. H ₂ O ₂ ile L-tipi VGCC alt tiplerinin aktive edildiği fPC12 hücrelerinde kloroform alkaloit ekstraktının Ca _v 1.2 (A) ve Ca _v 1.3 (B) geninin ifade düzeylerine etkisi.....	114
Şekil 4.18. H ₂ O ₂ ile L-tipi VGCC alt tiplerinin aktive edildiği fPC12 hücrelerinde kloroform alkaloit ekstraktının Ca _v 1.2 (A ve B) ve Ca _v 1.3 (C ve D) proteininin ifade düzeylerine etkisi	115
Şekil 4.19. H ₂ O ₂ ile indüklenen p-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204) protein seviyesi üzerine kloroform alkaloit ekstraktının baskılayıcı etkisinin Western blot analizi ile belirlenmesi	117

Şekil	Sayfa
Şekil 4.20. H ₂ O ₂ ile indüklenen p-JNK (Thr 183/Tyr 185) protein seviyesi üzerine kloroform alkaloit ekstraktının baskılayıcı etkisinin Western blot analizi ile belirlenmesi	118
Şekil 4.21. H ₂ O ₂ ile indüklenen p-p38 (Thr 180/Tyr 182) protein seviyesi üzerine kloroform alkaloit ekstraktının baskılayıcı etkisinin Western blot analizi ile belirlenmesi	119
Şekil 4.22. Farklı konsantrasyonlarda H ₂ O ₂ ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-Akt (Ser 473) protein seviyesinin Western blot analizi ile belirlenmesi ..	121
Şekil 4.23. 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda kloroform alkaloit ekstraktı ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-Akt (Ser 473) protein seviyesinin Western blot analizi ile belirlenmesi	122
Şekil 4.24. H ₂ O ₂ ile indüklenen p-Akt (Ser 473) protein seviyesi üzerine kloroform alkaloit ekstraktının aktive edici etkisinin Western blot analizi ile belirlenmesi	124
Şekil 4.25. Farklı konsantrasyonlarda H ₂ O ₂ ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-GSK-3β (Ser 9) protein seviyesinin Western blot analizi ile belirlenmesi	125
Şekil 4.26. 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda kloroform alkaloit ekstraktı ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-GSK-3β (Ser 9) protein seviyesinin Western blot analizi ile belirlenmesi	126
Şekil 4.27. H ₂ O ₂ ile indüklenen p-GSK-3β (Ser 9) protein seviyesi üzerine kloroform alkaloit ekstraktının aktive edici etkisinin Western blot analizi ile belirlenmesi	128
Şekil 4.28. Farklı konsantrasyonlarda H ₂ O ₂ ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-Tau (Ser 396 ve Thr 212) protein seviyesinin Western blot analizi ile belirlenmesi	129
Şekil 4.29. 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda kloroform alkaloit ekstraktı ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-Tau (Ser 396 ve Thr 212) protein seviyesinin Western blot analizi ile belirlenmesi	130
Şekil 4.30. H ₂ O ₂ ile indüklenen p-Tau (Ser 396) protein seviyesi üzerine kloroform alkaloit ekstraktının baskılayıcı etkisinin Western blot analizi ile belirlenmesi.	132
Şekil 4.31. H ₂ O ₂ ile indüklenen p-Tau (Thr 212) protein seviyesi üzerine kloroform alkaloit ekstraktının baskılayıcı etkisinin Western blot analizi ile belirlenmesi	132

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
α	Alfa
β	Beta
>	Büyüktür
$\times g$	Dakikadaki devir sayısı
δ	Delta
Δ	Delta
γ	Gama
κ	Kappa
<	Küçüktür
n	Tekrar sayısı
°C	Santigrat derece
~	Yaklaşık
%	Yüzde
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
g/100 g	Gram/100 gram
kDa	Kilodalton
m	Metre
μg	Mikrogram
$\mu g/mg$	Mikrogram/miligram
$\mu g/mL$	Mikrogram/mililitre
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
$\mu mol/L$	Mikromol/Litre
mg	Miligram

Simgeler	Açıklamalar
mg/mL	Miligram/mililitre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
ng/mL	Nanogram/mililitre
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
p	Olasılık
pmol/μL	Pikomol/mikrolitre
pH	Hidrojenin gücü
rpm	Dakikadaki devir sayısı
sn	Saniye

Kısaltmalar	Açıklamalar
(C₂H₅)₂O	Dietil eter
[Ca⁺²]_i	Hücre içi Ca ⁺² konsantrasyonu
¹O₂	Singlet oksijen
6-OHDA	6-hidroksidopamin
AAPH	2,2'-Azobis(2-amidinopropan) dihidroklorür
AChE	Asetilkolinesteraz
AH	Alzheimer hastalığı
AIF	Apoptoz indükleyici faktör
Akt	Protein kinaz B
ALP	Otofaji-lizozom yolu
ALS	Amyotrofik lateral skleroz
AMPA	α-amino-3-hidroksi-5-metil-4 izoksazolepropionik asit reseptörü
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amiloid prekürsör proteini

Kısaltmalar	Açıklamalar
ARE	Nrf2-anti-oksidan tepki elemanı
ASO	Antisens oligonükleotidleri
ATP	Adenozin trifosfat
Aβ	Amiloid beta
Bad	Bcl-2 ile ilişkili ölüm promotörü
Bax	Bcl-2 ilişkili X
BCA	Bikinkonik asit
BChE	Bütirilkolinesteraz
Bcl-2	B hücreli lenfoma-2
bç	Baz çifti
BDNF	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
BH	Sadece-Bcl-2 homoloji
bkz.	Bakınız
BOS	Beyin omurilik sıvısı
BSA	Bovine Serum Albumin
BV-2	Mikroglia hücre hattı
C₂₁H₂₃NO₅	Allokriptopin
CA	Cornu ammonis
Ca⁺²	Kalsiyum
cAbl	Aktive edilmiş abelson reseptör olmayan tirozin kinaz
CACNA1C	Ca _v 1.2 alt birimi
CACNA1D	Ca _v 1.3 alt birimi
CAG	Sitozin-adenin-guanin
CAM	Kalmodulin
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CDKi	CDK inhibitörleri
cDNA	Komplementer DNA
CH	Canlı hücre
CNS	Öngörülen merkezi sinir sistemi aktivitesi
COMT	Katekol-o-metiltransferaz
C_T	Karşılaştırmalı döngü eşiği

Kısaltmalar	Açıklamalar
DA	Dopaminerjik
DCC	Dekarboksilaz
DCF	2,7-diklorofluororesin
dH₂O	Distile su
DHP	Dihidropiridin
DJ-1	Protein deglikaz-1
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DOPA	Dihidroksifenilalanin
E2F	E2 transkripsiyon faktörü
EAH	Erken apoptotik hücre
EGCG	Epigallocateşin gallat
ER	Endoplazmik retikulum
ERK	Ekstraselüler sinyalle regüle edilen kinaz
FABAL	Ege Üniversitesi Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı
FADD	Fas ile ilişkili ölüm domaini proteini
FDA	ABD Gıda ve İlaç İdaresi
FITC	Floresein izotiyosiyanat
fPC12	Farklılaştırılmış PC12 hücreleri
GABA	Gama aminobütirik asit
GAH	Geç apoptotik hücre
GAPDH	Gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz
GC-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
GPx	GSH peroksidaz
GSH	Glutasyon
GSK-3β	Glikojen sentaz kinaz-3 β
H₂DCFDA	2', 7'-diklorodihidrofloresan diasetat
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HClO	Hipokloröz asit
HEK293	İnsan embriyonik böbrek 293 hücreleri
HH	Huntington hastalığı
hTERT	İnsan telomeraz ters transkriptaz

Kısaltmalar	Açıklamalar
Htt	Huntingtin
HVA	Yüksek voltajla aktive edilen Ca^{+2} kanalları
IP3R	İnositol-1,4,5-trifosfat
IκBα	NF- κ B inhibitörü
JAK-STAT	Janus kinaz/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
K^{+}	Potasyum
KAE	Kloroform alkaloid ekstraktı
KAT	Katalaz
KBB	Kan beyin bariyeri
KEAP	Kelch ECH birleştirici protein
LB	Lewy cisimciği
LPS	Lipopolisakkarit
LVA	Düşük voltajla aktive edilen Ca^{+2} kanalları
M	Mitotik
MAO-B	Monoamin oksidaz B
MAP2K'ler	MAPK kinazları
MAP3K'ler	MAPK kinaz kinazları
MAPK	Mitojenle aktive edilen protein kinaz
MCU	Mitokondriyal kalsiyum uniporter
MES	2-(N-morfolino) etan sülfonik asit
MFI	Ortalama floresan yoğunluğu
mHtt	Mutant Htt
MKP-1	MAPK fosfataz-1
MPP^{+}	1-metil-4-fenilpiridinyum
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
mSOD1	Mutant SOD1
MSS	Merkezi sinir sistemi
mtDNA	Mitokondriyal DNA
mtPTP	Mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözenağı
mTOR	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi

Kısaltmalar**Açıklamalar**

MTT	3- (4,5-dimetil-2-tiazil) -2,5-difenil-2H tetrazolium bromür
Na⁺	Sodyum
Na₂SO₄	Sodyum sülfat
NCX	Na ⁺ /Ca ⁺² değiştirici
NFY	Nörofibriler yumak
NF-κB	Nükleer faktör-κB
NGF	Nöron büyüme faktörü
NH	Nekrotik hücre
NH'ler	Nörodejeneratif hastalıklar
NH₄OH	Amonyum hidroksit
NMDAR	N-Metil-D-Aspartat reseptörü
NO•	Nitrik oksit
NO₂	Nitrojen dioksit
Nrf2	Nükleer faktör eritroid 2-ilifkili faktör 2
NTF	Nörotrofik faktör
nTS	Nükleus traktus solitarii
O₂•⁻	Süperoksit anyonu
OH•	Hidroksil radikali
ONOO⁻	Peroksinitrit
p-Akt	Fosforile edilmiş Akt
PBS	Fosfat tamponlu tuzlu su çözeltisi
PC12	Feokromositoma-12
PCNA	Çoğalan hücre nükleer antijeni
PDPK	Prolinden zengin protein kinazlar
p-ERK1/2	Fosforile edilmiş ERK1/2
PGC-1α	Peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör gama koaktivatör-1α
p-GSK-3β	Fosforile edilmiş GSK-3β
PH	Parkinson hastalığı
PHF	Çift helikal filament
PI	Propidyum iyodür
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz

Kısaltmalar	Açıklamalar
p-JNK	Fosforile edilmiş JNK
PMCA	Plazma membran Ca^{+2} pompası
p-p38	Fosforile edilmiş p38
PPAR-γ	Peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör- γ
PP'ler	Protein fosfatazlar
pRb	Hiperfosforile retinoblastom proteini
PSEN	Presenilin
PSS	Periferik sinir sistemi
p-Tau	Fosforile edilmiş Tau
PVDF	Polivinilidin florür
QPlogBB	Öngörülen beyin/kan partisyon katsayısı
QPloghERG	hERG K^{+} kanal bloklayıcı toksik potansiyelin IC50 değeri
qRT-PCR	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
Ripa	Radyo-immünopresipitasyon
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROCC	Reseptörle çalışan Ca^{+2} kanalları
ROS	Reaktif oksijen türleri
Rt	Alıkonma zamanı
#rtvFG	Reaktif fonksiyonel grupların sayısı
RYR	Ryanodin reseptörleri
SAPK	Stresle aktive olan protein kinaz
SD	Standart sapma
SDS-PAGE	Sodyum-dodesil-sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
Ser	Serin
SERCA	Sarkoendoplazmik retikulum Ca^{+2} ATPaz
SIRT1	Sirtuin 1
SN	Substansiya nigra
SNpc	SN pars kompakta
SOCC	Depoyla çalışan Ca^{+2} kanalları
SOD1	Süperoksit dismutaz 1
TAH	Toplam apoptik hücre

Kısaltmalar**Açıklamalar**

t-Akt	Total Akt
TBS	Tris-tamponlu tuzlu su
TDP-43	43 kDa'lık trans-aktif yanıt DNA-bağlayıcı protein
t-ERK1/2	Total ERK1/2
t-GSK-3β	Total GSK-3 β
TH	Tirozin hidroksilaz
Thr	Treonin
t-JNK	Total JNK
TLC	İnce tabaka kromatografisi
TNFR	Tümör nekroz faktör reseptörü
t-p38	Total p38
TPK	Tirozin protein kinazlar
TRADD	TNF reseptörü ile ilişkili ölüm domaini proteini
TrkA	Tropomiyosin ile ilişkili kinaz A
TrkB	Tirozin kinaz reseptörü B
t-Tau	Total Tau
Tyr	Tirozin
UPS	Ubikuitin-proteazom sistemi
VGCC	Voltaj-kapılı Ca ⁺² kanalları
VMAT2	Veziküler monoamin taşıyıcı 2
VOCC	Voltajla çalışan Ca ⁺² kanalları
α-syn	α -sinüklein
$\Delta\Psi_m$	Mitokondriyal membran potansiyeli

1. GİRİŞ

Nörodejeneratif hastalıklar (NH'ler), merkezi sinir sistemi (MSS) veya periferik sinir sistemi (PSS)'deki nöronların ilerleyici kaybını gerektiren heterojen bir nörolojik hastalık grubudur. NH'ler arasında en yaygın olanları Alzheimer hastalığı (AH), Parkinson hastalığı (PH), Huntington hastalığı (HH) ve Amyotrofik lateral skleroz (ALS)'dir (Sanhueza, Manso, Soto ve Salvadores, 2022; Wilson ve diğerleri, 2023). NH'ler, büyük bir küresel hastalık yükü oluşturmaktadır ve demans birçok gelişmiş ülkede bir halk sağlığı sorunudur. Demansın dünya çapında 44 milyon kişiyi etkilediği ve bu sayının 2050 yılına kadar 135 milyon kişiyi geçmesi beklenmektedir (Mortada ve diğerleri, 2021). Türkiye'de ise, her yıl bu rakamlar artmakla birlikte 400 bin-1 milyon AH, 100-130 bin PH, 6-8 bin ALS hastasının olduğu tahmin edilmekte olup, HH'nin prevalansı bilinmemektedir (Kömürcü-Bayrak ve diğerleri, 2015; URL-1, 2, 3). Ayrıca, bu hastalıkların sağlık hizmetleri sistemleri üzerindeki küresel ekonomik ve sosyal etkisi, artan yaşlanan nüfus ve daha uzun yaşam süreleri nedeniyle önümüzdeki yıllarda büyük olasılıkla önemli ölçüde artmaya devam edecektir (Mortada ve diğerleri, 2021).

Klinikteki görünüm ve yaygınlıktaki büyük farklılıklara rağmen, NH'ler oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, mitojenle aktiveleştirilen protein kinaz (MAPK) sinyal yollarının aktivasyonu, hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) homeostazının, nöral hücre döngüsünün ve nöral ölüm sinyal yollarının disregülasyonu ve ayrıca protein yanlış katlanması ve agregasyonu gibi bir dizi moleküler ve hücresel patolojiyi paylaşır (Cui ve diğerleri, 2021; Joseph ve diğerleri, 2020; Kim ve Choi, 2015; Muddapu, Dharshini, Chakravarthy ve Gromiha, 2020; Fricker, Tolkovsky, Borutaite, Coleman ve Brown, 2018; Soto ve Pritzkow, 2018). Bu ortak mekanizmalar, sonunda nöronların fonksiyon bozukluğuna ve nöral ölüme yol açan karmaşık kısır döngüler içinde birbiriyle ilişkilidir (Jellinger, 2010; Mortada ve diğerleri, 2021). NH'lerin tedavisinde kullanılan mevcut ilaçlar, asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörü, N-Metil-D-Aspartat reseptörü (NMDAR)'yi bloke edici, anti-dopamin (veziküler monoamin taşıyıcı 2 (VMAT2) inhibitörü; salınan dopamin miktarını azaltıcı) ve anti-glutamat (glutamat salınımını engelleyici, NMDAR ve sodyum (Na^{+}) kanallarının inhibitörü) gibi etki mekanizmalarına sahiptir (Bezprozvanny, 2009). Bu ilaçlar, hastalıkla ilgili semptomları geçici olarak hafifleterek veya hastalığın ilerlemesini orta derecede geciktirerek sınırlı bir rahatlama sağlamakta olup, ciddi yan etkileri nedeniyle de nadiren reçete edilmektedir (Bezprozvanny, 2009; Chen ve Pan, 2014; Kumar ve Singh, 2015).

Dolayısıyla, etkili hastalık modifiye edici tedavilerin yokluğu ve yeni tedaviler için çoğu klinik denemenin başarısızlığı, hastalığın ilerlemesini durdurmak için yeni terapötik hedefler belirleme ihtiyacını vurgulamaktadır. Gelişen tedavi stratejilerindeki önemli bir zorluk, bunların çok faktörlü etiyolojisi ve çeşitli hastalık seyridir (Mortada ve diğerleri, 2021). Bu durum, her hastalığın nedenleri ve moleküler mekanizmalarının detaylı araştırılmasıyla çözüme ulaşabilecektir (Gitler, Dhillon ve Shorter, 2017). Ayrıca, NH'leri tedavi etme çabaları, hastalıklarda etkili mekanizmalardan herhangi birini ele alırken diğerlerini göz ardı etme eğiliminde olmaları gerçeğiyle sınırlıdır. Bu bağlamda, NH'ler için alternatif tedaviler, hem birden fazla mekanizma üzerinde etkili hem de oluşabilecek yan etkilerin en aza indirgenmesini sağlayabilecek doğal ajanlar olan fitokimyasallara odaklanmıştır (Kumar ve Singh, 2015).

Bitki kaynaklı biyoaktif bileşikler olan fitokimyasallar beyinde, nörotransmitter metabolizması ve salınımının modülasyonu, büyüme faktörü indüksiyonu, anti-oksidan ve anti-inflamatuar aktivitenin yanı sıra mitokondriyal homeostazın düzenlenmesi gibi çeşitli biyolojik etkiler üretir. Dolayısıyla, bu bileşiklerin çok-hedefli etkileri birbiriyle bağlantılı olup, nöroproteksiyonda etkilidir (Limanaqi ve diğerleri, 2020). Fitokimyasallardan alkaloidlerin mono amin oksidaz aktivitesinin inhibisyonu, AChE inhibitörü, kolinerjik nikotinik arttırıcı, muskarinik bağlanma aktivitesi, NMDA reseptörlerinde antagonist, NMDA, nitrik oksit (NO•) ve serotonin gibi nörotransmitter sistemleri modüle edici, amiloid β (A β) oluşumunu/agregasyonunu ve MAPK aktivasyonunu inhibe edici etki, Ca⁺² seviyesinin modülasyonu, Tau proteininin hiperfosforilasyonunu azaltıcı, protein kinaz B (Akt)/Glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β) sinyal yolağını regüle edici, mitokondriyal ve kan beyin bariyeri (KBB)'yi koruyucu, anti-inflamatuar, anti-oksidan, anti-eksitotoksik ve anti-apoptotik etki gibi özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Kumar, Anilakumar ve Naveen, 2015; Libro, Giacoppo, Soundara Rajan, Bramanti ve Mazzon, 2016; Lima ve Hamerski, 2019; Xu, Wang, Xiao ve Wang, 2021). Bu bilgilere göre, alkaloidlerin çoklu patolojik mekanizmalar üzerinde etki gösterdiği söylenebilir. Dolayısıyla, alkaloidler, kombine tedaviler gibi stratejiler ve farklı fonksiyonel motifleri farklı hedeflerle bağlayarak sentetik heterodimerlerin, mevcut ilaçların potensinin ve yeni ilaç sınıflarının geliştirilmesine yardımcı olabilir (Ng, Or ve Ip, 2015). Bu bağlamda, tıbbi açıdan önemli alkaloidleri nedeniyle Papaveraceae familyasında yer alan *Glaucium* cinsi ilgi çekmektedir (Morteza-Semnani, Saeedi, Hamidian, Vafamehr ve Dehpour, 2002). Özellikle de, bu alkaloidler allokriptopin gibi izokinolin alkaloidleridir (Li, Li, Huang, Han ve Li, 2019; Shafiee,

Ghanbarpour ve Akhlaghi, 1985). İzokinolin alkaloidleri güçlü analjezik özellikte olup, bu da beyin sinapslarındaki gama aminobütirik asit (GABA)'nın artmasına neden olur (Kumar ve diğerleri, 2015). Alkaloidlerin yanı sıra fenolik, flavonoid ve yağ asitleri gibi bazı önemli sekonder nöroprotektif metabolitleri içeren *Glaucium* türleri geleneksel şifacılar tarafından bilişsel güçlendirici olarak kullanılmaktadır (Ahmed, Ghalib, Sasikala ve Ahmed, 2013; Amtul ve Rahman, 2016; Kocanci ve Aslim, 2021; Özsoy, Yılmaz-Özden, Aksoy-Sağırlı, Şahin ve Sarı, 2018). Ancak, zengin alkaloid içeriğine sahip ve dolayısıyla tıbbi önemi olan *G. corniculatum* (L.) RUD. subsp. *refractum* (Nábělek) Cullen (*G. grandiflorum* Boiss. & A. Huet subsp. *refractum* (Nábělek) Mory) bitkisi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan bazı çalışmalar, *G. corniculatum*'un alkaloid profilinin ortaya konulması ve total ekstraktlarının AChE ve bütirikolinesteraz (BChE) inhibitör etkilerinin gösterilmesi üzerinedir (Doncheva ve diğerleri, 2014; Kintsurashvili ve Vachnadze, 2000; Orhan, Şener, Choudhary ve Khalid, 2004; Vorniceanu, Vatui, Ionescu, Zamfirache ve Bara, 2004). *G. grandiflorum* ile yapılan çalışmalarda ise, bu bitkinin alkaloid profilleri ortaya konulmuş olup, analjezik, anti-bakteriyel, anti-AChE, anti-tümör, anti-proliferatif, anti-inflamatuar, anti-oksidan, DNA hasarını önleyici ve siklooksijenaz-2 inhibitör etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Akaberi, Shourgashti, Emami ve Akaberi, 2021; Bozkurt, Önür, Somer ve Kaya Cebioğlu, 2018; Morteza-Semnani ve diğerleri, 2002; Morteza-Semnani, Saeedi ve Hamidian, 2004; Morteza-Semnani, Saeedi ve Mahdavi, 2005; Özsoy ve diğerleri, 2018; Saraç, Daştan, Durukan, Daştan, Demirbaş ve Karaköy, 2018). Ayrıca, araştırma ekibimizce yapılan çalışmalarda da *G. corniculatum* (L.) RUD. subsp. *refractum* (Nábělek) Cullen (*G. grandiflorum* Boiss. & A. Huet subsp. *refractum* (Nábělek) Mory)'nin total ekstraktlarının AChE'yi inhibe edici ve nöron benzeri hücreler üzerinde anti-inflamatuar etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Kocanci ve Aslim, 2017; Kocanci, Hamamcioglu ve Aslim, 2017). Dolayısıyla, ilgili çalışmalarda *G. corniculatum* (L.) RUD. subsp. *refractum* (Nábělek) Cullen (*G. grandiflorum* Boiss. & A. Huet subsp. *refractum* (Nábělek) Mory)'den elde edilen total ekstraktların etkileri gösterilmiş olup, bu bitkiden elde edilen alkaloid ekstraktlarının NH'lerde alternatif ilaç adayları olarak kullanım potansiyeli ile ilgili şimdiye kadar hiçbir çalışma yapılmamıştır. Özellikle, bu alkaloid ekstraktlarının anti-oksidatif, hücre döngüsü düzenleyici, Ca^{+2} homeostazını sağlayıcı, MAPK sinyal yollarının (ekstraselüler sinyalle regüle edilen kinaz (ERK)1/2, c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38) aktivasyonunu inhibe edici, Akt/GSK-3 β sinyal yolağını regüle edici, Tau proteininin hiperfosforilasyonunu inhibe edici ve anti-apoptotik mekanizmalar üzerinden nöroprotektif etkisini ortaya koyan bir çalışmanın yapılmadığı dikkat çekmiştir.

Bu bilgiler doğrultusunda, literatürde ilgili alandaki eksikliklerin giderilmesi ve allokriptopince zengin alkaloit ekstraktlarının NH'ler ile ilişkili sinyal yollarındaki çoklu etki mekanizmasının ortaya konulması için aşağıdaki amaç ve hedefler belirlenmiştir.

Bu doktora tez çalışmasında;

- 1) *G. grandiflorum*'un kloroform, metanol ve su çözücülerini ile alkaloit ekstraktlarının hazırlanması, alkaloit ekstraktlarının kalitatif ve kantitatif gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) analizi ile alkaloit profillerinin çıkarılması, bu bitki türünde alkaloit çeşitliliğini veya miktarını en iyi şekilde ortaya koyabilecek çözücünün tespit edilmesi, alkaloit ekstraktlarında NH'lerde nöroprotektif/terapötik etkiye sahip ilaç adayı olabilecek majör alkaloit/alkaloitlerin ve bunların miktarlarının belirlenmesi,
- 2) *G. grandiflorum*'un kloroform, metanol ve su alkaloit ekstraktlarının, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve nörite farklılaştırılmış PC12 hücreleri (fPC12) ile oluşturulan *in vitro* NH modelinde, artan hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) seviyesi üzerine baskılayıcı etkilerinin anti-oksidan mekanizma üzerinden ortaya konulması,
- 3) Oksidatif stres ile fPC12 hücrelerinin nöral apoptoza indüklendiğinin yani deney modelinin oluştuğunun üç ayrı mekanizma aracılığıyla gösterilmesi, oluşturulan bu *in vitro* NH modelinde *G. grandiflorum*'un kloroform, metanol ve su alkaloit ekstraktlarının anti-apoptotik etkilerinin, apoptotik hücrelerin baskılanması, hücrelerin çoğalma hızlarının düzenlenmesi ve intrinsik apoptotik yoldaki genlerin regülasyonu üzerinden ortaya konulması dolayısıyla, alkaloit ekstraktlarının nöral apoptoza karşı koruyucu etkilerinin üç farklı mekanizma ile doğrulanması,
- 4) *G. grandiflorum*'un kloroform alkaloit ekstraktının, *in vitro* NH modelinde artan hücre içi Ca^{+2} seviyesi üzerine baskılayıcı, bununla ilişkili olarak hücre içi Ca^{+2} homeostazını regüle edici etkisinin gösterilmesi,
- 5) *G. grandiflorum*'un kloroform alkaloit ekstraktının, *in vitro* NH modelinde L-tipi voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalı alt tiplerinden olan $Ca_v1.2$ ve $Ca_v1.3$ üzerine baskılayıcı etkisinin hem gen hem de protein düzeyinde gösterilmesi dolayısıyla, L-tipi Ca^{+2} kanal blokeri olma potansiyelinin ortaya konulması,

6) *G. grandiflorum*'un kloroform alkaloit ekstraktının, *in vitro* NH modelinde artan fosforile edilmiş (p)-ERK1/2, p-JNK ve p-p38 protein seviyeleri üzerine inhibitör ve buna bağlı olarak MAPK sinyal yollarının aktivasyonu üzerine baskılayıcı dolayısıyla, nörokoruyucu etkisinin ortaya konulması,

7) fPC12 hücrelerinde nöral ölüm yollarında etkili olan proteinlerden p-Akt (serin (Ser) 473) ve p-GSK-3 β (Ser 9) seviyesinin artışı, p-Tau (Ser 396 ve treonin (Thr) 212) seviyesinin ise azalışını sağlayan H₂O₂ dozunun, ek olarak kloroform alkaloit ekstraktının tek başına fPC12 hücrelerinde p-Akt, p-GSK-3 β ve p-Tau protein seviyesi üzerinde etkin ve toksik etki göstermeyen doz/dozlarının belirlenmesi,

8) *G. grandiflorum*'un kloroform alkaloit ekstraktının, *in vitro* NH modelinde p-Akt ve p-GSK-3 β proteinlerinin artışı sağlayarak, Akt/GSK-3 β sinyal yolağını regüle edici ve buna bağlı Tau proteinlerinin hiperfosforilasyonunu inhibe edici dolayısıyla, nöral ölüm sinyal yolları üzerindeki baskılayıcı etkisinin ortaya konulması hedeflenmiştir.

Yukarıda belirtilen hedefler doğrultusunda, bu doktora tez çalışmasında, farklı moleküler mekanizmalar üzerine odaklanarak, günümüzde NH'lerin tedavisinde kullanılan ancak yeterince etkin olmayan ve ayrıca ciddi yan etkileri bulunan ilaçların yerine doğal bileşiklerden olan *G. grandiflorum*'un alkaloit ekstraktlarının aktif bileşenlerinin tanımlanması, bu bileşenlerin nöroproteksiyonda etkili çeşitli sinyal yolları üzerinde anti-oksidan özelliklerine bağlı etkinliklerinin ortaya konulması, nöroprotektif mekanizmaların birbiri ile ilişkisinin aydınlatılması, böylece daha etkin ve yan etkisi daha az olan yeni bir ilaç etken ajanının keşfedilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamız, alkaloitlerin yeni ilaçların geliştirilmesi için önemli bir etken madde kaynağı olabileceğini, yeni sentetik analoglar geliştirmenin başlangıç noktasını temsil edebileceğini ve alternatif olarak NH'ler için geleneksel tedavilerle kombine edilebileceğini göstermiştir. Bu bakımdan çalışmamız, Türkiye'de yaygın olarak yetişen *G. grandiflorum*'un alkaloitlerinin özellikle de allokriptopinin belirlenen etkilerini literatüre kazandıran ilk araştırma olma potansiyeline bağlı, bu alanda yapılacak yeni bilimsel araştırmalara zemin oluşturabilecektir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar

Nörodejeneratif hastalıklar (NH'ler), merkezi sinir sistemi (MSS)'nin spesifik bölgelerinde yavaş ilerleyici ve geri dönüşü olmayan disfonksiyona ek olarak nöron ve sinapsların kaybindan kaynaklanan bir dizi patolojik koşula sahip bir hastalık grubudur (Jellinger, 2010; Golpich ve diğerleri, 2017; Wilson ve diğerleri, 2023). Nörodejenerasyon, heterojen klinik ve patolojik ifadelere neden olan nöronların ilerleyici yapısal ve fonksiyonel kaybını ifade eder. Bu ilerleyici nöral hücre ölümü, genellikle farklı patolojik mekanik yollara göre farklılaşabilen Alzheimer hastalığı (AH), Parkinson hastalığı (PH), Huntington hastalığı (HH) ve Amyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi çeşitli NH'lere yol açar (Poddar, Chakraborty ve Banerjee, 2021: 1-180). Dolayısıyla, NH'ler MSS'nin yapısının ve fonksiyonunun progresif dejenerasyonu ile karakterizedir, bu da bilişsel ve motor fonksiyonlarda bozukluklara yol açar (Golpich ve diğerleri, 2017; Liu, Zhou, Ziegler, Dimitron ve Zuo, 2017a). Bununla birlikte, hastalıklar patofizyolojilerinde çeşitlidir; bazıları hafızaya ve bilişsel bozukluklara neden olurken, bazıları kişinin hareket etme, konuşma ve nefes alma yeteneğini etkilemektedir (Gitler ve diğerleri, 2017; Pasko, Churkina, Shakhov, Kotlobay ve Alieva, 2023).

2.1.1. Alzheimer hastalığı

AH, en yaygın NH türü olup; hafıza, dil ve algı dahil olmak üzere bilişsel işlevlerde sonuçta bunama ile sonuçlanan bir azalma ile karakterizedir (Sanhueza ve diğerleri, 2022; Shukla, Tiwari ve Tiwari, 2023; Tong, Wu, Li ve Cheung, 2018). AH, çoğu durumda (yüzde (%)90-95) 65 yaşından sonra başlarken (geç başlangıçlı AH), nadir durumlarda, AH nispeten genç yaşta (<65) (erken başlangıçlı AH) gerçekleşir (Penke, Szűcs ve Bogár, 2020). AH'nin kesin nedeni ve patogenezi tam olarak anlaşılmamıştır ve şu anda hastalık için etkili bir tedavi yoktur. AH beyinlerinin ana patolojik özellikleri, senil plakların, nörofibriler yumak (NFY)'lerin ve nöral kaybın varlığıdır. Senil plaklar esas olarak transmembran amiloid prekürsör proteini (APP)'nin proteolitik bölünmesinden üretilen Aβ peptidinden oluşur. NFY'ler ise, mikrotübüllerin düzenlenmesi ve stabilizasyonunda yer alan çok fonksiyonlu bir protein olan ve kendi kendine agrega olabilen hiperfosforile Tau içeren çift helikal filament (PHF) yapılarının dizileri ile oluşturulur (Moloney, Lowe ve Murray, 2021; Tong

ve diğerleri, 2018; Zhao ve Zhao, 2013). Oligomerik A β ve Tau proteinleri, sırasıyla hücre dışı ve hücre içi yapılar halinde gelişebilir, her iki form da AH patogenezi tetikleyebilir. Bunlara ek olarak, AH hastalarının %80'inden fazlası aynı zamanda küçük-orta kan damarları ve meninks duvarlarında A β birikintilerinin olduğu serebral amiloid anjiyopati patolojisini de gösterir. AH, ayrıca sinaptik disfonksiyon, nöral kayıp, vasküler değişiklikler ve astrogliozis ile karakterizedir (Penke ve diğerleri, 2020).

2.1.2. Parkinson hastalığı

PH, substansiya nigra pars kompakta (SNpc)'deki dopaminerjik (DA) nöronların ilerleyici dejenerasyonu ve striatumdaki dopamin salınımının azalması nedeniyle motor bozulma ile karakterize edilen ikinci en yaygın nörodejeneratif durumdur (Cramb, Beccano-Kelly, Cragg ve Wade-Martins, 2023; Oñate ve diğerleri, 2020). Nöronlar vücudun istemli hareketlerini düzenlediği ve kontrol ettiği için, dejenerasyonu motor fonksiyonda bozulmaya ek olarak, istemli hareketlerde yavaşlamaya (bradikinezi), postural instabiliteye, sertliğe ve istirahatte titremeye yol açar (Singh, Kukreti, Saso ve Kukreti, 2019). Yaşlanma, hastalık için önemli bir risk faktörüdür ve hastalık, sporadik (kalıtsal olmayan; %90-95 vaka) ve ailesel (kalıtsal; %5-10 vaka) formlarda ortaya çıkar (Benkert ve diğerleri, 2019; Niedzielska ve diğerleri, 2016). PH'nin altında yatan patojenik mekanizmalar henüz çözülmemiştir ve iyileştirici tedaviler şu anda mevcut değildir (Benkert ve diğerleri, 2019). PH beyinlerindeki etkilenen nöronlar, öncelikle normal koşullar altında MSS boyunca bol miktarda bulunan küçük bir nöral protein olan pre-sinaptik protein α -sinükleinden (α -syn) oluşan Lewy cisimciği (LB) adı verilen yoğun filamentli inklüzyonları içerir (Leandrou, Emmanouilidou ve Vekrellis, 2019). Ayrıca, LB'ler α -syn'nin yanı sıra, ubikutin ve Parkin gibi çeşitli proteinleri de içerir (Niedzielska ve diğerleri, 2016).

2.1.3. Huntington hastalığı

HH, motor, bilişsel ve duygusal anormallikler ile karakterize, baskın olarak kalıtsal, otozomal bir NH'dir (Poddar ve diğerleri, 2021: 1-180; van Lonkhuizen ve diğerleri, 2023). HH, huntingtin (Htt) genindeki bir mutasyondan kaynaklanır. Bu gendeki sitozin-adenin-guanin (CAG) tekrarında anormal bir uzantı ile karakterize edilir, bu da mutant Htt (mHtt) proteinin anormal derecede uzun bir poliglutasyon tekrarına dönüşür (Pasko ve diğerleri, 2023; Singh ve diğerleri, 2019). mHtt, proteolitik olarak bölünür ve proteinin amino-

terminal fragmanları, nöronlar içinde inklüzyon cisimcikleri oluşturmak üzere agrega olur. HH'nin başlangıç yaşı ve şiddeti, Htt genindeki CAG tekrarlarının sayısından güçlü bir şekilde etkilenir; 10-35 CAG tekrarları normal olarak kabul edilirken 40 veya üstü (mHtt olarak adlandırılır) CAG tekrarları HH patolojisi ile sonuçlanır (Schrank, Barrington ve Stutzmann, 2020). Mevcut HH tedavileri semptomların şiddetini bastırmaya yardımcı olur; bununla birlikte, hiçbir tedavi hastalığın ilerlemesini doğrudan iyileştirmez veya önemli ölçüde durdurmaz (Liu ve diğerleri, 2017a).

2.1.4. Amyotrofik lateral skleroz

ALS, omuriliğin kortikospinal sistem, beyin sapı ve ön boynuz hücrelerinin ilerleyici bozulması ile ilişkili bir motor nöron hastalığıdır (Corcia, Lunetta, Vourc'h, Pradat ve Blasco, 2023; Poddar ve diğerleri, 2021: 1-180). Bugüne kadar, nöral olmayan hücrelerde, süperoksit dismutaz 1 (SOD1), 43 kDa'lık trans-aktif yanıt DNA-bağlayıcı protein (TDP-43) ve C9orf72'deki gibi ALS patogenezi ile bağlantılı çoklu genetik mutasyonlar tanımlanmıştır. Bu genlerin ifadesi, ALS'de nöroinflamasyon ve bağışıklık düzensizliği ile ilişkilidir (Azam, Haque, Balakrishnan, Kim ve Choi, 2021). Vakaların yaklaşık %90'ı sporadiktir ve %10'u aileseldir. Ailesel vakaların yaklaşık %20'si Cu/Zn SOD1 mutasyonlardan kaynaklanır (Lin ve Beal, 2006). Diğer NH'ler gibi tedavisi olmayan ALS'nin ana patolojik özelliği, dejenere olan motor nöronlarda ve çevreleyen oligodendrositlerde sitoplazmik agregatların oluşumudur, ancak bu agregatlar aynı zamanda frontal ve temporal korteks, hipokampus ve serebellumda da bulunur (Niedzielska ve diğerleri, 2016). Ailesel ALS ile ilişkili ilk tanımlanan protein olan yanlış katlanmış SOD1'in agregasyonu, ALS patogenezi ile yakından ilişkilidir. TDP-43 proteinleri ise, normal nükleer kompartmanlarından sitoplazmaya yanlış lokalize olurlar ve bu da sitoplazmik agregasyonların oluşumuna neden olur (Jeon ve diğerleri, 2019).

2.2. Nörodejeneratif Hastalıkların İnsidans, Prevalans ve Maliyeti

NH'ler, insan sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmakla birlikte, özellikle yaşlanan popülasyonda birincil sağlık sorununu temsil etmektedir. Bu yaşa bağlı bozukluklar, kısmen son yıllarda yaşlı nüfusun artması nedeniyle giderek yaygınlaşmaktadır (Gitler ve diğerleri, 2017; Liu ve diğerleri, 2017a; Van Schependom ve D'haeseleer, 2023). Demans şu anda küresel olarak 7. önde gelen ölüm nedenidir (URL-4). Demans esas olarak yaşlıları etkiler,

ancak 65 yaşından önce başlayan vakalara dair artan bir farkındalık vardır. Dünya Sağlık Örgütü'nün raporuna göre, 2020'de dünya çapında demansla yaşayan 55 milyondan fazla insanın olduğu, bu sayının her 20 yılda bir ikiye katlanarak 2030'da 78 milyona ve 2050'de 139 milyona ulaşacağı bildirilmiştir. Ayrıca, rapora göre her yıl dünya çapında 10 milyondan fazla yeni bunama vakası vardır ve bu da her 3,2 saniyede bir yeni vaka anlamına gelmektedir (URL-4).

AH, milyonlarca insanı etkileyen en yaygın demans türüdür. 2021 Dünya Alzheimer Raporu'na göre, vakaların yaklaşık %70'i AH'ye bağlanmıştır. AH için insidans oranı yaşla birlikte katlanarak artar, ana başlangıç zamanı 60 yaş üstü, özellikle 70 ile 80 yaş arasındaki kişilerde gözlenir (Magi ve diğerleri, 2016; URL-5, 6). En yaygın ikinci NH olan PH, 65 yaşın üzerindeki popülasyonun %1-2'sini etkiler (Liu ve diğerleri, 2017a). PH'nin insidansının yılda 100 bin nüfus başına 4,5-21 vaka olduğu tahmin edilmektedir ve prevalans tahminleri 100 bin nüfus başına 18 ile 328 vaka arasında değişmektedir ve çoğu çalışma 100 bin nüfus başına yaklaşık 120 vaka prevalansı vermektedir. AH'de olduğu gibi PH'nin de insidansı ve prevalansı yaşla birlikte artar ve ortalama başlangıç yaşı yaklaşık 60'dır. 40 yaşından küçük kişilerde başlangıç nispeten nadirdir (URL-7). Araştırmacılar, her 10 bin kişiden birinin HH'ye sahip olduğunu bildirmektedir. 20 yaşından önce gelişen, hızla ilerleyen ve hastanın çok az hareket ettiği juvenil (genç) HH, tüm vakaların yaklaşık %16'sında görülür (URL-8). ALS'nin insidansı ise yılda 100 bin kişide yaklaşık 1-2,6 vaka iken prevalans 100 bin kişide yaklaşık 6 vakadır. ALS'nin ortalama başlangıç yaşı şu anda 58-60 yıldır ve başlangıçtan ölüme kadar ortalama sağkalım 3-4 yıldır (Talbott, Malek ve Lacomis, 2016). Türkiye İstatistik Kurumu'na göre, ülkemizin 65 yaş üstü yaşlı nüfus oranının 2023'de %10'un üzerinde olacağı ve demans hastalıklarının sıklığının hızla artmaya devam edeceği öngörülmektedir (URL-9). AH'ye sahip bireylerin 400 bin ile 1 milyon arası olduğu tahmin edilirken, 2050 yılında Türkiye'nin dünyada en fazla AH'ye sahip 4. ülke olacağı tahmin edilmektedir (URL-1). Sayıları 100-130 bin arasında değişen PH'ye ise, her yıl 10 bin kişi daha eklenmekte ve 2030 yılında bu sayının iki katına çıkması beklenmektedir (URL-2). HH'nin Türkiye'deki prevalansı bilinmemekte olup, ALS ile de yapılmış bir epidemiyolojik çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte, ülkemizde yaklaşık 6-8 bin ALS hastasının varlığı tahmin edilmektedir (URL-3; Kömürcü-Bayrak ve diğerleri, 2015).

NH'lerin maliyeti incelendiğinde, 2019 Dünya Alzheimer Raporu'na göre 2015 yılında demans için 818 milyar dolar harcandığı açıklanmıştır. Bu bütçenin 2030 yılında 2,8 trilyon dolar olacağı varsayılmaktadır (URL-5; Yeşilkır Baydar, 2020: 575-594). ABD'de PH için yıllık maliyet yaklaşık 14 milyar dolardır. 14 milyar doların 8 milyar doları ilaç maliyetidir. Kalan 6 milyar dolar ise PH hastası ve hastanın bakımından sorumlu olan kişinin iş gücü kaybı, doktor muayenesi için maliyetler, hastanın evde bakımı sırasında evinde yapılan değişiklikler, hastanın günlük bakım maliyetleri gibi indirekt maliyetlerdir (Ayvat, Şahin ve Soner, 2019). Rodríguez-Santana ve diğerleri (2022) yaptıkları çalışmaya göre Avrupa ve ABD'de HH maliyet tahminlerini (doğrudan tıbbi maliyetler için 12 bin avro, doğrudan olmayan tıbbi maliyetler için 2 bin avro ve dolaylı maliyetler için 47 bin avro olarak) belirlemişlerdir. Maliyetlerin, hastalar ve ülkeler arasında büyük farklılıklar gösterdiğini saptamışlardır. Amerikan ALS Derneği tarafından desteklenen 2014 tarihli bir araştırmada ALS'nin toplam yıllık maliyetinin yılda 250 milyon dolar olduğu tahmin edilmiştir. Hasta başına ortalama yıllık maliyetin 143 bin dolar olduğu tahmin edilmektedir. ALS'li hastalar ortalama 92 bin dolar doğrudan maliyete ve 51 bin dolar dolaylı maliyete maruz kalmaktadır (URL-10). Türkiye'de yapılan bir çalışma sonucuna göre ise, AH'nin yıllık maliyeti erken evrede 11 bin TL, orta evrede 34 bin TL ve ileri evrede 61 bin TL olarak belirlenmiştir (Eroymak ve Yiğit, 2017). Bu nedenle, sağlık ve sosyal hizmet talepleri çok yüksek ve yaşamı tehdit eden bu tür hastalıkların görülme oranını ve bununla ilişkili masrafları azaltmak sürekli gözetim gerektirir (Poddar ve diğerleri, 2021: 1-180).

Günümüzde, toplumda oldukça yaygın olan nörolojik krizler için birkaç tedavi tanımlanmıştır. Mevcut tedaviler sadece semptomları hedeflediğinden ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatmadığından veya tersine çevirmediğinden, hastalığı önleyici veya hastalık üzerinde etkili bir tedavi ihtiyacı hala devam etmektedir (Azam ve diğerleri, 2021; Rajmohan ve Reddy, 2017). Bu ihtiyaç, her hastalığın nedenleri ve mekanizmalarının detaylı bir şekilde araştırılması ile karşılanabilecektir. Hücre tabanlı sistemlerden tek hücreli organizmalara ve karmaşık hayvanlara kadar modellerin araştırma topluluğunun NH'lerin altında yatan mekanizmalara ışık tutmasına yardımcı olmak için yararlı bir araç olduğu kanıtlanmış olup, bu ilerlemeler aday biyobelirteçleri veya terapötik hedefleri ortaya çıkaracak umut verici terapötik yollar olarak görülmektedir (Gitler ve diğerleri, 2017).

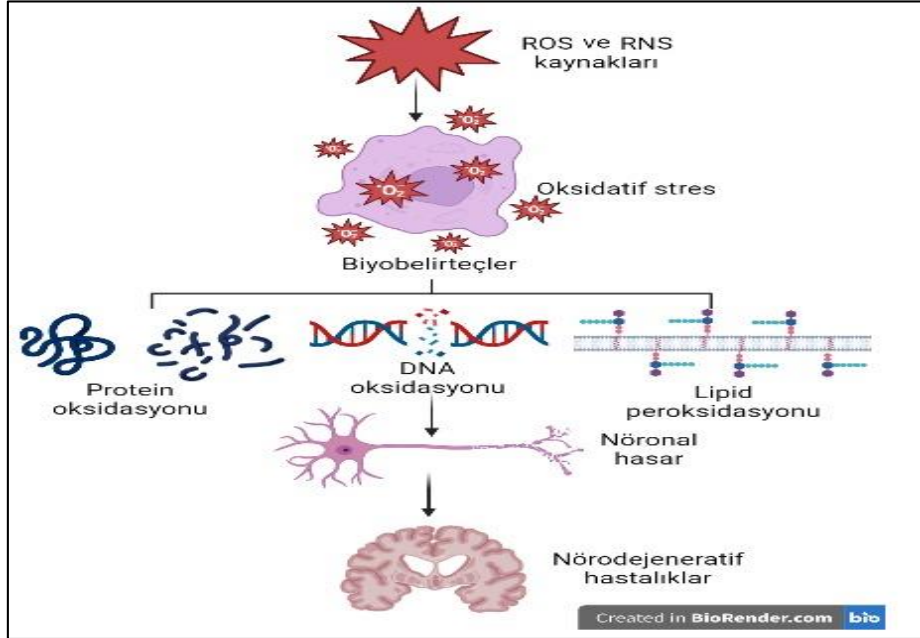
2.3. Nörodejeneratif Hastalıkların Ortak Mekanizmaları

Klinikteki belirtiler ve yaygınlıktaki büyük farklılıklara rağmen, NH'ler, kronik ve aşamalı süreçleri, yaşla prevalansın artması, beynin belirli bölgelerinde nöronların ölümü, sinaptik bağlantı ağının hasarı ve seçici beyin kütle kaybı dahil olmak üzere birçok yaygın özelliğe sahiptir (Soto ve Pritzkow, 2018). NH'ler bu yaygın özelliklerin temelinde oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, MAPK sinyal yollarının aktivasyonu, hücre içi Ca^{+2} homeostazının, nöral hücre döngüsünün ve nöral ölüm sinyal yollarının disregülasyonu ve ayrıca protein yanlış katlanması ve agregasyonu gibi bir dizi moleküler ve hücre patolojisi paylaşır (Cui ve diğerleri, 2021; Fricker ve diğerleri, 2018; Joseph ve diğerleri, 2020; Kim ve Choi, 2015; Muddapu ve diğerleri, 2020). Bu mekanizmalar, sonunda hücre işlev bozukluğuna ve ölüme yol açan karmaşık kısır döngüler içinde birbiriyle ilişkilidir (Jellinger, 2010). NH'lerle ilgili bilgi birikimine rağmen, etkili tedavilere ihtiyaç devam etmekte olup, bu durum her hastalığın nedenleri ve moleküler mekanizmalarının detaylı araştırılmasıyla çözüme ulaşabilecektir (Gitler ve diğerleri, 2017; Pasko ve diğerleri, 2023).

2.3.1. Oksidatif stres

Oksidatif stres, ROS ve/veya reaktif nitrojen türleri (RNS)'nin aşırı üretimi ile bu reaktif türlerin enzimatik veya enzimatik olmayan detoksifikasyonu arasındaki dengesizlikten meydana gelmektedir (Lushchak, 2021; Olufunmilayo, Gerke-Duncan ve Holsinger, 2023; Wang ve Michaelis, 2010). ROS/RNS, hem süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$), $NO^{\bullet}$ ve nitrojen dioksit (NO_2) gibi serbest radikalleri hem de singlet oksijen ($^1O_2$), H_2O_2 , hipokloröz asit ($HClO$) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi serbest olmayan radikalleri içerir (Truong, Jun ve Jeong, 2018). Düşük konsantrasyonlardaki ROS/RNS, sinyal süreçlerinde düzenleyici araçlar olarak önemli bir rol oynarken, bu moleküllerin aşırı miktarı, lipid peroksidasyonu, protein ve DNA oksidasyonu gibi makromoleküllerin modifikasyonundan sorumludur, bu da sonuç olarak apoptotik/nekrotik sinyallemenin aktivasyonuna ve nöral hücre ölümüne neden olmaktadır (Di Meo, Reed, Venditti ve Victor, 2016; Ramalingam ve Kim, 2012) (Şekil 2.1). Oksidatif stres, disfonksiyon ve/veya disregülasyonu nöral ölüm ile sonuçlanan, hücre Ca^{+2} homeostazı, mitokondri, nöral hücre döngüsü, MAPK sinyal yolları ve diğer nöral ölüm sinyal yollarını Akt/GSK-3 β etkileyen bir süreçtir. Bunlara ek olarak oksidatif stres, NH'lerde protein yanlış katlanmasını ve agregasyonunu indükleyebilir (Farkhondeh ve diğerleri, 2020; Joseph ve diğerleri, 2020;

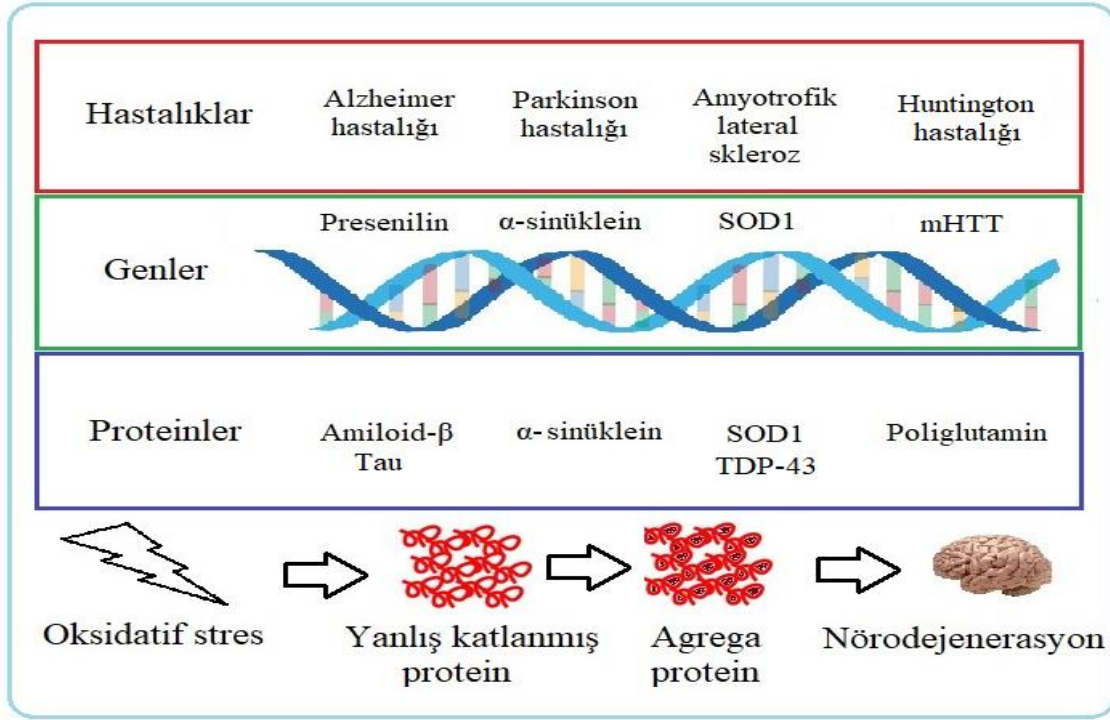
Lee ve diğerleri, 2009a; Wilkaniec, Strosnajer ve Adamczyk, 2013). Dolayısıyla oksidatif stres, birçok NH'nin patomekanizması ve patofizyolojisinde temel ve önemli bir faktördür (Kim, Kim, Rhie ve Yoon, 2015).



Şekil 2.1. Reaktif oksijen türleri/reaktif azot türlerinin oksidatif stresin biyobelirteçleri olan biyomoleküller üzerindeki etkisi (Singh, Kukreti ve Kukreti (2022: 121-154)'den yararlanılarak çizilmiştir).

Nöronlar, diğer hücre tipleriyle karşılaştırıldığında, enerji kaynağı olarak çoğunlukla oksidatif fosforilasyona bağımlıdır, bu nedenle yüksek oksijen konsantrasyonuna maruz kalırlar (Bazinet ve Layé, 2014). Bu hücreler oksidasyona yatkın çoklu doymamış yağ asitleri ve beyinde yaşlanma sürecinde biriken ve ROS oluşumunu indükleyebilen metal iyonlarınca zengin olmaları, düşük seviyelerde katalaz (KAT) ve glutatyon (GSH) peroksidaz (GPx) gibi nispeten zayıf anti-oksidan savunma mekanizmaları içermeleri nedeniyle oksidatif strese karşı oldukça savunmasızdırlar (Kim ve diğerleri, 2015; Ramalingam ve Kim, 2012). Ek olarak, eksitotoksik glutamat, periferik hasara duyarlı olan uzun aksonal morfoloji, nöral membranlar arasındaki yüksek Ca^{+2} giriş-çıkışı ve iyon taşınmasının etkileşimi sonucu oluşan hücre içi Ca^{+2} artışı da nöronlarda oksidatif strese neden olmaktadır (Sajjad ve diğerleri, 2019). Bununla birlikte, nöronlar bu strese farklı tipte tepki göstermektedir. Örneğin; entorinal korteks, hipokampus cornu ammonis (CA)1 bölgesi, frontal korteks ve amigdaladaki nöronlar AH ile ilişkili nörodejenerasyona en duyarlı nöron popülasyonlarıdır. AH'de ROS'un, bu hastalığın nöropatolojisinde anahtar rol

oynayan A β oligomer peptitleri ve Tau proteini üzerinde oksidatif değişikliklere neden olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Penke ve diğerleri, 2020; Zhao ve diğerleri, 2013; Chen, Na, Gu, Richardson ve Ran, 2008; Melov ve diğerleri, 2007; Senavong, Kongkham, Saelim ve Suangkavathin, 2016). Proteinlerde oluşan oksidatif stres ilişkili yanlış katlanma ve agregasyon; nöroinflamasyona, sinaptik bağlantıda bozulmaya, kolinerjik denervasyona, nörotransmitter dengesizliğine ve dendritik değişikliklere neden olarak nörodejenerasyonu indüklemektedir (şekil 2.2) (Singh ve diğerleri, 2019). AH beynindeki oksidatif stresin, proteinlerdeki oksidasyonun yanı sıra, azalmış anti-oksidan enzim seviyeleri, lipid peroksidasyonu, DNA oksidasyonu ve ileri glikasyon son ürünleri ile de kendini gösterdiği birçok çalışmada rapor edilmiştir (Chen, Guo ve Kong, 2012; Guglielmotto, Giliberto, Tamagno ve Tabaton, 2010). PH’de SN nöronlarının yüksek enerji ihtiyaçları, bu nöronları dejenerasyona karşı savunmasız hale getirir (Mamelak, 2018). ROS retimi tarafından indüklenen protein oksidasyonunun, PH beyninde biriken α -syn proteininin oligomerizasyonu ve toksisitesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Luk, 2019) (şekil 2.2). HH’de, striatum ve serebral korteks bölgesindeki nöronlar, ALS’de ise beyin, beyin sapı ve omurilikteki motor nöronları dejenerasyona karşı savunmasız nöronlardır (Gil ve Rego, 2008; Ragagnin, Shadfar, Vidal, Jamali ve Atkin, 2019). Yapılan bazı çalışmalarda oksidatif stresin HH’de mHtt agregasyonunu ve hücre ölümünü arttırdığı gösterilirken (Kumar ve Ratan, 2016), ALS’de TDP-43 ve SOD1 proteinlerinin agregasyonu aracılı nörodejenerasyonu indüklediği gösterilmiştir (Khan, Garg, Singh ve Kumar, 2018; Zuo ve diğerleri, 2021) (şekil 2.2). Ayrıca, AH’ye benzer şekilde PH, HH ve ALS’de proteine ek olarak diğer makromoleküllerde de oksidatif modifikasyonu bildiren birçok literatür bulunmaktadır (Niedzielska ve diğerleri, 2016; Radak, Zhao, Goto ve Koltai, 2011; Teleanu ve diğerleri, 2022). Dolayısıyla, spesifik beyin bölgelerinin çeşitli NH’lerde oksidatif strese karşı farklı tepkiler göstermesi, her bir hastalığın etiyolojisindeki özgünlükten kaynaklanmaktadır ve NH’lerin patolojisinde yer alan seçilmiş hücrelerin ortak bir savunmasızlığı paylaştığının kanıtıdır (Chen ve diğerleri, 2012).

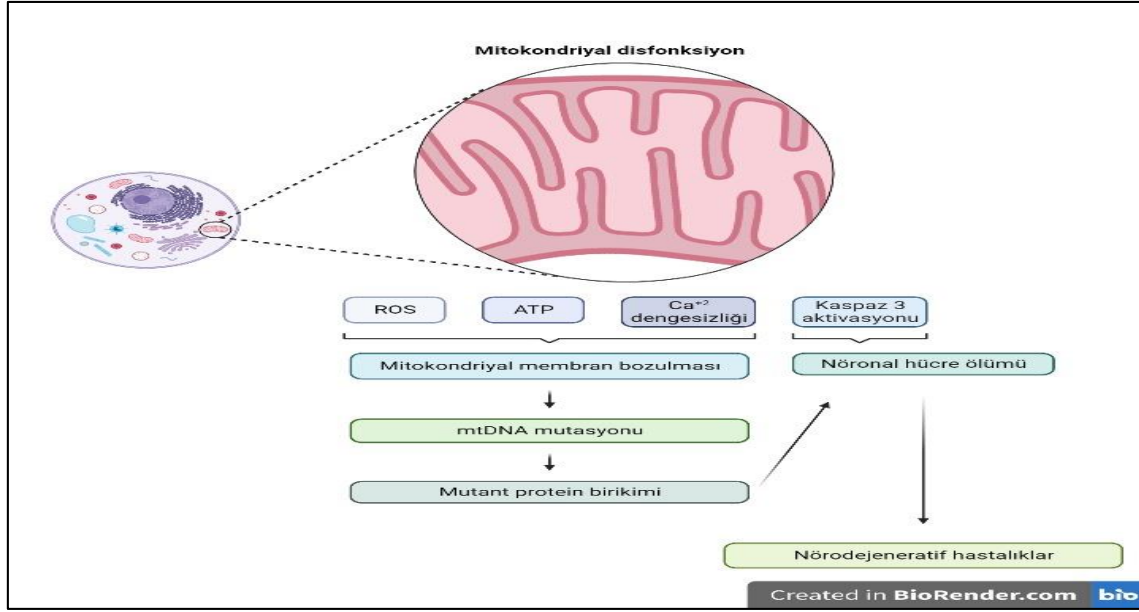


Şekil 2.2. Reaktif oksijen türleri/Reaktif azot türleri oksidatif stresi indükleyerek protein hasarına ve çeşitli nörodejeneratif hastalıklara neden olur (Singh ve diğerleri (2019)'dan yararlanılarak çizilmiştir).

2.3.2. Mitokondriyal disfonksiyon

Hücrenin enerji santrali olan mitokondri, oksidatif fosforilasyon, Ca^{+2} homeostazı, hücresel farklılaşma, intrinsik apoptotik yolak ve hücre ölümü de dahil olmak üzere çeşitli hücresel olayların yürütülmesinde yer alır ve bu nedenle nöronların işlevi ve hayatta kalmasında kilit sitoplazmik organeldir (Jellinger, 2010; Müller, Ahumada-Castro, Sanhueza, Gonzalez-Billault ve Cárdenas, 2018). Mitokondri, hücre içi ROS'un ana kaynağıdır ve özellikle oksidatif strese karşı savunmasızdır (Guo, Sun, Chen ve Zhang, 2013a). Nöronlar ise sitoskeletal yeniden şekillenme, aksonal ve dendritik büyüme, sinaptik veziküllerin aksonal taşınması ve sinaptik iletim gibi birçok işlev ile ilişkili enerji, sinyalizasyon ve Ca^{+2} homeostazında mitokondriye bağımlıdır ve mitokondrilerde meydana gelen disfonksiyon nörogelişimsel bozukluklara neden olmaktadır (Uittenbogaard ve Chiaramello, 2014; Wang ve diğerleri, 2021; Zhang ve diğerleri, 2023). Mitokondriyal disfonksiyon spektrumu çok geniştir ve solunum zinciri disfonksiyonu, oksidatif stres, azaltılmış adenosin trifosfat (ATP) üretimi, Ca^{+2} düzensizliği, mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneği (mtPTP)'nin açılması, mitokondriyal dinamiklerde pertürbasyon, düzensiz mitokondriyal klirensi ve sistein-aspartik proteaz (Kaspaz)-3 aktivasyonunu içerir (Baranov ve diğerleri, 2019; Gandhi ve

Abramov, 2012) (Şekil 2.3). Bununla birlikte, mitokondri disfonksiyonları mitokondriyal DNA (mtDNA) hasarı ve nöral disfonksiyona neden olur, nörotoksisiteyi indükleyebilir ve hücre ölümünü başlatabilir, tüm bunlar NH'lerin patogenezindeki önemli ve ortak özelliklerdir (Islam, 2017; Golpich ve diğerleri, 2017). NH'lerde hücre ölümünde mitokondriyal dış membranın güç kaybı ile, intrinsik apoptotik yolak aktive olur, bu da sitokrom-c ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) gibi mitokondriyal pro-apoptotik faktörlerin sitoplazmaya salınmasına neden olur. Artmış hücre içi Ca^{+2} seviyeleri ve ROS üretimi gibi stres sinyallerini takiben, apoptotik mekanizma B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) proteinleri tarafından yönetilir ve bu proteinler nörolojik bozuklukların mitokondriyal patolojisinde yer alır (Wu, Chen ve Jiang, 2019). AH'li ve transgenik fare modellerinin beyinlerinde, $A\beta$ 'nın mitokondriyal oksidatif hasara ve solunum komplekslerinin aktivitesinde bozulmaya neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, mitokondriyal kompleks I ve sitokrom-c-oksidad inhibitörüne bağlı olarak azalan hücre enerjisi, Tau fosforilasyonunu indükler, bu da mitokondriyal hasarın yumaklar ve nörodejenerasyon oluşumunda bir rol oynadığının kanıtıdır (Manczak ve diğerleri, 2006; Melov ve diğerleri, 2007). PH ile ilişkili birçok proteinde meydana gelen fonksiyonel bozukluğun hücrelerde hasarlı mitokondri birikimini indüklediği ve mutasyonlu proteinlere sahip nöronların mitokondriyal toksinlere karşı daha savunmasız olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, mtDNA delesyonları yaşlı ve PH'li beyinlerin SN'lerinde bulunan pigmentli nöronlarda tanımlanmıştır (Singh ve diğerleri, 2019). HH'de Ca^{+2} kaynaklı stres ve artan ROS yanıtının, mtDNA'ya hasar vererek mitokondriyal işlevselliği inhibe ettiği, bunun da mitokondriyal morfolojiyi ve oksidatif enerji metabolizmasını etkilediği raporlanmıştır (Muddapu ve diğerleri, 2020). Bunlara ek olarak, HH'de mHtt birikiminin mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna neden olduğu bilinmektedir (Kumari, Shekhar ve Tyagi, 2021). ALS hastalarında omurilik, sinir ve kaslardan alınan ölüm sonrası biyopsi örneklerinde solunum zinciri komplekslerinin aktiviteleri ile mitokondriyal yapı, sayı ve lokalizasyonda anormalliklerin varlığı bildirilmiştir. ALS'de mutant SOD1 (mSOD1)'in aşırı ekspresyonu, elektron taşıma zinciri aktivitelerinin bozulmasını, mitokondriyal Ca^{+2} yükleme kapasitesinin azalmasını ve anormal mitokondriyal ROS üretimini indükler ve mSOD1'in mitokondriye hedeflenmesi sitokrom-c salınımına ve apoptoza neden olur (Lin ve Beal, 2006).



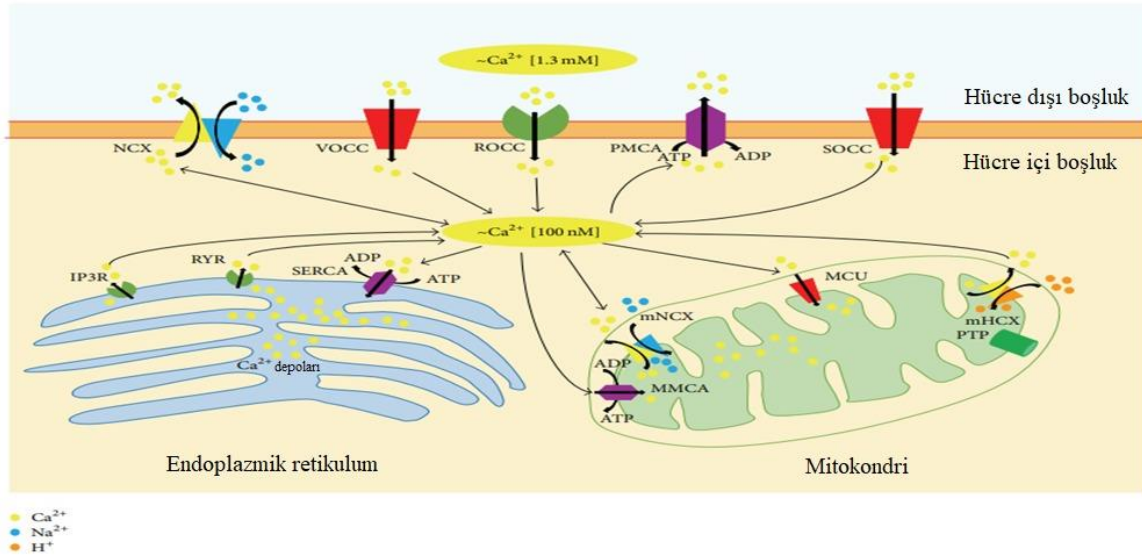
Şekil 2.3. Nörodejeneratif hastalıklarda mitokondriyal disfonksiyonun rolü (Wu ve diğerleri (2019)’dan yararlanılarak çizilmiştir).

2.3.3. Hücre içi kalsiyum homeostazının disregülasyonu

Hücre içi kalsiyum homeostazı

Kasılma, gen ekspresyonu ve transkripsiyonu, zar uyarılabilirliği, hücre büyümesi, proliferasyonu, farklılaşması, metabolizması, sağkalımı ve ölümü gibi çok çeşitli hücre fonksiyonlarını düzenleyen Ca^{+2} iyonları önemli ikinci habercilerdir (Pchitskaya, Popugaeva ve Bezprozvanny, 2018; Rossi, Pizzo ve Filadi, 2019). Bununla birlikte, sitozoldeki yüksek Ca^{+2} konsantrasyonları hücre hasarı ve hücre ölümünü indüklediği için sitotoksik olabilir (Diederich ve Ghibelli, 2010). Nöronlarda ise, Ca^{+2} çok sayıda farklı hücre fonksiyonunun düzenlenmesine ek olarak, sinaptik iletim, plastisite, aksiyon potansiyeli gibi temel nöral süreçlerden sorumlu bir sinyal molekülünü ve ayrıca öğrenme ve hafızanın altında yatan hücre fonksiyonlarını temsil eder (Ge ve diğerleri, 2022; Proft ve Weiss, 2015; Tong ve diğerleri, 2018). Hücre fonksiyonları için Ca^{+2} homeostazı nöral fizyolojinin birçok alanında önemli bir düzenleyicidir ve fizyolojik nöral koşullar altında elektriksel veya reseptör aracılı uyarılar, nöronlarda Ca^{+2} ’nin sitoplazmik konsantrasyonunda geçici artışlar şeklinde farklı Ca^{+2} sinyalleri üretir; bu, dinlenme halinde 50-300 nM arasında iken, aktivasyon üzerine 1-500 μM ’ye kadar değişebilir (Wojda, Salinska ve Kuznicki, 2008). Ayrıca, serbest Ca^{+2} iyonları, hücre dışı boşluğa (1–2 mM) kıyasla tipik olarak sitoplazmada (100–400 nM) düşük seviyelerde tutulur. Ca^{+2} konsantrasyonundaki bu kadar büyük bir fark, nörotransmitterlerin

salınımı, aksiyon potansiyelleri, hormon salgılanması ve gen ekspresyonu gibi sinyal olayları sırasında Ca^{+2} 'nin çeşitli Ca^{+2} kanallarından hücrelere girmesini sağlayan önemli hücre içi-hücre dışı elektrokimyasal gradyanla sonuçlanır (Kannurpatti, 2017). Bununla birlikte, normal beyin fonksiyonu için verimli tamponlama ve ekstrüzyon yoluyla nöral sitoplazmik Ca^{+2} homeostazının sürdürülmesi gerekir ve nöral Ca^{+2} homeostazının sürdürülmesi oldukça karmaşık bir süreçtir (Anekonda ve Quinn, 2011; Kannurpatti, 2017). Bu süreç, hem plazma zarında hem de mitokondri ve endoplazmik retikulum (ER) zarlarında bulunan çeşitli reseptörler, iyon kanalları, pompalar, Ca^{+2} bağlayıcı proteinler, transkripsiyonel ilişkiler ve iyon değiştiriciler gibi Ca^{+2} 'yi kontrol eden çok sayıda kontrol noktasını içerir (Zündorf ve Reiser, 2011). Plazma zarından hücresel Ca^{+2} akışına büyük ölçüde reseptörle çalışan Ca^{+2} kanalları (ROCC), voltajla çalışan Ca^{+2} kanalları (VOCC), depoyla çalışan Ca^{+2} kanalları (SOCC) ve istisnai durumlarda $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ değiştirici (NCX) aracılık etmektedir. Ca^{+2} ayrıca inositol-1,4,5-trifosfat (IP3R) ve ryanodin reseptörleri (RyR) yoluyla ER'den sitoplazmaya salınabilmektedir. Spesifik olarak plazma membran Ca^{+2} pompası (PMCA), NCX ve sarkoendoplazmik retikulum Ca^{+2} ATPaz (SERCA) fizyolojik Ca^{+2} seviyelerinin geri kazanılmasına katılmaktadır (Şekil 2.4) (Magi ve diğerleri, 2016).



Şekil 2.4. Hücre içi kalsiyum homeostazı. Hücre içi kalsiyumun fazlası, mitokondriyal kalsiyum uniporter (MCU) yoluyla mitokondri tarafından da alınabilir. mNCX: mitokondriyal NCX; mHCX: mitokondriyal hidrojen/kalsiyum değiştirici, PTP: geçirgenlik geçiş gözenağı; MMCA: mitokondriyal membran kalsiyum ATPaz (Magi ve diğerleri (2016)'nın izni ile kullanılmıştır).

Şekil 2.4’de de açıklandığı gibi hücre içi Ca^{+2} homeostazında, plazma zarından hücreSEL Ca^{+2} akışına aracılık eden mekanizmalardan biri VOCC’ler veya voltaj-kapılı Ca^{+2} kanallarıdır (VGCC).

Voltaj-kapılı kalsiyum kanalları

VGCC’ler, elektriksel olarak uyarılabilir hücrelerde zarın depolarizasyonundan sonra hücreye Ca^{+2} girişinin ana yoludur (Heck ve diğerleri, 2021; Schampel ve Kuerten, 2017). VGCC’lerin aktivasyonu, elektrokimyasal gradyan ile Ca^{+2} akışını indükler, bu da sitoplazmik Ca^{+2} konsantrasyonuna bağlı enzim aktivasyonunun, nörotransmitter salınımının, nörit büyümesinin, hormon salgılanmasının ve diğer Ca^{+2} ’ye bağlı süreçlerin indüklenmesiyle sonuçlanır (Ureshino ve diğerleri, 2019). VGCC’ler biyofiziksel ve farmakolojik özelliklerine göre yüksek voltajla aktive edilen Ca^{+2} kanalları (HVA veya L, N, P/Q, R-tipi Ca^{+2} kanalları) ve düşük voltajla aktive edilen Ca^{+2} kanalları (LVA veya T-tipi Ca^{+2} kanalları) olarak sınıflandırılır. Moleküler temelde ise, VGCC özellikleri taşıyan on farklı α_1 alt birimi tanımlanmıştır ($\text{Ca}_v\alpha_1$ alt birimi Ca^{+2} kanal alt tipini belirler): $\text{Ca}_v1.1$, $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$ ve $\text{Ca}_v1.4$ (L-tipi kanallar), $\text{Ca}_v2.1$ (P/Q kanalları), $\text{Ca}_v2.2$ (N-tipi), $\text{Ca}_v2.3$ (R-tipi) ve $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ ve $\text{Ca}_v3.3$ (T-tipi kanallar) (Belardetti ve Zamponi, 2012; Warnier, Gackière, Roudbaraki, Mariot, 2016). Bu kanalların ayrıntılı açıklamaları Çizelge 1’de verilmiştir. L-tipi VGCC’ler, nöronlardan ekzositotik salımda yer alırlar ve L-tipi kanalların hücre soma ve dendritleri üzerindeki lokalizasyonu da bu kanalları gen ekspresyonunun düzenlenmesine dahil etmektedir (Snutch, Peloquin, Mathews ve McRory, 2005: 1-346). Memeli beyinde $\text{Ca}_v1.2$ ve $\text{Ca}_v1.3$ kanalları, aktiviteye bağlı gen transkripsiyon işlemlerini destekledikleri L-tipi Ca^{+2} akımını açıklayan en belirgin VGCC’lerdir. L-tipi kanalların beyin fonksiyonlarındaki etkisi, çeşitli sinaptik plastisiteye, öğrenme ve hafıza süreçlerine katkılarıyla en iyi şekilde örneklenmiştir (Proft ve Weiss, 2015). P/Q-, N- ve R-tipi VGCC’ler ise, sinaptik iletimin başlatılması ve nörotransmitter salımı için gerekli dendritik Ca^{+2} geçişinde etkili iken, T-tipi VGCC nöral uyarımın düzenlenmesinde etkilidir. Ayrıca, bazı kanıtlar T-tipi kanalın ekzositoza katkıda bulunabileceğini ve spontan sinaptik iletimi içerebileceğini de göstermiştir (Tong ve diğerleri, 2018).

Çizelge 2.1. Voltaj-kapılı kalsiyum kanallarının sınıflandırılması

Özellik	Aile	Alt tip	Gen (α_1 için)	Tip	Dağılım/İşlev	İlişkili olduğu NH'ler	Kaynak
Yüksek voltajla aktive edilen kanallar	Ca _v 1	Ca _v 1.1	α_{1S}	L-tipi (uzun süreli)	Nöronlar, kas hücreleri, bez hücreleri, fibroblast, astrositler, kalp, adrenal kromafin, glial hücreler/Kas kasılması, hormon salgılanması, sinaptik plastisite, nörotransmitter salınımı.	AH, PH, HH, ALS	(Meszlényi, Ptai, Nógrádi, Engelhardt ve Siklós, 2017; Miranda ve diğerleri, 2019; Saravanaraman, Chinnadurai ve Boopathy, 2014; Dolphin, 2016; Wojda ve diğerleri, 2008)
		Ca _v 1.2	α_{1C}				
		Ca _v 1.3	α_{1D}				
		Ca _v 1.4	α_{1F}				
	Ca _v 2	Ca _v 2.1	α_{1A}	P/Q-tipi (purkinje)	Serebellumun Purkinje nöronları-serebellar granül nöronları/Nöral uyarım, nörotransmitter salınımı.	AH, PH, HH, ALS	(Dolphin, 2016; Gonzalez ve diğerleri, 2011; Matlahov ve van der Wel, 2019; Nimmrich ve Gross, 2012; Saravanaraman ve diğerleri, 2014; Sgobio ve diğerleri, 2019)
		Ca _v 2.2	α_{1B}	N-tipi (nöral)	Nöronlar (sempatik ve myenterik pleksus nöronları)/Nörotransmitter salınımı, norepinefrin salınımı.	AH, PH, HH, ALS	(Dolphin, 2016; Meszlényi ve diğerleri, 2017; Miranda ve diğerleri, 2019; Saravanaraman ve diğerleri, 2014; Sgobio ve diğerleri, 2019)
		Ca _v 2.3	α_{1E}	R-tipi (resistant)	Nöronlar, kalp, hipofiz/Nörotransmitter salınımı, nörosekresyon.	AH, PH, HH	(Benkert ve diğerleri, 2019; Dolphin, 2016; Page, 2013; Pang ve diğerleri, 2019; Saravanaraman ve diğerleri, 2014; Schampel ve Kuerten, 2017)
Düşük voltajla aktive edilen kanallar	Ca _v 3	Ca _v 3.1	α_{1G}	T-tipi (kısa süreli)	Kas hücreleri, nöronlar, bez hücreleri, fibroblast, astrositler, kalp, lenfositler, glial hücreler/Kalp ve nöronlarda pacemaker aktivite.	AH, PH, ALS	(Dolphin, 2016; Fukunaga ve diğerleri, 2019; Park, Kim ve Kim, 2013; Saravanaraman ve diğerleri, 2014; Stringer ve diğerleri, 2020)

Hücre içi kalsiyum homeostazının disregülasyonu ve nöral hasar

Hücre içi Ca^{+2} homeostazının disregülasyonu, nörodejenerasyonda merkezi bir süreçtir; bu süreç Ca^{+2} tamponlamanın düzensizliği, Ca^{+2} kanallarının ekspresyonu ve/veya aktivitesindeki değişiklikler ve eksitotoksisite, mitokondriyal ve/veya ER Ca^{+2} depolama kapasitesinin düzensizliği, bozulmuş enerji metabolizması ve oksidatif stres nedeniyle diğer Ca^{+2} düzenleyici proteinlerin değişiklikleri gibi birçok farklı mekanizma ile ilişkilidir (Gleichmann ve Mattson, 2011; Nimmrich ve Eckert, 2013; Zündorf ve Reiser, 2011). Aşırı hücre içi Ca^{+2} yükü, kaspaz aktivasyonu aracılı apoptotik veya nekrotik nöral ölümüne neden olur. Ayrıca, Ca^{+2} doğrudan hücre ölümüne ve doku hasarına neden olan proteazlar, fosfolipazlar ve nükleazlar gibi katabolik enzimleri de aktive ederek nöral ölümü indükler (Berliocchi, Bano ve Nicotera, 2005). Dolayısıyla, Ca^{+2} disregülasyonuna dahil olan bu mekanizmalar birçok NH'nin moleküler patogenezinde ve patofizyolojisinde yer almaktadır (Jadiya, Garbincius ve Elrod, 2021; Schrank ve diğerleri, 2020). Sürece dahil olan mekanizmalardan özellikle oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon merkezi bir role sahiptir. ROS ve Ca^{+2} sinyali arasındaki etkileşimler çift yönlü olarak kabul edilebilir; ROS hücre içi Ca^{+2} sinyalini düzenleyebilir, Ca^{+2} sinyali ise ROS üretimi için gereklidir (Gordeeva, Zvyagilskaya ve Labas, 2003). Aşırı ROS üretimi (oksidatif stres) hücre içi Ca^{+2} sinyalleme sisteminin düzensizliğine yol açar ve bu tür düzensizlik, anormal Ca^{+2} seviyelerinin apoptotik veya nekrotik kaskadı indükleyen çoklu yolları uyarmasına neden olurken, artan Ca^{+2} seviyeleri ROS üreten enzimleri ve serbest radikal oluşumunu aktive eder (Barnham, Masters ve Bush, 2004), Zhang, Kang, Chen, Green ve Chen, 2013). Mitokondriyal disfonksiyon ise, oksidatif stres ve bozulmuş Ca^{+2} homeostazını birbirine bağlamaktadır (Jara, Torres, Olesen ve Tapia-Rojas, 2020: 1-124). Ca^{+2} tarafından indüklenen mitokondriyal morfolojideki değişiklikler, ağırlıklı olarak ROS aracılı yeniden şekillenme yoluyla meydana gelir (Dehesi, Dabiri, Fan, Tsang ve Rintoul, 2015). Mitokondride aşırı Ca^{+2} birikimi, PTP oluşumuna ve transmembran potansiyelinin azalmasına neden olarak, sitokrom-c ve apoptoz salınımını tetikler. Aşırı Ca^{+2} sinyalleri ayrıca yapısal ve enzimatik proteinlerin bozulmasına yol açan Ca^{+2} bağlayıcı kalpain proteazlarını doğrudan aktive edebilir. Bununla birlikte hücre ölümü, yalnızca hızlı bir şekilde değil, aynı zamanda Ca^{+2} homeostazında uzun süreli hafif değişikliklerden sonra da başlatılabilir (Wojda ve diğerleri, 2008). Hücre içi Ca^{+2} homeostazının disregülasyonunda etkili olan bir diğer mekanizma, Ca^{+2} kanallarının ekspresyonu ve/veya aktivitesindeki değişikliklerdir (Kumar, Bodhinatham ve Foster, 2009; Zündorf ve Reiser, 2011). NH'lerde iyon güdümlü ATPazlar,

glukoz ve glutamat taşıyıcılarındaki fonksiyon bozuklukları aksonlar üzerinde yer alan Ca^{+2} kanallarının açılmasına, kanalların açılması ise aşırı miktarda hücrel Ca^{+2} akışına neden olmaktadır (Anekonda ve Quinn, 2011; Boczek ve diğerleri, 2012). Bu kanallardan özellikle MSS’de ifade olan L-tipi ve P/Q-tipi VGCC’lerdeki işlev bozukluklarının çeşitli NH’lerde kritik bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (Anekonda ve Quinn, 2011; Nimmrich ve Gross, 2012; Proft ve Weiss, 2015).

AH’de erken dönemde meydana gelen, presenilin (PSEN) mutasyonları, A β üretimi ve Tau fosforilasyonu ile ilişkili Ca^{+2} disregülasyonu, hastalıkla ilişkili demansın altında yatan sinaptik ve nöral disfonksiyona yol açar (Jellinger, 2010). PSEN’lerin kendilerinin ER Ca^{+2} sızıntı kanalları olarak işlev gördüğü ve PSEN’lerdeki birçok mutasyonunun ER Ca^{+2} sızıntı işlevinin kaybıyla sonuçlanarak ER Ca^{+2} aşırı yüklenmesine ve ER’den normal üstü Ca^{+2} salınımına yol açtığı rapor edilmiştir (Bezprozvanny, 2009). A β peptitleri plazma zarında Ca^{+2} geçirgen gözenek oluşturarak ve NMDAR’yi aşırı aktive ederek hücre içi Ca^{+2} seviyesini arttırmaktadır (Pchitskaya ve diğerleri, 2018). A β ’nın çeşitli hücrel modellerde L-tipi VGCC’leri aktivasyonu yoluyla Ca^{+2} akışını uyararak spontan sinaptik aktiviteyi engellediği, P/Q tipi Ca^{+2} akımını ise doğrudan arttırarak eksitotoksik nörodejenerasyona yol açabileceği bildirilmiştir (Nimmrich ve Gross, 2012; Ureshino ve diğerleri, 2019). A β_{25-35} ’in rat kortikal nöronlarında $\text{Ca}_v1.2$ ekspresyonunu, insan embriyonik böbrek 293 hücreleri (HEK293)’te $\text{Ca}_v1.3$ ekspresyonunu, hipokampal nöronlarda ise hem $\text{Ca}_v1.2$ hem de $\text{Ca}_v1.3$ ekspresyonunu arttırdığı raporlanmıştır (Kim ve Rhim, 2011). Kaspazla-bölünmüş Tau ifadesi ise, AH beyinlerinde artan kalsinörin (Ca^{+2} /kalmodulin (CAM) bağımlı protein fosfataz), aktivitesi yoluyla kortikal nöronlarda mitokondriyal işlev bozukluğu ile sonuçlanır (Jellinger, 2010; Sompol ve Norris, 2018). AH’de Ca^{+2} ilişkili mitokondriyal disfonksiyon sonucu ROS oluşumunun arttığı bildirilmiştir (Gandhi ve Abramov, 2012). Ayrıca, ROS’un da, sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunu artırarak Ca^{+2} bağımlı enzimleri aktive ettiği, bunun da lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi hücrel bileşenlerde hasara neden olarak nekroz veya apoptoz yoluyla hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (Xiao ve diğerleri, 2008). PH’de Ca^{+2} homeostazının bozulması, α -syn’nin agregasyonuna ve anormal salgılanmasına neden olmaktadır. α -syn’nin de plazma zarı ile etkileşiminin, zar geçirgenliğini etkileyerek Ca^{+2} akışını indüklediği bildirilmiştir (Leandrou ve diğerleri, 2019). Bununla birlikte, PH’de SN’lerdeki DA nöronların hasarına L-tipi VGCC’lere ek olarak, plazma zarındaki ve hücre içi organellerdeki çeşitli diğer Ca^{+2} kanalları ve Ca^{+2} taşıyıcılarının neden olduğu rapor edilmiştir (Liss ve Striessnig, 2019). HH’de mHtt Ca^{+2} akışının artışı indükleyen

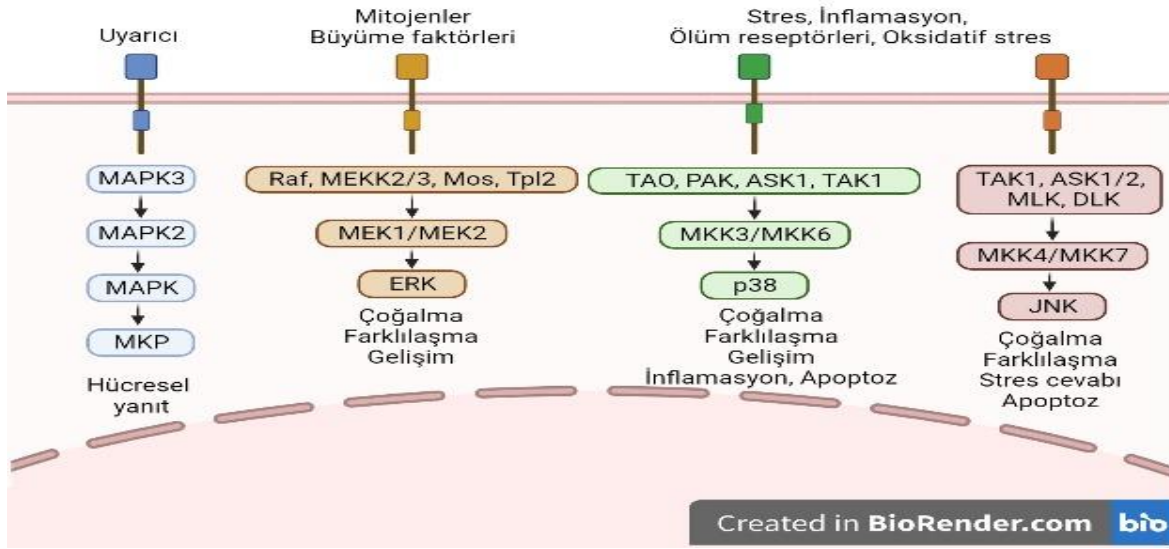
NMDAR'lerin duyarlılaşmasında rol oynamaktadır (Sun, Savanenin, Reddy ve Liu, 2001). NMDAR üzerindeki etkilerin yanı sıra, mHtt doğrudan IP3R ve VGCC'ye bağlanmaktadır, bu da ER depolarından Ca^{+2} salınımını arttırır (Pchitskaya ve diğerleri, 2018). Ayrıca, HH'li farelerden alınan kortikal nöronlarda L-tipi Ca^{+2} akımlarında önemli bir artış olduğu ve HH nöronlarına VGCC yoluyla daha fazla Ca^{+2} girişinin olduğu bildirilmiştir (Vigont ve diğerleri, 2021). ALS'de ise, Ca^{+2} -geçirgen α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropiyonik asit reseptörü (AMPA) ve NMDAR tarafından Ca^{+2} akışı, mitokondriyal Ca^{+2} aşırı yüklenmesi, mitokondriyal şişme, mtPTP'lerin açılması ve motor nöronların apoptozisi ile sonuçlanır (Bezprozvanny, 2009). Reseptörlere ek olarak, VGCC'ler yoluyla da motor nöronlara Ca^{+2} akışı meydana gelir ve VGCC'deki fonksiyonel bozukluk ALS patolojisinde rol oynar (LoRusso, Hickman ve Guo, 2019). Ayrıca, mSOD1'in motor nöronların mitokondrilerine bağlanarak, bu hücrelerin Ca^{+2} yükünü idare etme yeteneklerini bozduğu bilinmektedir (Bezprozvanny, 2009).

2.3.4. Mitojenle aktifleştirilen protein kinaz sinyal yolaklarının aktivasyonu

Mitojenle aktifleştirilen protein kinaz sinyal yolakları

Hücrelerde (ökaryotik) ana sinyalizasyon sistemlerinden biri olan ve çeşitli uyarılara cevap olarak hücre zarından çekirdeğe sinyalleri ileten, büyük ölçüde korunmuş MAPK yolağı yer almaktadır (Ellis, Davila ve Chakrabarti, 2003; Huang ve diğerleri, 2022; Wada ve Penninger, 2004). MAPK'ler, gen ekspresyonu, mitoz (M), metabolizma, hücre proliferasyonu, farklılaşması, sağkalımı, hareketi, apoptozu ve ölümünü içeren çeşitli hücresel aktiviteler ile ilişkili intraselüler sinyallere aracılık eden serin/treonin (Ser/Thr) kinazlardır (Wada ve Penninger, 2004; Cargnello ve Roux, 2011). MAPK yolakları dizin benzerliğine, öncesindeki regülasyonun mekanizmalarına ve daha düşük bir ölçüde de, substrat spesifitesine göre pek çok alt gruba ayrılabilir; en iyi karakterize edilmiş olan üçü, ERK, JNK ve p38 kinazdır. JNK ve p38 iki ana stresle aktive olan protein kinaz (SAPK) olarak da bilinir (Harper ve Wilkie, 2003; Zhu, Lee, Raina, Perry ve Smith, 2002). Bu enzimlerin her birinin birçok izoformu mevcuttur: ERK1 - ERK8; JNK1 - JNK3; ve p38- α , - β , - gama (γ) ve - delta (δ) (Cargnello ve Roux, 2011). MAPK yolakları, büyüme faktörleri, sitokinler ve hücresel stres dahil olmak üzere çeşitli hücre uyarıları tarafından aktive edilebilir; bu, MAPK kinaz kinazlar (MAP3K'ler)'i tarafından Ser/Thr rezidüleri üzerindeki MAPK kinazlar (MAP2K'ler)'in fosforilasyonu ile başlayan bir dizi ardışık fosforilasyon

olaylarına neden olur (Şekil 2.5) (Low ve Zhang, 2016). Daha sonra, MAPK’lerde bulunan TXY amino asit motifini tanıyan MAPK fosfatazlar (MKP’ler)’i, MAPK’lerin fosforilasyonunu devre dışı bırakır (Son ve diğerleri, 2011). Buna göre, MAPK sinyal yolları hücre fizyolojisini düzenlemek için işbirliği içinde çalışan hücresel reseptör sinyalleme sisteminin aşağı akış hedefidir. Üç katmanlı MAPK modülünün yapısal ve işlevsel organizasyonuna scaffold proteinleri aracılık etmektedir (Dhanasekaran, Kashef, Lee, Xu ve Reddy, 2007; Low ve Zhang, 2016).



Şekil 2.5. Mitojenle aktive edilen protein kinaz sinyal yolları (Low ve Zhang (2016)’dan yararlanılarak çizilmiştir).

Genel olarak, ERK yolağı büyüme, farklılaşma ve gelişme ile ilgiliyken, JNK ve p38 MAPK yolları ise inflamasyon, apoptoz, büyüme ve farklılaşma ile ilgilidir (Low ve Zhang, 2016). MSS’de ise, ERK1/2 yetişkin beyinde bol miktarda bulunur ve aktivasyonu, nöral fonksiyonun aktiviteye bağlı düzenlenmesinde birden fazla rol oynayabilir. ERK1/2 sinyali sinir sisteminde nöroinflamasyon, nöral ölüm, öğrenme ve hafıza oluşumu ve sinaptik plastisitenin düzenlenmesinde, dolayısıyla MSS’nin gelişiminde etkilidir (Sun ve Nan, 2017). MSS’deki JNK sinyali diğer dokularla karşılaştırıldığında oldukça aktiftir, bu da JNK’lerin fizyolojik ve patolojik koşullar altında MSS hücrelerinin kritik bir düzenleyicisi olduğunu göstermektedir (de los Reyes Corrales, Losada-Pérez ve Casas-Tintó, 2021). JNK’ler, hücre göçü, nörit oluşumu ve büyümesi ve yaralanmadan sonra sinir liflerinin rejenerasyonu gibi beyin gelişimi ve morfogenezinde geniş kapsamlı fonksiyonel rollere sahip birçok nükleer olmayan substratı aktive etmektedir. Ayrıca, JNK sinyal yolağı, akso-

dendritik yapının oluşumunda ve stabilizasyonunda rol oynar, böylece nöral polariteye katkıda bulunur (Schellino, Boido ve Vercelli, 2019). p38 MAPK, inflamatuvar sitokinler ve ROS gibi stres uyarıcılarına cevap veren bir MAPK sınıfıdır. Birçok çalışma, p38 MAPK'nin kronik inflamasyonda merkezi bir rol oynadığını göstermiştir. p38 kinazlar, nöronlarda sinaptik gelişim ve sinaptik yapışma molekülü ekspresyonu, sinapslarda sinyal iletimi, aksonal sinyalleşme, nöral hücre iskeleti proteinlerinin ve işlemlerinin düzenlenmesi, nörotoksik sinyalleme, nörotoksisite, nöral farklılaşma ve transdiferansiyasyonun kontrolünde görevlidir. (Asih ve diğerleri, 2020; Lee ve Kim, 2017).

Mitojenle aktive edilen protein kinaz sinyal yollarının aktivasyonu ve nöral hasar

Moleküler düzeyde artan veriler, MAPK sinyal yollarının sıkı kontrolünden sapmanın, NH'lerin patogenezelemlerinin farklı aşamalarıyla bağlantılı olabileceğini göstermektedir (Kim ve Choi, 2015; Raffaele, Silvestro ve Mazzon, 2023). MAPK yolları, hem reseptör ligand etkileşimlerinden hem de hücre üzerine yerleştirilen farklı stresörlerden etkilenmektedir. MAPK yollarının aktivasyonunu indükleyen bir stres türü, aşırı ROS'un neden olduğu oksidatif strestir. Genel olarak, bir hücrede artan ROS üretimi, ERK, JNK veya p38 MAPK'lerin aktivasyonuna ve nöral hücre ölümüne aracılık eder eder (Son ve diğerleri, 2011; Song ve diğerleri, 2016).

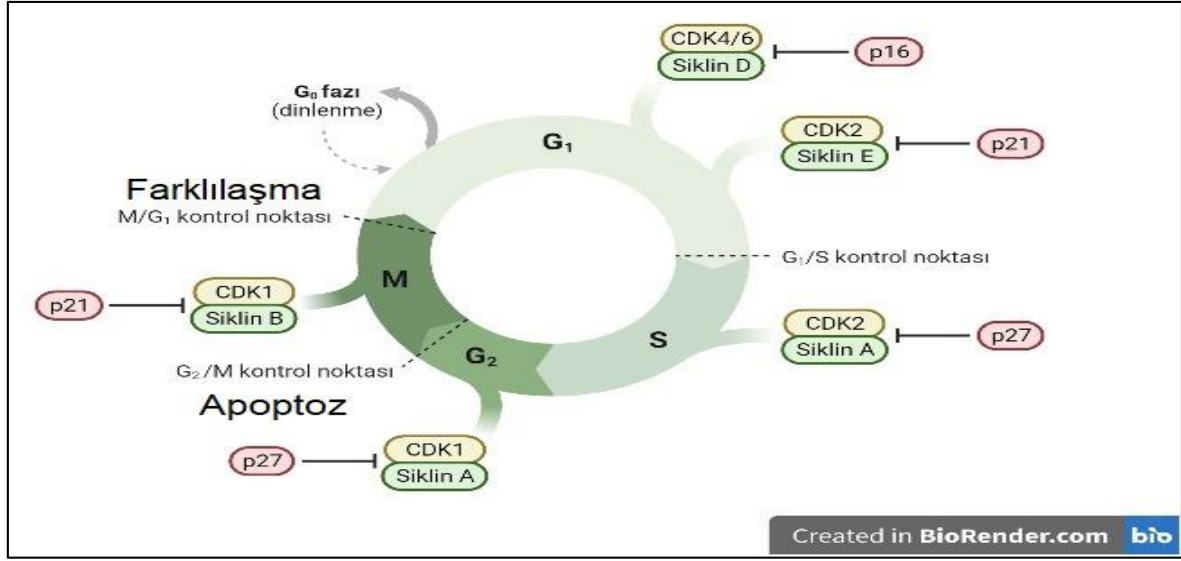
AH'de ERK'nin uyarılması, hem APP'nin hem de Tau'nun kontrolsüz fosforilasyonu ile sonuçlanır. AH hastalarından alınan beyin örneklerinde, Ras'da bir artış ve APP ile Tau'da fosforilasyon olduğu, bunun da A β indüklü Ras-MAP kinaz sinyalleşmesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Dolayısıyla, bu sürekli geribildirim mekanizması, nörodejenerasyon yoluyla AH'de gözlenen nöral ölümü uyarır (Kirouac, Rajic, Cribbs ve Padmanabhan, 2017). ROS tarafından tetiklenen oksidatif stres, AH'de JNK ve p38 sinyal yollarının tipik bir aktivatörüdür. Bu kinazlardan özellikle p38 MAPK'ler, AH'de astrositlerde aktivasyona, mikrogliyalardan ise fazla sitokin salınımına neden olarak nöroinflamasyonu indükler (Asih ve diğerleri, 2020; Lee ve Kim, 2017). Aktive edilen MAPK sinyal yollarının, AH patogenezelemlerine, nöral apoptoz ve nöroinflamasyonun indüksiyonu, β - ve γ -sekretazların transkripsiyonel ve enzimatik aktivasyonu ve ayrıca APP'nin JNK tarafından fosforilasyonu ve stabilizasyonu dahil çeşitli mekanizmalar yoluyla katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Ayrıca, Tau'nun fosforilasyonuna ERK'ye ek olarak JNK ve p38 kinazlarının da aracılık ettiği gösterilmiştir (Chang ve diğerleri, 2018; Kim ve Choi, 2010). Diğer taraftan,

MAPK'nin Tau'yu doğrudan fosforile edemeyeceği, bunun yerine L-tipi VGCC'yi aktive ederek, diğer Ca^{+2} bağımlı kinazlar tarafından Tau fosforilasyonunu indükleyebileceğine dair bilgiler de rapor edilmiştir (Ekinci, Malik ve Shea, 1999). MAPK sinyal yolları, PH patogenezinde α -syn agregatları, parkin veya protein deglikaz-1 (DJ-1)'deki fonksiyonel eksiklikler tarafından tetiklenen nöroinflamatuvar tepkilere ve nöral ölüme neden olur (Kim ve Choi, 2010). Özellikle, α -syn'nin insan mikrogial hücrelerinde p38, ERK ve JNK yollarını aktive ederek inflamasyonu indüklediği, bunun da IL-1 β ve TNF- α üretimi ile sonuçlandığı rapor edilmiştir (Albert-Gascó, Ros-Bernal, Castillo-Gómez ve Olucha-Bordonau, 2020). JNK ve p38'in aktivasyonu birçok HH modelinde gösterilmiştir ve birincil olarak nörotoksisite ile ilişkilidir, buna karşın artan ERK aktivitesi, HH'de nöroprotektif etki ilişkilendirilmiştir (Ekinci ve diğerleri, 1999). Ayrıca, HH patogenezinde MKP-1'in, ERK'nin aktivitesini korurken JNK ve p38'in ikili inhibisyonunu sağladığı, böylece koruyucu MAPK sinyalleme mekanizmaları ile toksik MAPK aracılı etkilerin engellenmesi arasında bir denge sağladığı gösterilmiştir (Taylor ve diğerleri, 2013). ALS'de ise ERK'nin anormal fosforilasyonu veya hiperaktivasyonu hastalığın patogenezi ile ilişkilidir. Transgenik farelerden ve hasta dokularından alınan motor nöronlar, ERK aktivasyonu gösterir. ALS'de p38 yolağı motor nöronlarda, mikrogiallarda ve astrositlerde aktive edilir (Sahana ve Zhang, 2021). p38'in kalıcı aktivasyonunun, SOD1'in G93A mutantını eksprese eden transgenik farelerde motor nöronların dejenerasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, hem p38 hem de JNK1, anormal fosforilasyon ve bunun sonucunda nörofilamentlerin toplanması yoluyla ailesel ve sporadik ALS'nin bir özelliği olan spinal motor nöronların sitoskeletal anormalliklerinde de rol oynar (Kim ve Choi, 2010).

2.3.5. Nöral hücre döngüsünün disregülasyonu

Hücre döngüsü, genetik materyalin kopyalanmasını sağlayan dolayısıyla ökaryotik hücrelerin gelişimi, farklılaşması ve çoğalmasında önemli organize bir dizi hücresel olaydır (Joseph ve diğerleri, 2020; Wang ve diğerleri, 2009). Hücre döngüsü tipik olarak dört aşamaya ayrılır: G1, S (DNA replikasyonu), G2 ve mitotik (M) (mitoz/karyokinez ve sitokinez) fazıdır (Lee ve diğerleri, 2009b; Wang, 2021). Spesifik hücre döngüsü kontrol noktaları (G1/S, G2/M ve kromozomların hücrenin merkezine toplanmasını denetleyen kontrol noktası) hücrenin bu çeşitli aşamalar boyunca ilerlemesini düzenler (Swift ve Golsteyn, 2016: 373-389). Döngü boyunca ilerleme, bir grup düzenleyici protein, siklin ve siklin bağımlı kinaz (CDK)'ler tarafından kontrol edilir (Poon, 2016). Diğer hücre tiplerinde

olduğu gibi, nöral sistemdeki hücre döngüsü sıkı bir şekilde düzenlenir (Klein ve Ackerman, 2003). Buna göre, fizyolojik koşullarda nöral öncü hücreler, hücre döngüsünün G1, S, G2 ve M fazlarından geçerek, olgun nöronlara farklılaşabilen erken progenitör hücreleri sağlar. Bununla birlikte, G0 fazındaki hareketsiz nöron, patolojik koşullar altında hücre döngüsüne yeniden girebilir. Bu hücre daha sonra interfazdaki tüm farklı fazlar boyunca ilerler, ancak G2'nin sonunda engellenir. Bu tetraploid hücreler M fazına geçmek yerine apoptoza uğrayabilir (Joseph ve diğerleri, 2020) (Şekil 2.6). Dolayısıyla, nöronlar bir kez terminal olarak farklılaştıklarında, hareketsiz bir G0 durumunda tutulurlar ve artık döngü yapmazlar (Klein ve Ackerman, 2003). Buna rağmen, nöronların sağlıklı beyinde bile hücre döngüsüne yeniden girebileceği, hücre döngüsündeki G1/S geçişini engelleyen düzenleyici mekanizmalar ile G1 fazının ötesine geçemediği bilinmektedir. Nöronlarda bol miktarda eksprese edilen Bcl-2 varlığında, döngünün bu aşamasından farklılaşmış duruma (yeniden farklılaşma) dönüş mümkündür. Alternatif olarak nöronlar, beyin yaşlanmasına eşlik eden ve orta derecede hücre kaybına neden olan apoptoza uğrayabilir (Nagy, 2000). Diğer taraftan, G1/S düzenleyici mekanizma AH ve diğer NH'lerde işlevsizdir ve bu hastalıklarda nöral hücre döngüsünün G2 fazına kadar ilerlemesine izin verilmektedir. Bu aşamadaki nöronlar mitoz geçirip hücre döngüsünü tamamlayamadıklarından, bu hücreler apoptoz yoluyla ölebilir veya NH'ler ile ilgili patolojiler üretebilirler (Song ve diğerleri, 2012; Wang ve diğerleri, 2009). Dolayısıyla, A β , fosforile edilmiş (p)-Tau, α -syn, poliglutamin-genişletilmiş Htt, TDP-43 ve C9orf72 proteinlerinin nörotoksik patolojik birikimi, farklılaşmış nöronlarda anormal hücre döngüsü aktivasyonu ile ilişkilidir. Nöronlarda hücre döngüsü düzensizliğinin neden olduğu kronik nöral bozulma, beynin çeşitli bilişsel, davranışsal, motor ve düzenleyici işlevlerini engelleyebilir (Joseph ve diğerleri, 2020).



Şekil 2.6. Sağlıklı ve dejenere nöronlarda hücre döngüsünün şematik gösterimi (Joseph ve diğerleri (2020)’den yararlanılarak çizilmiştir).

NH’lerde tüm bu süreçlerde etkili hücre döngüsü anormalliklerinin, oksidatif stres ile moleküler düzeyde bağlantılı olduğu bilinmektedir (Langley ve Ratan, 2004; Lee ve diğerleri, 2009b; Requejo-Aguilar, 2023). Aşırı ROS, mitokondriyal disfonksiyonu indükleyerek ATP üretimini olumsuz etkiler, Ca^{+2} homeostazını bozar, apoptotik yolları aktive eder ve hücrelerin G₁’den S fazına geçişini önleyen G₁/S hücre döngüsü kontrol noktasında hücre döngüsü defektlerine neden olur. Ayrıca, oksidatif stresin MAPK, nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) ve büyüme faktörü reseptörleri gibi aşağı akış transkripsiyon faktörlerini uyararak mitoz sonrası nöronlarda hücre döngüsü yeniden girişini başlattığı bildirilmiştir (Joseph ve diğerleri, 2020; Moh ve diğerleri, 2011). AH’de nöral hücre döngüsünün G₁’de tutuklanmadığı ve nöronların yeniden farklılaşmanın mümkün olmadığı G₂ aşamasına kadar ilerlediği rapor edilmiştir. Yüksek düzeyde Bcl-2 ilişkili X (Bax) ifade eden nöronlarda G₂ tutuklaması apoptoza neden olur. Bununla birlikte, apoptoz uyumlu olmayan nöral popülasyonlarda, uzun süreli bir G₂ tutuklaması, AH tipi patolojinin gelişmesine yol açabilir (Nagy, 2000; Song ve diğerleri, 2012). Oksidatif stres ve A β üretimine ek olarak, G₂’de mikrotübül ağının dengesi bozulur ve nöronlarda artan miktarda serbest Tau oluşur (Moh ve diğerleri, 2011; Nagy, 2000). Ek olarak, çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA), siklin D, CDK4 ve siklin B1 dahil olmak üzere hücre döngüsü proteinlerinde, hipokampusun yanı sıra diğer hastalıklı beyin bölgelerinde, AH hastalarının ölüm sonrası dokusunda bir artış gözlenmiştir (Klein ve Ackerman, 2003). PH’deki post-mitotik DA nöronların hücre döngüsüne yeniden girdiği ve G₁/S kontrol noktasını geçtiği,

ancak M fazında tutuklandığı rapor edilmiştir. PH'de, AH'ye benzer şekilde anormal hücre döngüsünün nöral apoptozu ve nörodejenerasyonu indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca, CDK (CDK2 ve CDK5) gibi hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin, PH'de DA nöronların ölümünde kritik bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (Esteras ve diğerleri, 2015). Diğer bir NH olan HH'nin transgenik primat modeliyle yapılan bir çalışmada, *in vitro* astrosit farklılaşması sırasında anormal hücre döngüsü yeniden girişinin, E2 transkripsiyon faktörü (E2F)-1/p53'e bağlı mekanizmalar yoluyla apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Goodnight ve diğerleri, 2019). ALS'de ise, hastaların hem spinal motor nöronunda hem de post-mortem dokusunun motor korteksinde hücre döngüsü düzenleyicileri siklin D1, CDK4, hiperfosforile retinoblastom proteini (pRb) ve E2F-1'de artışlar olduğu gözlenmiştir (Klein ve Ackerman, 2003). Ek olarak, yapılan bazı çalışmalarda ALS'de CDK5 disregülasyonunu takiben hatalı G1/S faz aktivasyonunun, motor nöron ölümünün önemli bir aracısı olabileceği raporlanmıştır (Wang ve diğerleri, 2009).

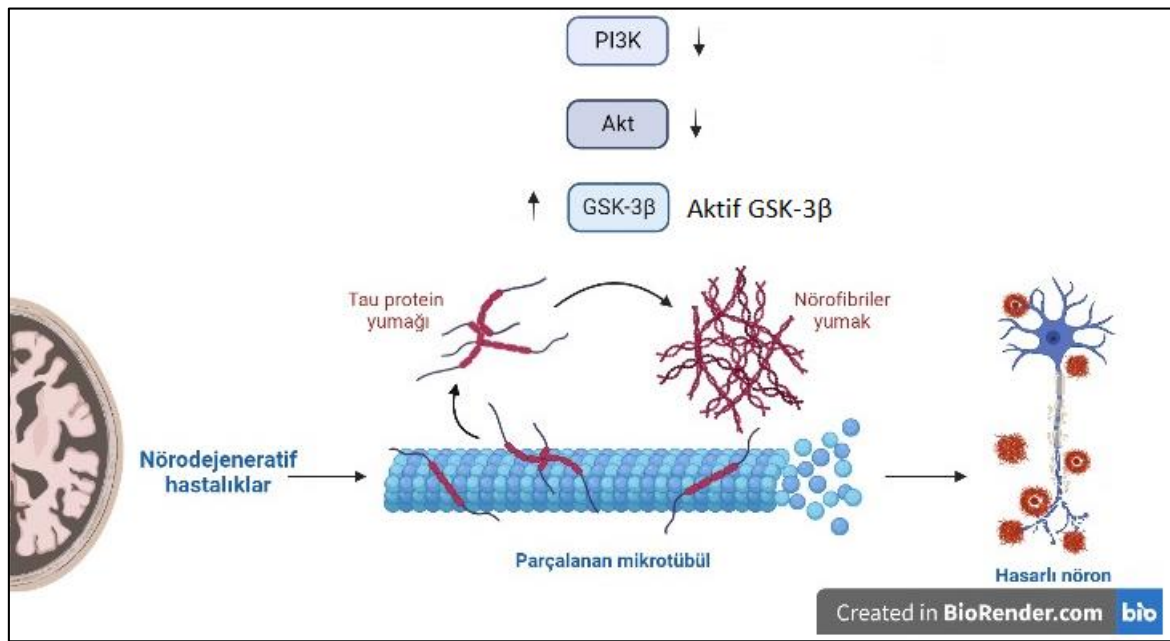
2.3.6. Nöral ölüm sinyal yollarının disregülasyonu

NH'lerde Akt/GSK-3 β sinyal yolları, nöroprotektif mekanizmalarda yer alır ve nöral sağkalımda önemli bir rol oynar (Huang ve diğerleri, 2017; Tzeng ve diğerleri, 2022). Bu sinyal yolağında bulunan Akt, büyüme faktörü stimülasyonuna yanıt olarak çeşitli nöral hücre tiplerinde hayatta kalma sinyaline aracılık etmede etkili bir Ser/Thr kinazdır. Akt, hücrenin hayatta kalmasını destekleyen ve apoptozu önleyen moleküllerden biri olan fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) yolağı aracılığıyla Thr 308 ve Ser 473'teki fosforilasyon ile aktive edilir (Ahn, 2014; Kim, Bae, Choi ve An, 2011; Wu, Shang, Sun, Liang ve Liu, 2007). Bununla birlikte, tam aktivasyon Ser 473'ü gerektirir, bu nedenle Ser 473 fosforilasyon seviyeleri, Akt fosforilasyonunun derecesini temsil eder. Akt, aktivasyon sırasında plazma zarına yerleşir ve aktivasyon sonrası hücrenin hayatta kalmasına ek olarak, hücre büyümesi, çoğalma, glikoz metabolizmasının düzenlenmesi, hücre döngüsü, anjiyogenez, farklılaşma ve apoptoz dahil olmak üzere çeşitli hücre fonksiyonları düzenleyen bir dizi nükleer ve sitozolik proteinin fosforilasyonunu indükler (Ahn, 2014; Kitagishi, Nakanishi, Ogura, Matsuda, 2014; Morrison ve diğerleri, 2003). Dolayısıyla, p-Akt (aktive edilmiş form); GSK-3 β , Bax, Bcl-2 ile ilişkili ölüm promotörü (Bad)/Bcl-2 ve Kaspaz-9'u doğrudan etkileyerek ilgili pro-apoptotik proteinlerin inaktivasyonu, diğer taraftan anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-XL'nin aktivasyonu ile nöral hücre ölümünü inhibe eder (Ahn, 2014; Kim ve diğerleri, 2011). Bunlar arasında Akt'nin ana

substratı GSK-3 β 'dir. GSK-3, glikojen metabolizmasında rol oynayan bir Ser/Thr protein kinazdır ve ayrıca glikojen sentazın fosforile edici ve inaktive edici bir maddesidir. GSK-3 α ve GSK-3 β olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır (Choi, Cha, Lee, Kim ve Kim, 2020; Huang ve diğerleri, 2017). GSK-3 β fonksiyonel olarak, nöral progenitör homeostazı, nöral göç, nöral morfoloji, sinaptik gelişim ve nörotransmisyon dahil olmak üzere nörogelişim sırasında nöronlardaki birçok temel süreçte etkilidir. Ayrıca, nöronların enerji metabolizmasında çok önemli bir rol oynar. GSK-3 β 'nin aktivitesi, Ser 9 ve tirozin (Tyr) 216'daki fosforilasyon ile düzenlenir. Buna göre, GSK-3 β 'nin enzimatik aktivitesi için Tyr 216'nın fosforilasyonu gereklidir. Diğer taraftan, p-Akt tarafından Ser 9 fosforilasyonu, GSK-3 β 'nin enzimatik aktivasyonunu inhibe eder (Choi ve diğerleri, 2020; Kitagishi ve diğerleri, 2014; Lee ve diğerleri, 2009a). Böylece, mitokondride artan sitokrom-c salınımı ve Kaspaz-3 aktivasyonu ile ilişkili mitokondriyal ölüm yolağını aktive eden GSK-3 β 'nin aktif formu (defosforile), p-Akt tarafından inaktive edilir ve nöral apoptoz baskılanır (Yao, Tang, Liu ve Wang, 2016). Dolayısıyla, PI3K/Akt hücre sel sinyalleşmesinin kritik bir efektörü olan GSK-3 β 'nin inhibisyonunda, Akt ile ilişkili moleküler kontrol mekanizmaları önemlidir (Şahin, Ünal ve Arcıoğlu, 2014).

Nöral hücrelerde PI3K/Akt/GSK-3 β sinyal yolağının disregülasyonu ile ilişkili GSK-3 β aktivitesi AH ve diğer NH'lerin patogeneğinde yer almaktadır (Chung ve diğerleri, 2010; Koh, Baek ve Kim, 2011; L'episcopo ve diğerleri, 2016; Yao ve diğerleri, 2016). NH'lerde yüksek ROS seviyeleri, Akt sinyal yolağının aşağı regülasyonunu indükleyerek hücre ölümüyle sonuçlanır. Aşırı ROS seviyeleri, Bax oligomerizasyonu, mitokondriden sitokrom-c salınımı ve kaspaz kaskadlarının aktivasyonu ile sonuçlanan Akt'nin defosforilasyonunu/inaktivasyonunu indükler (Duarte, Santos, Oliveira, Santos ve Rego, 2008; Kim ve diğerleri, 2011; Songin, Ješko, Czapski, Adamczyk, Strosznajder, 2007). AH'de PI3K/Akt/GSK-3 β sinyal yolağının A β birikimi ve Tau fosforilasyonunun düzenlenmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Kitagishi ve diğerleri, 2014; Yao ve diğerleri, 2016). AH'de, aktif GSK-3 β 'nin APP'nin amiloidojenik işlenmesine ve NFY'lerin ana bileşeni olan Tau'nun anormal fosforilasyonuna neden olduğu ve bunun sonucunda nöral ölümle ilişkili olarak öğrenme ve hafızayı bozduğu rapor edilmiştir (Chung ve diğerleri, 2010; Huang ve diğerleri, 2017; Lauretti, Dincer ve Praticò, 2020; Yu ve Koh, 2017) (Şekil 2.7). Ayrıca, AH'li hastaların beyinlerinde PI3K/Akt sinyalinin zayıfladığı gösterilmiştir (Mercado-Gómez ve diğerleri, 2008). Diğer taraftan GSK-3 β inhibisyonu, α -, β - ve γ sekretazları düzenleyerek A β üretimini azaltabilir. Ek olarak, Akt aktivasyonu, A β kaynaklı

nörotoksositeyi önler (Huang ve diğerleri, 2017). PH'de Akt/GSK-3 β sinyal yolağının disregülasyonunun α -syn birikimine aracılık ettiği, hastaların SNpc'sinde p-Akt'nin önemli ölçüde azaldığı ve GSK-3 β 'nin ise anormal şekilde arttığı gösterilmiştir (Joshi ve diğerleri, 2022; Long ve diğerleri, 2021). Ayrıca, PH patogenezi sırasında, GSK-3 β aktivasyonunun, DA nörondaki Kaspaz-3 içeriğini yukarı regüle ederek DA nöronların apoptozisine yol açtığı bildirilmiştir (Long ve diğerleri, 2021). Ek olarak, PH'de AH'de olduğu gibi artan GSK-3 β aktivitesine paralel olarak, mezensefalik DA nöronlarında Tau hiperfosforilasyonunun indüklendiği gösterilmiştir (Chung ve diğerleri, 2010).



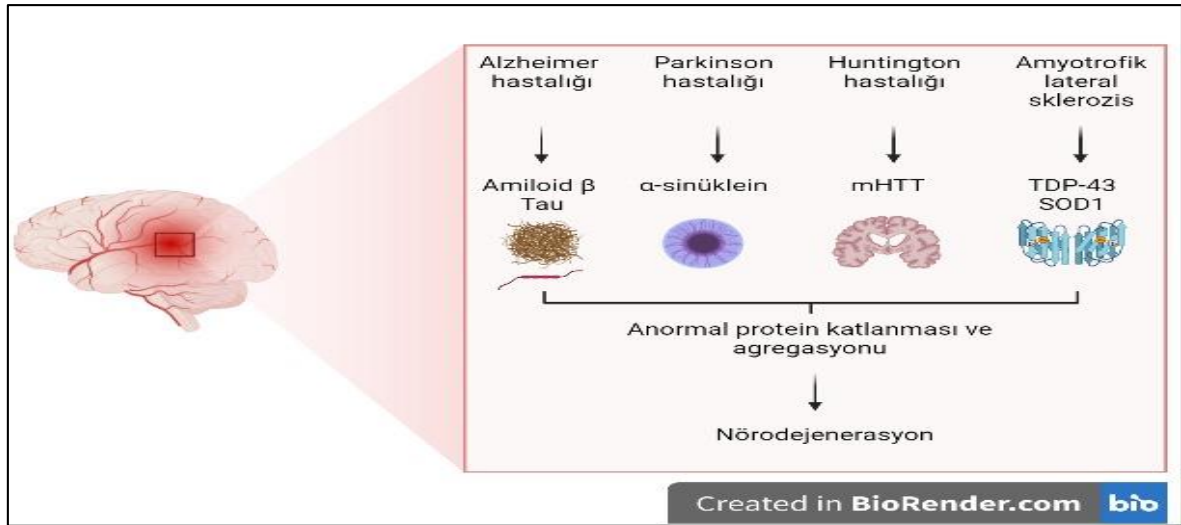
Şekil 2.7. Protein kinaz B/Glikojen sentaz kinaz-3 β sinyal yolağı aracılı anormal Tau fosforilasyonu (Lauretti ve diğerleri (2020)'den yararlanılarak çizilmiştir).

HH'de, GSK-3 β aktivasyonunun nörotrofik ve nöroprotektif özellikleri etkilediği ve mHtt ile indüklenen Tau fosforilasyonuna ve Kaspaz-3 aktivasyonuna neden olduğu, buna bağlı olarak da hipokampal nöral hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir (L'episcopo ve diğerleri, 2016). ALS'de ise, hasarlı motor nöronlarında PI3K/Akt yolağının inhibisyonunun GSK-3 β sinyallemesinin anormal aktivasyonuna neden olduğu rapor edilmiştir (Choi ve diğerleri, 2020). Ayrıca, ALS'nin *in vitro* ve *in vivo* modellerinde, sporadik ALS'li hastaların torasik omurilik dokusunda ve ALS hastalarının frontal ve temporal kortekslerinde GSK-3 β 'de anormal bir artışın olduğu bunun da SOD ve TDP-43 ile ilişkili nörodejenerasyonda önemli olduğu bildirilmiştir (Koh ve diğerleri, 2011).

2.3.7. Protein yanlış katlanması ve agregasyonu

Kendiliğinden kümelenen proteinler arasındaki anormal etkileşimler (yanlış katlanmış proteinlerin anormal hücre içi ve hücre dışı birikimi) ve yüksek sıralı çözünmez fibrillerin oluşumu çeşitli NH'lerin patolojik ayırt edici özellikleridir (Ajmal, 2023; Jellinger, 2010). Bu hastalıklarda, proteinlerin yanlış katlanması, agregasyonu ve birikmesi, hücresel işlev bozukluğuna, sinaptik bağlantıların kaybına ve beyin hasarına yol açar (Soto ve Pritzkow, 2018; Ovádi ve Orosz, 2008: 1-278). Ayrıca, bu proteinlerin agregasyonu Ca^{+2} homeostazının bozulması, mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif strese neden olarak nöronları apoptoza indükler (Ureshino ve diğerleri, 2019; Liu ve diğerleri, 2017a). NH'lerde proteinin yanlış katlanması ve agregasyonu süreci oldukça benzer olup, yüksek oranda çözünür beyin proteinleri arasındaki anormal etkileşim, onların konformasyonunu değiştirir. Yanlış katlanma, agregatların ya çok düzenli (çapraz kıvrımlı β -tabaka yapıları) ya da düzensiz (amorf) formları benimsediği, yavaş yavaş onları çözünmeyen polimerlere dönüştürür (Jellinger, 2010; Soto ve Pritzkow, 2018). Süreçteki benzerliğe rağmen, her NH'deki protein kümelerinin dağılımı ve bileşimi farklı olup, anormal kümelerin varlığı genellikle hastalıktan en çok zarar gören beyin bölgelerinde meydana gelir (Ovádi ve Orosz, 2008: 1-278; Soto ve Estrada, 2008) (Şekil 2.8). AH'de $A\beta$ ve Tau proteinleri olmak üzere iki tip protein birikimi vardır. Amiloid plaklar hücre dışı olarak beyin parankiminde ve serebral damar duvarlarının çevresinde birikir ve bunların ana bileşeni, $A\beta$ 'dir (Soto ve Estrada, 2008). $A\beta$, β - ve γ -sekretaz tarafından APP'nin sıralı bölünmesiyle üretilir, süreç sonunda patojenik faktörler olarak bilinen $A\beta_{1-40}$ ve $A\beta_{1-42}$ izoformları oluşur (APP'nin oksidatif stres ile indüklenen amiloidojenik bölünmesi) (Bae ve Kim, 2017; Kent, Spire-Jones, Durrant, 2020; Tan, Li ve Evin, 2016). Normal fizyolojik koşullarda, APP ve bununla ilişkili olarak $A\beta$ sinaptik aktivite, sinaps ve dendritik omurga oluşumu ve sinaptik vezikül taşınmasında rol oynarken, patolojik $A\beta$ plakları nöronların ve mitokondrilerin etrafında, işlevlerini bozan kümeler oluşturur (Muddapu ve diğerleri, 2020; Rajmohan ve Reddy, 2017). Hücrede mikrotübüllerin yapısal organizasyonu için gerekli olan Tau proteini ise, anormal olarak hiperfosforillendiğinde (oksidatif stres vb. koşullarda); dinamik kararsızlığa, mikrotübüler ağların parçalanmasına ve nihai olarak hücrenin sitoplazmasında NFY'lerin oluşumuna ve bunun sonucunda nörodejenerasyona yol açar (Naini ve Soussi-Yanicostas, 2015; Thal ve Fändrich, 2015; Yu ve Koh, 2017). AH'ye ek olarak, Tau proteini PH mekanizmasında da yer alır. Çeşitli çalışmalarda, PH'li hastaların beyin omurilik sıvısı (BOS)'da Tau proteinleri ve α -syn seviyeleri arasında önemli bir korelasyon olduğu

bildirilmiştir (Kang ve diğerleri, 2013; Xie, Gao, Xu ve Meng, 2014). PH’de, beyindeki SN nöronlarının sitoplazmasında LB’ler gözlenir. Bu kümelerin ana bileşenleri ise, oligomerizasyonu ve toksisitesinde oksidatif stresin etkili olduğu α -syn proteindir (Luk, 2019; Soto ve Estrada, 2008). Aynı zamanda, α -syn AH'deki senil plakların amiloid olmayan β bileşeninin öncü proteindir ve α -syn'nin AH hastalarının beyinde anormal sinaps oluşumunda rol oynadığı bildirilmiştir (Kim, Seo ve Suh, 2004). HH’de, Htt proteininin poliglutamin açısından zengin bir versiyonunun oksidatif stres vb. ile ilişkili intranükleer birikintileri, beyin tipik bir özelliğidir (Kumar ve Ratan, 2016; Soto ve Estrada, 2008). Bununla birlikte, ilgili agregalar oksidatif strese ve dolayısıyla HH ile ilişkili nöral disfonksiyona ve hücre ölümüne neden olabilir (Zheng, Winderickx, Franssens ve Liu, 2018). ALS’de ise temelde SOD1 olmak üzere, TDP-43 de motor nöronlarda büyük çözünmeyen kümeler halinde birikir. Bunun mutasyonun neden olduğu yapısal istikrarsızlığın ve/veya SOD1’in yanlış katlanmasına ve nörotoksik bir tür halinde agregasyonuna yol açan oksidatif hasarın bir sonucu olduğu düşünülmektedir (Khan ve diğerleri, 2018; McAlary, Aquilina ve Yerbury, 2016; Zuo ve diğerleri, 2021).

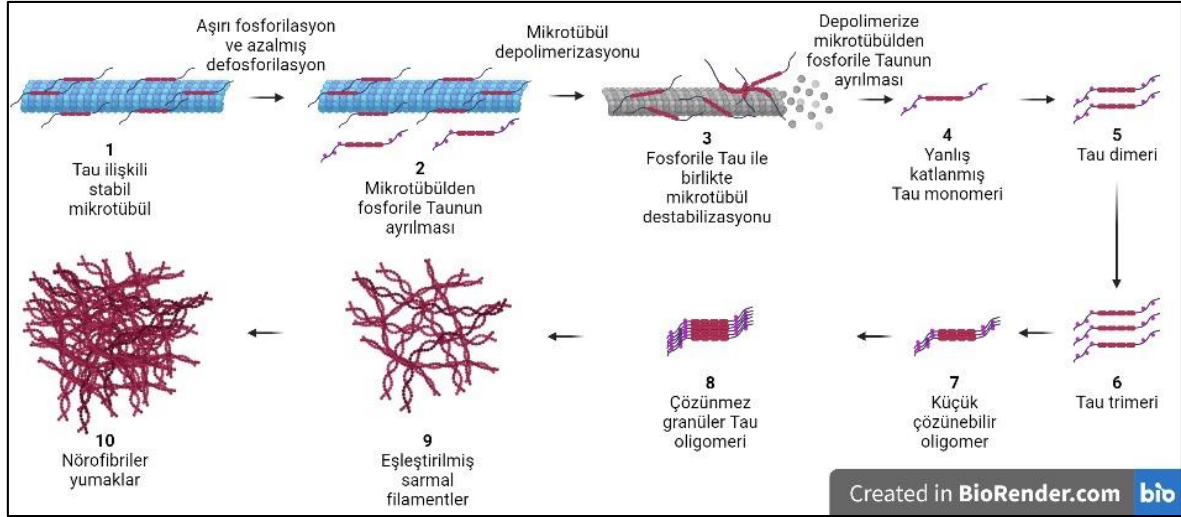


Şekil 2.8. Nörodejeneratif hastalıkların ortak moleküler patogenezi olarak protein yanlış katlanması ve agregasyonu (Di Carlo, Picone, Carrotta, Giacomazza ve San Biagio (2011: 1-354)’den yararlanılarak çizilmiştir).

Tau proteininin fizyolojisi ve patolojisi

Tau proteini, MSS’de ekzon 2, 3 ve 10’un alternatif eklenmesi yoluyla toplam 6 Tau protein izoformu oluşturan, 16 ekzon içeren kromozom 17’nin uzun kolu üzerindeki MAPT (mikrotübül ile ilişkili protein Tau) geni tarafından kodlanan bir proteindir (Kent ve

diğerleri, 2020; Muralidar, Ambi, Sekaran, Thirumalai ve Palaniappan, 2020; Zaki, El-Desouky, Elsherbiny, Salama ve Azab, 2022). Tau, birçok etkileşim ortağı olan çok işlevli bir protein olup, MSS’de ağırlıklı olarak nöronlarda eksprese edilir, ana işlevi mikrotübül oluşumunu indüklemek, mikrotübülleri stabilize etmek, nöronlardaki mikrotübüllerin dinamiklerini etkilemek ve özellikle aksonlarda apoptozu inhibe etmektir (Brandt, Trushina ve Bakota, 2020; Liu ve diğerleri, 2015b: 1-372). Ayrıca, nörit büyümesine, aksonal taşımaya ve trofik sinyalleşme gelişimine katılır. Bunlara ek olarak, hücre sinyal iletiminde görevlidir ve hücrenin nükleolar düzenleyici bölgesinde, DNA onarımı ve ısı şoku tepkilerinde yer alabilir. Diğer taraftan, Tau disfonksiyonu mikrotübül parçalanmasına, Tau filamentlerinin oluşumuna ve intranöral sinyalizasyon bozukluğuna ve bunun sonucunda hücre ölümüne yol açar (Sinsky, Pichlerova ve Hanes, 2021). Dolayısıyla, normal fizyolojik koşullarda Tau proteinleri, hücre iskeletindeki aksonal mikrotübülleri stabilize eder ve nöronların morfolojisini düzenlemede önemli bir rol oynarken, bu proteinlerin patolojik koşullarda anormal derecede hiperfosforilasyonu, Tau’nun mikrotübüle bağlanma afinitesini azaltarak mikrotübülleri destabilize eder ve NFY’lerde toplanmasına neden olur (Liu ve diğerleri, 2015b: 1-372; Rajmohan ve Reddy, 2017). Fosforillenmiş Tau monomerleri, oligomerler, filamentler (hem düz hem de çift sarmal) oluşturmak üzere bir araya gelebilir ve buna bağlı olarak PHF’ler kendiliğinden NFY’ler halinde toplanır (Kent ve diğerleri, 2020; Mietelska-Porowska, Wasik, Goras, Filipek ve Niewiadomska, 2014). Tau hiperfosforilasyonu erken apoptotik nöronların bir özelliği olup, aksonal taşıma için çok önemli olan dinamik bir montaj ve demontaj sürecinin (mikrotübül oluşumu) Tau’nun anormal fosforilasyonu ile bozulması, sinaptik iletim disfonksiyonuna ve sonunda nöral ölüme neden olur (Lorío, Avila ve Díaz-Nido, 2001), Rajmohan ve Reddy, 2017). Tau proteini tarafından kolaylaştırılan uygun aksonal taşımaya sahip normal mikrotübül (1), hiperfosforile Tau’nun aracılık ettiği, aksonal taşımanın bozulduğu anormal mikrotübül ve NFY’lerin oluşumundaki sıralı adımlar (2-10) Şekil 2.9’da gösterilmektedir (Muralidar ve diğerleri, 2020).



Şekil 2.9. Tau proteininin fizyolojik ve patolojik işlevi (Muralidar ve diğerleri (2020)'den yararlanılarak çizilmiştir).

Tau'nun fosforilasyon durumu, protein kinazların ve fosfatazların miktarı ve aktivitesi arasındaki dengenin bir sonucudur (Sinsky ve diğerleri, 2021). Fosforilasyonun normal fizyolojik koşullar altında Tau'nun modifikasyonunda önemli bir rolü olmasına rağmen, bu değişikliğin artan seviyesi, AH gibi birkaç tauopatinin en önde gelen ayırt edici özelliği olarak işlev gören ve kendi kendine agrega olan hiperfosforillenmiş Tau'ya yol açar (Muralidar ve diğerleri, 2020). İnsan Tau proteininin en uzun izoformu 85 potansiyel fosforilasyon bölgesine sahiptir (Ser veya Thr rezidülerinden fosforile edilir) (Mietelska-Porowska ve diğerleri, 2014).

Her Tau bölgesi, bir veya daha fazla protein kinaz tarafından fosforile edilir. Tau kinazlar üç sınıfa ayrılır: (1) GSK-3, CDK5 ve MAPK (örn. p38, ERK1/2 ve JNK1/2/3) içeren prolinden zengin protein kinazlar (PDPK), (2) PDPK olmayan protein kinazlar ve (3) tirozin protein kinazlar (TPK). Tau'nun defosforilasyonundan sorumlu protein fosfatazlar (PP'ler) da şunları içerir: PP2A, PP2B, PP1 ve PP5 (Buée, Bussiére, Buée-Scherrer, Delacourte ve Hof, 2000; Liu ve diğerleri, 2015b: 1-372). Bu kinazlardan, GSK-3 (özellikle GSK-3 β), çoğu Ser ve Thr rezidüsünde Tau'yu fosforile ederek ve PHF'lerde hiperfosforilasyonu indükleyerek A β üretimine ve A β aracılı nöral ölüme katkıda bulunur, böylece AH'nin patogeneğinde anahtar bir rol oynar (Liu ve diğerleri, 2015b: 1-372). MAPK'ler tarafından *in vitro* fosforile edilen Tau proteininin Ser ve Thr bölgeleri, AH beyinlerinde bulunan PHF-Tau'nun fosforilasyon bölgeleriyle tutarlıdır ve ERK1/2, JNK1/2 ve p38 MAPK'lerin her üçünün de AH'de Tau fosforilasyonunda yer aldığı bilinmektedir. Ayrıca, MAPK'lerin,

aksonal distrofinin geliştiđi AH beyin bölgesinde, senil plaklar ve NFY'lerin bulunduđu alana yakın lokalize olduđu bulunmuştur (Li, Shi ve Zhao, 2018). Bununla birlikte, nöronların akson ve dendritlerde biriken NFY'lerin, bu hücrelerin dejenerasyonuna neden olduđu ve AH'deki demansın şiddetinin NFY yükü ile bir korelasyon gösterdiđi rapor edilmiştir (Fadaka, Ojo, Osukoya, Akuboh ve Ajiboye, 2017; Li ve diđerleri, 2018). Ayrıca, AH ve PH başta olmak üzere çeşitli taupatilerde Tau proteininin modifikasyonunda oksidatif stresin etkili olduđu bildirilmiştir (Haque, Murale, Kim ve Lee, 2019). Oksidatif stres, çeşitli kinazları (GSK-3 β , CDK5, JNK ve p38) aktive ederek ve PP2A'nın aktivitesini azaltarak Tau proteinin hiperfosforilasyonuna neden olur. Oksidatif stres aracılı lipid peroksidasyonu da, Tau kinazları daha fazla aktive eden ve agregasyonu teşvik eden hiperfosforile Tau'nun konformasyonel deđişikliklerini tetikleyen toksik aldehyitlerle sonuçlanır (Zubčić, Hof, Šimić ve Jazvinščak Jembrek, 2020).

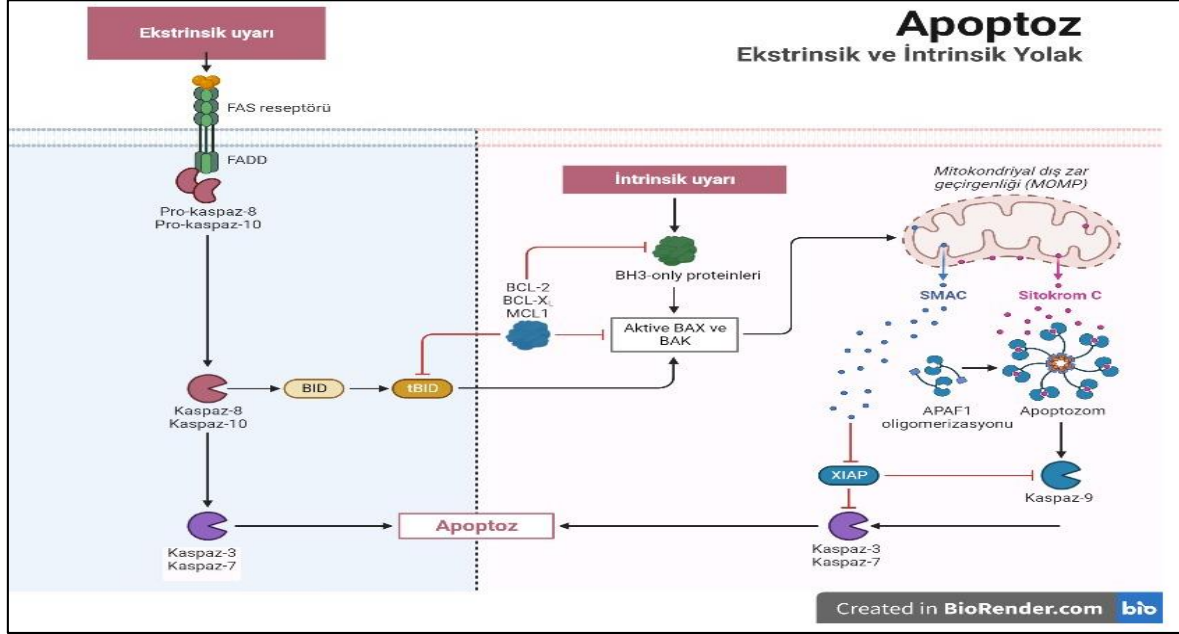
2.3.8. Nöral ölüm

Fizyolojik olarak hücre ölümü, doku/organ büyüklüğünü ve işlevini sürdürmek için gerekli olan, oldukça düzenli ve çok önemli bir homeostatik mekanizmadır. Gelişmekte olan sinir sistemindeki aşırı nöronların uzaklaştırılması, fonksiyonel sistemlerin oluşumu için gerekli olmakla birlikte, anormal nöral hücre ölümü, AH, PH, HH ve ALS gibi NH'ler ile ilişkili bir patolojinin ayırt edici özelliğidir (Cui ve diğerleri, 2021; Fricker ve diğerleri, 2018). Bu hücre ölümlelerinde farklı morfolojik ve biyokimyasal özelliklere sahip olan apoptoz, nekroz ve otofaji gibi farklı hücre ölüm yolları etkilidir (Chi, Chang ve Sang, 2018; Cui ve diğerleri, 2021). Apoptoz, birçok enzime bağlı biyokimyasal süreçle birlikte hücre yapısında bir dizi karakteristik morfolojik değişiklik ile karakterize edilir. Sonuç, çevredeki dokulara minimum hasar ile hücrelerin vücuttan uzaklaştırılmasıdır. Nekroz, genellikle, hücre içeriğinin çevre dokulara dökülmesi ve ardından hasar görmesiyle sonuçlanan, genellikle şiddetli bir saldırının ardından hücrenin kontrolsüz ölümü olarak karakterize edilir (D'Arcy, 2019). Otofaji ise, öncelikle organellerin, protein kümelerinin ve bazı proteinlerin açlık koşullarıyla ilişkili olarak hücre tarafından parçalandığı bir mekanizmadır. Otofajik hücre ölümü; organel şişmesi, sitoplazmanın vakuolizasyonu ve lokal inflamasyona yol açan membran bozulmaları dahil olmak üzere farklı bir morfolojiye sahiptir (Gorman, 2008). Apoptoz, birçok NH'de baskın nöral ölüm yolağıdır (Erekat, 2018: 65-82).

Nöral apoptoz

Apoptoz, bir tür programlanmış hücre ölümü olup, anormal hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonları, afferent veya efferent trofik faktör yoksunluğu, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ve stres dahil olmak üzere bir dizi geniş ölüm uyarısı sınıfı tarafından başlatılabilir (Chi ve diğerleri, 2018; Erekat, 2018: 65-82). Hücrenin büzülmesi, kromatinin yoğunlaşması, nükleer DNA parçalanması ve nükleer materyal içeren apoptotik cisimciklerin oluşumu dahil olmak üzere spesifik morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler ile karakterizedir. Apoptozda, hücre zarı bütünlüğü korunur ve apoptotik cisimcikler fagositozla, bir inflamatuvar yanıt olmaksızın uzaklaştırılır (Erekat, 2018: 65-82). Nöral apoptoz ise, sinir sisteminin gelişiminde önemli bir rol oynarken, aynı zamanda NH'lerin altında yatan bir unsurdur (Langley, 2007: 165-182). Nörodejenerasyonda, intrinsik (içsel/mitokondriyal) ve ekstrinsik (dışsal/ölüm reseptörü) olmak üzere iki ana apoptotik yolak vardır (Fricker ve diğerleri, 2018). İntrinsik apoptotik yolak, Bcl-2 protein ailesinin pro-apoptotik (örn; Bax, Bak ve Bid) ve anti-apoptotik üyeleri (örn; Bcl-2 ve Bcl-xL) tarafından düzenlenir, DNA hasarı, oksidatif stres ve büyüme faktörü yoksunluğu ile aktive olur (Chi ve diğerleri, 2018; Morrison ve diğerleri, 2003). Bu yolağın aktivasyonu sırasında Bax, sitozolden dış mitokondriyal membrana yer değiştirir, burada oligomerler oluşturur ve mitokondriyal membranda gözeneklerin oluşumuna yol açar ve mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\Psi_m$)'ni azaltır, sitokrom-c, AIF gibi pro-apoptotik moleküllerin ve ayrıca zarlar arası boşlukta depolanan diğer moleküllerin salınmasına neden olur. Sitozolda, sitokrom-c apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1), ATP/dADP ve Prokaspaz-9'a bağlanır ve apoptozom oluşturur (Ureshino ve diğerleri, 2019; D'Arcy, 2019). Prokaspaz-9, daha sonra proteoliz yoluyla aktive edilir. Aktive edildiğinde, başlatıcı kaspaz olan Kaspaz-9 bu kompleksten ayrılır ve ardından sırasıyla efektör kaspazları (Kaspaz-3, -6 ve/veya -7) aktive eder (Cui ve diğerleri, 2021; Snigdha, Smith, Prieto ve Cotman, 2012). Ekstrinsik yolak ise, ilgili ligandları tarafından hücre içi ölüm domainine sahip olan tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) süper ailesinin üyelerinin ligasyonu ile aktive edilir (örn; FAS ligandı tarafından aktive edilen FAS). Bu, adaptör protein (FADD: Fas ile ilişkili ölüm domaini proteini, TRADD: TNF reseptörü ile ilişkili ölüm domaini proteini) aracılı Kaspaz-8'in ve aşağı akış efektör kaspazlarının aktivasyonu ile sonuçlanan ve hücre içi ölümü indükleyen sinyal kompleksinin oluşumunu indükler. Ek olarak, ekstrinsik yolak, sadece-Bcl-2 homoloji (BH)-3 proteini Bid'in (kesilmiş Bid/tBid oluşturmak için) Kaspaz-8 aracılı proteolitik aktivasyonu ile intrinsik

apoptotik yolağa bağlanabilir (Favaloro, Allocati, Graziano, Di Ilio ve De Laurenzi, 2012; Gorman, 2008) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Apoptozu yol açan ana moleküler yolların şematik gösterimi (Favaloro ve diğerleri (2012)’den yararlanılarak çizilmiştir).

AH ile ilgili çeşitli çalışmalar, hastaların ölüm sonrası beyinlerinde pro-apoptotik (Bax, Bak ve Bad) ve anti-apoptotik proteinler (Bcl-2 ve Bcl-xL) ile başlatıcı Kaspaz-8 ve -9 ve efektör Kaspaz-3 ve -6 gibi bazı moleküler apoptotik belirteçlerin dengesiz seviyesini bildirmiştir. AH’de hücre içi A β ’nın Bax’ın p53’e bağlı transkripsiyonel yukarı regülasyonu ve Bcl-2 ve Bcl-xL’deki azalmalar yoluyla apoptozu indükleyebileceği rapor edilmiştir (Ohyağı ve diğerleri, 2005; Ribe, Serrano-Saiz, Akpan, ve Troy, 2008). Ayrıca, A β ile indüklenen Kaspaz-3 aktivasyonu, AH modellerinde Tau proteininin anormal işlenmesine neden olur (Favaloro ve diğerleri, 2012). Apoptozun PH’nin patogeneziindeki rolü, SNpc’de Kaspaz-3’ün yüksek aktivitesini ve aktif Kaspaz-3’ün ekspresyonunun arttığını gösteren ölüm sonrası ve *in vitro* çalışmalarda doğrulanmıştır. Ayrıca, ölüm sonrası beyin dokusunda Bax gibi yüksek pro-apoptotik protein seviyelerinde artış olduğu, Bcl-2’de hastalık süresi ve ciddiyeti ile ters orantılı olarak önemli düşüşlerin olduğu bildirilmiştir (Blandini ve diğerleri, 2003; Erekat, 2018: 65-82; Levy, Malagelada ve Greene, 2009). HH fare modellerindeki gözlemler, hastalığın geç evrelerinde beyin lizatlarında artan pro-apoptotik Bim ve Bax seviyelerini içerir. HH beyinlerde kaspazların aktive olduğu da gösterilmiştir (Zhang ve diğerleri, 2003). ALS’nin hücresel veya transgenik hayvan modellerinde mSOD1’in aşırı

ekspresyonunun kaspaz aracılı hem intrinsik hem de ekstrinsik yolağı aktive ettiği rapor edilmiştir. Çalışmalarda, mSOD1'in sadece-BH3 proteini Bim ve Bax'ı yukarı regüle ettiği, tersine, Bcl-2 aşırı ekspresyonunun, Bim ve Bax aracılı apoptotik sinyallemeği aşağı regüle ettiği ve ayrıca kaspaz aktivasyonunu geciktirdiği bildirilmiştir (Azam ve diğerleri, 2021).

2.4. Nörodejeneratif Hastalıkların Tedavisi

2.4.1. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlar

NH'ler, yüksek morbidite ve mortalite oranları ile ilişkili hastalıklar olup; tıbbi, sosyal, finansal ve bilimsel olarak çok büyük bir sorun teşkil etmektedirler. NH'lerin nedenleri üzerine yoğun araştırmalar yapılmış olmasına rağmen, günümüzde hala tedavileri mevcut değildir ve yalnızca marjinal klinik ilerleme kaydedilmiştir. Bu hastalıkların tedavisi için onaylanan ilaçlar, hastalıkla ilgili semptomları geçici olarak hafifleterek veya hastalığın ilerlemesini orta derecede geciktirerek sınırlı bir rahatlama sağlamaktadır (Bezprozvanny, 2009; Chen ve Pan, 2014; Mathur, Gawas, Ahmad, Wani ve Tabassum, 2023). AH için, beş reçeteli ilaç semptomları hafifletmek üzere ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Mevcut beş ilaçtan üçü -donepezil, galantamin ve rivastigmin- "AChE inhibitörleri" olarak bilinen bir ilaç sınıfına aittir. Bu ilaçlar, beyinde öğrenme ve hafıza için önemli olan asetilkolinin parçalanmasını önler. Dolayısıyla bunlar, kolinerjik nörotransmisyonu güçlendirerek hafif ile orta derece AH'de bilişsel işlevlerde düşük düzeyde gelişmeler gösterir (Libro ve diğerleri, 2016). Dördüncü ilaç, NMDAR antagonistleri olarak bilinen bir başka AH ilaç sınıfı olan memantindir. AH beyinlerinde artmış olan glutaminerjik nörotransmisyonu zayıflatan bu ilacın orta-şiddetli AH hastalarının günlük yaşamının biliş, davranış ve aktiviteleri üzerinde yararlı etkileri kanıtlanmıştır (Libro ve diğerleri, 2016; Lleo, Greenberg ve Growdon, 2006). Dolayısıyla, farklı şekillerde çalışan her iki ilaç tipi de sadece semptomları hafifletmeye yardımcı olur. Beşinci ilaç, donepezil ve memantinin bir kombinasyonudur (Mangialasche, Solomon, Winblad, Mecocci ve Kivipelto, 2010). PH için, onaylanan ilaçlardan en etkili olanı levodopa beyinde dopamine dekarboksillenir. Karbidopa, periferik dihidroksifenilalanin (DOPA)-dekarboksilaz (DCC) inhibitörüdür. Entakapon ve tolkapon levodopanin 3-O-metilDOPA'ya periferik dönüşümünü bloke eden katekol-o-metiltransferaz (COMT) inhibitörüdür. Ropinirol, pramipeksol ve apomorfin dopamin reseptör agonistleri iken, selegilin ve rasajilin seçici monoamin oksidaz B (MAO-B) inhibitörleridir. Amantadin,

striatumda dopamin salınımını değiştiren anti-viral ajan olarak kullanılmasına ek olarak, NMDA glutamat reseptörlerini de bloke eder. Levodopa ve karbidopa'nın kombinasyonu ise, beyne daha fazlasının girişine izin vererek periferde levodopanin dekarboksilasyonunu önler. HH için onaylanan tetrabenazin, VMAT2'yi inhibe eder ve katekolaminlerin pre-sinaptik tükenmesine neden olur. ALS için ise onaylanan dört ilaçtan biri olan riluzol, glutamatın pre-sinaptik salınımını inhibe eder, post-sinaptik NMDA ve kainat tipi glutamat reseptörlerini bloke eder ve voltaja bağlı Na^+ kanallarını inhibe eder. Baklofen, GABA reseptörü agonisti bir kas gevşetici iken, tizanidin α_2 adrenerjik reseptör agonistidir. Dantrolen ise, sarkoplazmik retikulumdan Ca^{+2} salınımını engellemek için doğrudan kas liflerine etki eder (URL-11). Bununla birlikte, bu ilaçlar içerisinde günümüzde en yaygın kullanılanları ve NH'lerle ilgili bazı özellikler Çizelge 2.2'de verilmiştir (Bezprozvanny, 2009).

Çizelge 2.2. Nörodejenaratif hastalıklar ve Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi onaylı ilaçlar

Hastalık	Etkilenen nöronlar	Başlangıç yaşı	Sporadik veya genetik	Ailesel hastalık genleri	İlaç	Etki mekanizması veya hedef	Klinik etki
AH	Kortikal ve hipokampal nöronlar	>65	%95 sporadik, %5 ailesel	APP PSEN1 PSEN2	Memantin (Namenda) Donepezil (Aricept) Galantamin (Razadyne) Rivastigmin (Exelon)	NMDA reseptörlerini bloke eder, eksitotoksisiteyi azaltır, AChE inhibitörleri beyindeki ACh konsantrasyonunu artırır.	Bilişsel işlemlerde hafif gelişme
PH	SNpc'deki DA nöronlar	>65	%95 sporadik, %5 ailesel	Sinüklein LRRK2 Parkin PINK1 DJ-1	L-Dopa (Levodopa)	SN nöronlarındaki dopamin miktarını artırır.	Semptomatik fayda
HH	Striatal orta dikenli nöronlar	40–50	%100 ailevi	Htt	Tetrabenazin (Xenazine)	Anti-dopamin (VMAT2 inhibitörü, salınan dopamin miktarını azaltır)	Kore (istemsiz sarsılma veya kıvranma hareketleri)'de azalma
ALS	Motor nöronlar	40–60	%95 sporadik, %5 ailesel	SOD1	Riluzol (Rilutek)	Anti-glutamat (glutamat salınımını engelleyici, NMDAR ve Na ⁺ kanallarının inhibitörü)	Sağkalımı birkaç ay uzatır

2.4.2. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için güncel yaklaşımlar

NH'lerin ortak özelliklerinden biri ilerleyici nöral hücre ölümüdür. Son on yılda, hücre ölümü sürecini anlamada önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. NH'lerin semptomları ve ilerlemeleri spesifik hücre ölüm yollarına göre çok farklıdır ve bu durum yeni terapötik stratejilere yol açar (Chen ve Pan, 2014; de la Fuente ve diğerleri, 2022). Buna göre yeni terapötik stratejilerden bazıları şunlardır:

Oksidatif stresin azaltılması ve anti-oksidan temelli tedavi

Anti-oksidanlar, her ikisi de serbest radikallerin uzaklaştırılmasından, ROS veya bunların öncüllerinin giderilmesinden, ROS oluşumunun engellenmesinden ve ROS üretiminin katalizi için gerekli metal iyonlarının bağlanmasıyla sorumlu olan endojen veya ekzojen (doğal veya sentetik) bileşikler olarak sınıflandırılır (Uttara, Singh, Zamboni ve Mahajan, 2009). Nöronlarda ROS birikimi ve ardından oksidatif stres, enzimatik veya enzimatik olmayan anti-oksidanlar olarak (doğal anti-oksidan sistem) kategorize edilebilen serbest radikal süpürücüler tarafından zayıflatılır. Enzimatik anti-oksidanlar, serbest radikallere karşı savunma mekanizmalarından birini oluşturur. Enzimatik anti-oksidanlar SOD, GPx ve KAT'dan oluşmakta iken, enzimatik olmayan anti-oksidanlar, askorbik asit (C vitamini), α - tokoferol (E vitamini), GSH, retinoik asit, karotenoidler, flavonoidler ve diğer anti-oksidanlar ile temsil edilir (Essa ve diğerleri, 2019; Johri ve Beal, 2012; Morén, deSouza, Giraldo ve Uff, 2022a). Anti-oksidanlara dayalı bir tedavinin NH'lerin önemli bir etkeni olan oksidatif stresi hafifletebileceği, mitokondriyal disfonksiyonu ve aşağı akış dejenerasyonunu azaltabilen redoks dengesini yeniden kazandırabileceği düşünülmektedir. Buna göre; anti-oksidanlar, klinik öncesi model çalışmalarında ve klinik çalışmalarda değerlendirilmiştir (Amato, Terzo ve Mulè, 2019; Kumar ve Singh, 2015). AH'de koenzim Q10 veya lipoik asit ile tedavi, ATP ve SOD seviyelerini artırırken, Apolipoprotein E (ApoE) ve A β fragmentlerinin seviyelerini azaltmıştır (Federico ve diğerleri, 2012). Karotenoidlerle tedavi, oksidatif stres belirteçlerini ve AH belirteç proteinlerini inhibe etmiş, hafıza kaybını iyileştirmiş ve inflamasyonu azaltmıştır (Wang ve diğerleri, 2018a). Ek olarak, ubikinol ve askorbik asit, likopen ile E vitamini gibi kombinasyon tedavilerin, bazı AH modellerinde amiloid plaklarını ve Tau hiperfosforilasyonunu azaltmada sinerjik yararlı bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Frontinan-Rubio ve diğerleri, 2018; Yu ve diğerleri, 2017). PH'de E ve C vitaminleri ve koenzim Q10 takviyelerinin kortikostriatal sinaptik

plastisiteyi geri kazandırdığı, SN'deki DA hücre ölümünü, mikrogial aktivasyonu ve astrogliozisi azalttığı ve davranış parametrelerini iyileştirdiği gösterilmiştir (Attia ve Maklad, 2018; De Nuccio ve diğerleri, 2021; Schirinzi ve diğerleri, 2019). HH'nin *in vitro* kimyasal modelinde bir manganez porfirinin, hücre ölümünü önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir. E ve C vitaminleri ile yapılan çalışmalarda da, hücrelerde glutamat kaynaklı nöral ölüme karşı nöroproteksiyonun gözlemlendiği bildirilmiştir. Ayrıca, anti-oksidan özellikli tauroursodeoksikolik asitin, 3-nitropropiyonik asit ile oluşturulmuş sıçan HH modelinde striatal dejenerasyonu önlediği, lokomotor ve bilişsel eksiklikleri iyileştirdiği raporlanmıştır (Johri ve Beal, 2012). ALS'de kurkuminin, SOD1 amiloid fibrillerinin agregasyonunu ve fibrilasyonunu inhibe ettiği, amiloidojenisiteyi ve nörotoksisiteyi azalttığı gösterilmiştir (Bhatia ve diğerleri, 2015). Fenolik bileşikler, kersitrin, kersetin 3- β -d-glukozit ve epigallocateşin gallat (EGCG)'nin, H₂O₂ kaynaklı yanlış katlanmayı ve A4V SOD1'in birikmesini engellediği bulunmuştur (Ip ve diğerleri, 2017). Yapılan bazı çalışmalarda da, anti-oksidanlarla tedavinin hayatta kalma oranını iyileştirdiği, motor bozulmayı azalttığı, omurilikte astrogliozis ve mikrogliozu azalttığı, spinal motor nöronları apoptozdan koruduğu ve hem mutant hem de yabani tip insan SOD1 seviyelerini düşürerek redoks homeostazını düzenlediğini bildirilmiştir (Kozal ve diğerleri, 2020; Wang ve diğerleri, 2018b).

Mitokondriye yönelik tedavi

Hasarlı mitokondri NH'lerin patogeneğinde yer aldığından ve ilerlettiğinden, bu hastalıkların patofizyolojik sürecinin başlamasını geciktirmek veya tedavi etmek için terapötik bir yaklaşım olarak mitokondri hedefli müdahaleyi seçmek etkili bir stratejidir; klinik uygulamada veya hastalıkla ilgili hayvan modellerinde birkaç mitokondri hedefli tedavi uygulanmıştır. Mitokondriyal tedavi için geçerli stratejiler arasında oksidan uzaklaştırma, mitokondriyal gen tedavisi, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) inhibisyonu, anti-apoptozis ve mitokondriyal dinamik modülasyonu yer alır (Du ve Yan, 2010). AH hastalarında lipoik asit ve/veya N-asetil sistein (anti-oksidan ve GSH öncüsü) uygulamasına bağlı olarak fibroblastlarda mitokondrinin oksidatif stresinde azalma olduğu bildirilmiştir. Bir anti-oksidan ve elektron taşıma zincirinin kofaktörü olan koenzim Q10'nun, mitokondrinin PTP'sini inhibe ederek apoptozu bloke ettiği, ayrıca A β ₁₋₄₀ tarafından yapılan beyin mitokondriyal değişikliklerini nötralize ettiği rapor edilmiştir (Patel ve Mandal, 2019: 1-128). Benzer şekilde MPTP'nin neden olduğu PH hayvan modellerinde,

koenzim Q10'nun striatal dopamini MPTP toksisitesinden koruduğu bildirilmiştir. Ayrıca, bu farelerin SN'sindeki tirozin hidroksilaz (TH)-pozitif nöronları da önemli ölçüde koruduğu ve DA nöronlarda α -syn'nin agregasyonunu azalttığı rapor edilmiştir (Du ve Yan, 2010). HH'de tauroursodeoksikolik asitinin kısmen sitozolden mitokondriye Bax translokasyonunu inhibe ederek ROS üretimini engellediği, mitokondriyal yetmezliği ve apoptozu hafiflettiği bildirilmiştir. Ayrıca, özellikle mitokondriyal biyogenez ve anti-oksidan enzimlerin ana transkripsiyonel ortak düzenleyicisi olan peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör gama koaktivatör-1 α (PGC-1 α)'nın modüle edilmesi mitokondriyal ve anti-oksidan fonksiyonların güçlendirilmesinde faydalı olup, HH'deki mitokondriyal terapötik yaklaşımlar arasındadır (Johri ve Beal, 2012). ALS'de, peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör- γ (PPAR- γ), mitokondriyal fonksiyonu düzenleyebilen bir transkripsiyon faktörü olup; normal mitokondriyal döngüyü sürdürür, redoks dengesini, anti-oksidan yanıtı, bağışıklık reaksiyonunu ve yağ asidi oksidasyonunu stabilize eder. SOD1-G93A farelerinde, PPAR- γ reseptörünün bir agonisti olan pioglitazon ile tedavi, hastalıklı farelerin hayatta kalma süresini uzatır, gliozu azaltır ve motor nöronları p38 aracılı nöral ölümden korur. Ek olarak, Sigma-1 reseptörü, omuriliğin motor nöronlarında seçici ve yüksek oranda eksprese edilen ve genellikle spesifik olarak ER membranında agrega olan yüksek oranda korunmuş bir transmembran proteinidir. Bu reseptörün bir agonisti olan keratin, Ca^{+2} akışını düzenleyerek mitokondri ile ilişkili membran alanlarını stabilize ederken, PI3K/Akt sinyalini etkileyerek ROS oluşumunu azaltır, mitokondriyal biyoenerji sağlar, böylece ALS hastalarının durumlarında stabilite sağlar (Zhao ve diğerleri, 2022).

Hücre içi kalsiyum homeostazının regülasyonu

Hücre içi Ca^{+2} homeostazının homo ve heteroselüler kontrolü, nöral bütünlüğü koruyan beyin fizyolojisini destekler. Ca^{+2} düzensizliği, nörodejenerasyon için belirleyicidir. Dolayısıyla, nörodejenerasyonu önlemek ve nöroproteksiyon sağlamak için hücre içi Ca^{+2} homeostazının regülasyonu yeni terapötik stratejiler arasındadır (Baracaldo-Santamaría ve diğerleri, 2023; Rodríguez ve diğerleri, 2022; Zündorf ve Reiser, 2011). Bu bağlamda, AH'de farklı Ca^{+2} kanallarını hedefleyen veya proteinleri işleyen birkaç ilaç veya küçük molekül geliştirilmiştir ve şu anda hayvan çalışmalarında ve hatta klinik deneylerde validasyon aşamasındadır. Bazıları, AH semptomlarını iyileştirmek için potansiyel terapötik değerler göstermiştir (Tong ve diğerleri, 2018). Bu ilaçlardan NMDAR inhibitörü memantin, AH tedavisi için onaylanmıştır ve NR2B'ye özgü antagonist EVT-101 ise, AH tedavisi için

yakın zamanda geliştirilmiştir (Bezprozvanny, 2009). Memantin, NMDAR için düşük afiniteli, rekabetçi olmayan, aşırı Ca^{+2} akışını önleyen ve pre-sinaptik nöronlardan sürekli glutamat salınımı nedeniyle nöronların eksitotoksitesini önleyen açık kanal blokeridir (Tong ve diğerleri, 2018). MSS için optimize edilmiş L-tipi VGCC'lerin inhibitörü MEM-1003, varsayılan "mitokondriyal ajan" Dimebon ve "mitokondriyal enerji verici" Ketasyn, AH için klinik deneylerdedir (Bezprozvanny, 2009). Nimodipin, isradipin, verapamil, diltiazem ve nifedipin orijinal olarak hipertansiyon tedavisi için kullanılan ABD FDA onaylı Ca^{+2} kanal blokerleridir. Çalışmalar, AH fareleri üzerinde nöroprotektif etkileri olduğunu göstermiştir. Nimodipin şu anda frontotemporal demans için Faz I denemelerindedir, ancak AH'de herhangi bir klinik çalışma yapılmamıştır. Nilvadipinin hafif bilişsel bozulmayı önlediği ve şu anda AH klinik Faz III çalışmalarında test edildiği bildirilmiştir (Tong ve diğerleri, 2018).

PH için ABD FDA onaylı tedavi, SNc nöronlarının içindeki aromatik L-amino asit DCC tarafından DA'ya dönüştürülen levodopa (L-dopa)'dır. Şu anda test edilen veya PH klinik deneylerinde bulunan ilaçlar "mitokondriyal stabilizatörler" (kreatin, koenzim Q10, MitoQ), NMDAR antagonisti memantin, anti-glutamat ajan riluzol ve L-tipi VGCC'lerin inhibitörü isradipindir (Bezprozvanny, 2009). PH'de bir Ca^{+2} kanal blokeri olan isradipinin, L-tipi VGCC'leri seçici olarak inhibe ettiği bildirilmiştir. Çalışmalar, anti-hipertansif dihidropiridin (DHP) isradipin tipi KBB geçirgen Ca^{+2} kanal blokerlerinin reçeteye alınmasının, yaşamın ilerleyen dönemlerinde PH geliştirme riskini %20-30 oranında azalttığını göstermektedir. Bununla birlikte, karmaşık PH patofizyolojisi ve SN DA nöronlarında Ca^{+2} sinyalleşmesinin karmaşık mekanizması göz önüne alındığında, L-tipi VGCC inhibitörlerinin diğer potansiyel nöroprotektif ilaçlarla kombinasyon tedavileri önerilmektedir (Liss ve Striessnig, 2019).

HH'nin semptomatik tedavisi için ABD FDA tarafından anti-dopamin ajanı tetrabenazin onaylanmıştır. NMDAR antagonisti memantin, varsayılan "mitokondriyal ajan" Dimebon ve "mitokondriyal stabilizatörler" kreatin ve koenzim Q10, HH klinik deneylerinde test edilmiştir. Anti-glutamat ajan riluzol test edilmiş ve başarısız olmuştur (Bezprozvanny, 2009). HH'de bir Ca^{+2} kanalı inhibitörü olan verapamilin hücreye girebilecek Ca^{+2} miktarını sınırladığı, buna bağlı olarak kalpain aktivitesini azalttığı ve otofajiyi arttırdığı raporlanmıştır. Artan otofaji ile ilişkili olarak da, mHtt proteininin azaldığı ve daha az agregasyonun olduğu bildirilmiştir (URL-12).

ALS tedavisi için ABD FDA tarafından anti-glutamat ajanı riluzol onaylanmıştır. NMDAR antagonisti memantin ve “mitokondriyal stabilizatörler” kreatin ve koenzim Q10 şu anda ALS klinik denemelerindedir (Bezprozvanny, 2009). ALS ile yapılan bir çalışmada, L- ve T-tipi VGCC'nin bir antagonisti olan lomerizinin sitoplazmik Ca^{+2} birikimini azaltarak kültürlenmiş motor nöronlarda glutamat eksitotoksitesini azalttığı ve motor nöronları mSOD1 toksisitesine karşı koruduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, lomerizinin mutant TDP-43'ün sitoplazmik birikimini önlemede başarısız olduğu da raporlanmıştır (Tran, Gentil, Sullivan ve Durham, 2014).

Mitojenle aktiveleştirilen protein kinaz sinyal yollarının inhibisyonu

Moleküler düzeyde, artan veriler, MAPK sinyal yollarındaki aktivasyonun NH'lerin patolojisinde etkili olduğunu göstermektedir. Bu durum, MAPK'nin inhibisyonu yoluyla inflamasyon başta olmak üzere çeşitli süreçlerin kontrolünün, NH'lere karşı değerli bir yaklaşım olabileceğini düşündürmektedir (Ahmed ve diğerleri, 2020; Kim ve Choi, 2015). Yapılan çeşitli çalışmalarda, ERK inaktivasyonunun (ERK1/2 fosforilasyonunun baskılanması), AH'deki anormal mitokondriyal dinamikleri normalleştirdiği, nöral hücre dizilerini ve birincil kültürlenmiş nöronları doğrudan oksidatif strese koruduğu ve sinaptik plastisitenin düzenlenmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Muraleva, Kolosova ve Stefanova, 2021). Ayrıca, MEK1 ve MEK2'yi inhibe ederek ERK'nin aktivasyonunu önlediği için ERK yolağının güçlü bir inhibitörü olan PD-0325901 ve JNK yolağı inhibitörü D-JNKI-1'in, Tau fosforilasyonunu ve agregasyonunu azalttığı rapor edilmiştir (Siano ve diğerleri, 2019). Benzer şekilde, p38 α inhibisyonunun otofajiyi artırarak Tau patolojisini, yani hiperfosforile Tau seviyelerini azalttığı ve A β 'nin neden olduğu bilişsel bozukluğu iyileştirdiği bildirilmiştir (Asih ve diğerleri, 2020). PH'de, PI3K/Akt ve ERK1/2 sinyal yollarının, DA nöronların MPTP/1-metil-4-fenilpiridinyum (MPP⁺) ile indüklenen nörotoksositeye karşı nöronların korunmasında yer aldığı ve ERK1/2 fosforilasyonunun bloke edilmesinin proinflamatuvar mediyatörlerin üretimini ve mikrogial aktivasyonu önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir. JNK'lerin SP-600125 inhibitörü ile inhibisyonunun DA nöronları hem *in vitro* olarak hem de PH'nin MPTP ve 6-hidroksidopamin (6-OHDA) modellerinde MPP⁺ ile indüklenen nöral apoptozdan koruduğu raporlanmıştır (Bohush, Niewiadomska ve Filipek, 2018). PH'de p38 inhibitörü SB239063 ile tedavinin, NF- κ B inhibitörü (I κ B α)'nın aşağı akış fosforilasyonunu ve p65'in ventral orta beyindeki çekirdeğe translokasyonunu önlediği gösterilmiş olup, buna bağlı p38'in seçici inhibitörlerinin, PH'de nöronların

korunmasına yardımcı olabileceği ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatabileceği belirtilmiştir (Karunakaran ve Ravindranath, 2009). HH farelerinde metformin ile tedavinin, hücresel stresin bir biyobelirteci olan pERK1/2 seviyelerinde bir düşüşe neden olduğu, bunun da ilacın nöroprotektif etkileriyle tutarlı olduğu rapor edilmiştir (Sanchis ve diğerleri, 2019). p38 veya JNK'nın seçici olarak inhibisyonunun, MKP-1 aracılı nöroproteksiyona (MKP-1 aktivasyonu, birincil striatal nöronlarda apoptozu inhibe ederek Kaspaz-3 aktivasyonunu bloke etmiş ve nöral hücre ölümünü azaltmıştır) önemli katkılarının olduğu gösterilmiştir (Taylor ve diğerleri, 2013). ALS'de ERK-1/2 inhibitörü erlotinib, SOD1^{G93A} transgenik farede test edilmiş ve nörolojik sistemde farmakolojik etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Sahu, Upadhyay ve Mehan, 2021). NSC34 motor nöron hücrelerinin JNK inhibitörü AS601245 ile tedavisi, TDP-43'ün neden olduğu hücre ölümünü inhibe etmiştir. Ayrıca, SODG39A hayvan modelinin bir p38 inhibitörü olan SB 239063 ile tedavisinin, bu modelle bağlantılı aksonal taşıma eksikliklerini geri döndürdüğü rapor edilmiştir (Palomo, Nozal, Rojas-Prats, Gil, ve Martinez, 2021).

Nöral hücre döngüsünün regülasyonu

Hücre döngüsü, bölünmeyi tamamlamak için G0, G1, S, G2 ve M aşamalarından geçmektedir. Döngüdeki ilerleme, siklinler, CDK'ler ve CDK inhibitörleri (CDKi) dahil hücre döngüsü proteinlerinin ekspresyonu ve aktivasyonu ile düzenlenmektedir (Zhang, Song ve Peng, 2021a). Anormal hücre döngüsü regülasyonu, nöral hücre ölümüne neden olur, bu da hücre döngüsünü hedefleyen ilaçların nöroprotektif tedaviler geliştirmek için önemli bir araştırma alanı olduğunu göstermektedir. M fazı sonrası nöral hücrelerde, hücre döngüsü modülasyon ajanları, sitokinezin yokluğunda düzensiz nükleik asit çoğaltma olaylarını kısıtlayabilir (Joseph ve diğerleri, 2020). Yapılan bir çalışmada, hücre döngüsü bileşenlerinin yukarı regülasyonunun, sıçanlarda beyin hasarı sonrası kaspaz aracılı nöral apoptoz ve glial proliferasyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan, primer nöral ve astrosit kültürlerinde, hücre döngüsü inhibisyonunun (CDKi; flavopiridol, roskovitin ve olomousin dahil) hücre döngüsü proteinlerinin yukarı regülasyonunu ve ayrıca, etoposid kaynaklı DNA hasarından sonra sınırlı nöral hücre ölümünü ve zayıflatılmış astrosit proliferasyonunu azalttığı bildirilmiştir (Di Giovanni ve diğerleri, 2005). Yüksek seviyelerde APP ifade eden transgenik bir AH fare modelinde nörojenez bozulmuştur ve bu etki, CDK5'in farmakolojik bir inhibitörü olan roskovitin ile muamele sonrası tersine çevrilmiştir (Crews, Patrick, Adame, Rockenstein, ve Masliah, 2011). Yapılan bir çalışmada,

PH'de ubikuitin-proteazom sistemi (UPS)'nin disfonksiyonu gibi hücre döngüsü aktivasyonuna katkıda bulunan diğer tetikleyici faktörler, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF)'nin ve reseptörünün yoksunluğunun, nöral ölümün nedeni olarak hücre döngüsü yeniden giriş fikrini destekleyen DJ-1 navakt nöronlarında da bulunduğu gösterilmiştir. Buna bağlı olarak, hücre döngüsünün durmasına neden olan siklinler, CDKi kullanılarak anormal hücre döngüsü ilerlemesini hedeflemenin, PH tedavisi için umut verici bir terapötik strateji olabileceği bildirilmiştir (López-Grueso, Padilla, Bárcena ve Requejo-Aguilar, 2020). HH'de hücre siklusunun G₀/G₁ fazında etkili olan resveratrolun nöral hücreleri mHtt'nin toksik etkilerine karşı koruduğu, sirtuin 1 (SIRT1) aktivitesini güçlendirdiği ve p53'ün dolaylı inhibisyonunu indüklediği bildirilmiştir (Tellone, Galtieri, Russo, Giardina ve Ficarra, 2015). Hücre siklusunun G₁ ve G₂/M fazındaki etkili olan olomousin ve roskovitinin AH ve PH'nin yanı sıra ALS'de de hem CDK2 hem de CDK5'in aktivasyonunu baskıladığı, ERK1 ve ERK2 sinyal kaskadının aktivitesini de inhibe ettiği raporlanmıştır. Ek olarak, olomousin ile p27 indirgememesinin neden olduğu nöral hücre ölümünün baskılandığı raporlanmıştır (Wu, Stoica ve Faden, 2011).

Nöral ölüm sinyal yollarının regülasyonu

Anahtar bir moleküler sinyal iletim yolağı olan PI3K/Akt sinyal yolağı, yaşlanma ve birçok NH sırasında nöral sağkalımı ve sinaptik plastisiteyi düzenlemek için önemlidir (Majd, Chegini, Chataway, Zhou ve Gai, 2013). PI3K/Akt sinyal yolağı, apoptozu inhibe eden anti-oksitatif enzimlerin transkripsiyonunu indüklemek için Kelch ECH birleştirici protein (KEAP)'den salındıktan sonra çekirdeğe nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2 (Nrf2)'nin translokasyonunu arttırmaktadır (Sharma, Kaur ve Singh, 2020). Dolayısıyla, Akt anti-apoptotik sitokinleri aktive ederken pro-apoptotik sitokinleri inhibe ederek pro-apoptoz ve anti-apoptoz dengesini düzenler (Lee, Huang, Wu ve Hsu, 2005). GSK-3 β yolağı ise, anti-oksidan enzimlerin transkripsiyonunu indükleyen Nrf2-anti-oksidan tepki elemanı (ARE) dizisini inhibe etmektedir. NF- κ B'nin aktivasyonu, inflamatuvar araçları ve apoptozu arttırmaktadır. Janus kinaz/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (JAK-STAT), NF- κ B yolunu aktive etmektedir, ROS üretimini daha da arttırmaktadır ve apoptoza yol açmaktadır (Sharma ve diğerleri, 2020). Akt Ser 9'da GSK-3 β fosforilasyonunu arttırarak veya azaltarak, GSK-3 β üzerinde çok önemli bir negatif düzenleyici fonksiyon gerçekleştirir. Akt'nin inhibisyonu, Ser 9'da GSK-3 β fosforilasyonunu azaltarak GSK-3 β 'yi aktive ederken, Akt'nin aktivasyonu, fosforilasyonu güçlendirerek GSK-3 β 'yi inhibe eder

(Balaraman, Limaye, Levey ve Srinivasan, 2006; Wang ve diğerleri, 2007). Dolayısıyla, nöroproteksiyon ve biliş performansının modülasyonunda önemli olan Akt/GSK-3 β sinyal yolları, NH'lerin tedavisi için olası aday hedeflerdir (Borumand, Motaghinejad, Motevalian ve Gholami, 2019; Lauretti ve diğerleri, 2020). AH'de insan telomeraz ters transkriptaz (hTERT), donepezil ve koenzim Q10'u taklit eden yeni bir aşı peptidi olan GV1001'in, PI3K/Akt aktivasyonu ve ardından GSK-3 β 'nin inhibisyonu yoluyla A β 'yi bloke edebileceği gösterilmiştir (Yu ve Koh, 2017). Bipolar bozuklukların tedavisi için ABD FDA onaylı bir ilaç olan lityum klorür, zayıf ve spesifik olmayan bir GSK3- β inhibitörüdür. Terapötik dozlarda, hiçbir yan etki olmaksızın GSK-3 β aktivitesini yaklaşık %25 oranında azaltabilir. Bu ajanla yapılan küçük klinik çalışmalar, gelişmiş bilişsel performans ve Tau fosforilasyonunda azalma dahil olmak üzere bazı olumlu sonuçlar göstermiştir; bu, lityumun AH için hastalık modifiye edici tedavi olarak potansiyele sahip olabileceğini düşündürmektedir (Lauretti ve diğerleri, 2020). PH ile yapılan *in vivo* deneyler, doğal bir bileşik olan nootkatonenin, rotenon ile indüklenen PH semptomlarını PI3K/Akt sinyal yolunu aktive ederek iyileştirdiğini göstermiştir. Yapılan başka bir çalışmada, yine doğal bir bileşik olan tovofofin A'nın MPTP ile indüklenen PH modelinde Akt/GSK-3 β yolağını modüle ederek DA nöronlar için güçlü bir sitoprotektif etki gösterdiği raporlanmıştır (Huang ve diğerleri, 2020; Yao ve diğerleri, 2022). HH tedavisi için geliştirilmekte olan küçük bir molekül olan pridopidin ile yapılan bir çalışma, bu molekülün BDNF ve/veya PI3K/Akt yollarının modülatör etkileri aracılığıyla nöroprotektif olabileceğini göstermiştir (Geva ve diğerleri, 2016). HH'de, GSK-3 inhibitörü L807mts ile tedavinin, striatal mHtt agregatlarının miktarını azalttığı, motor ve koordinasyon yeteneklerini geliştirdiği bildirilmiştir. Buna, tedavi edilen farelerin striatum dokusundaki otofajik ve lizozomal belirteçlerdeki artışların da eşlik ettiği raporlanmıştır (Rippin ve diğerleri, 2021). ALS'de, SOD1^{G93A} farelerinde PI3K/Akt yolağının aktivasyonunun, gelişmiş motor işlevi ve daha uzun bir kullanım ömrü ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Maximova, Werry ve Kassiou, 2021). Bazı çalışmalar, GSK-3 β inhibitörlerinin ALS hastalığının ilerlemesini azaltabileceğini raporlamıştır. Bu raporda, AH'de etkili olan lityum ile ALS'nin tedavisinin, Fas aracılı apoptoz sinyal yolağını inhibe edebildiği, motor fonksiyon kusurlarını düzeltebildiği ve SOD1^{G93A} farelerinde hastalığın ilerlemesini engelleyebildiği üzerinde durulmuştur (Choi ve diğerleri, 2020).

Protein yanlış katlanması ve agregasyonunun inhibisyonu

Yanlış katlanmış proteinler genellikle moleküler şaperonlar tarafından kısmen açılır ve daha sonra, sonunda amiloid fibrillerine dönüştürülen oligomerik agregatlar oluşturmak için kendi kendini yeniden düzenler. Bu tür protein agregatlarının birikimlerinin, genellikle, MSS'nin amiloidozu ve ayrıca nörodejenerasyon semptomları ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, yanlış katlanmış proteinlerin bir tanıma motifine sahip sentetik şaperonlar veya kısa peptitler, amiloidoz sırasında bu protein agregasyonunu ayırtırmak için terapötik potansiyele sahiptir (Poddar ve diğerleri, 2021: 1-180). AH'de protein agregasyonunun inhibisyonu üzerine yapılan bir çalışmada, doğal olarak oluşan tübülün bağlayıcı bileşik, kombretastatin A-4'ün analogu olan sentetik PNR502'nin 4 insan hücre tipi ve A β ₁₋₄₂ amiloidopatinin hem *Caenorhabditis elegans* hem de fare modelleri dahil olmak üzere çok çeşitli AH-model sistemlerinde protein agregasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Kakraba ve diğerleri, 2019). Bunun yanı sıra, Tau patolojisinin bilişsel bozukluklarla A β lezyonlarından daha iyi korelasyon gösterdiği bilinmektedir. Dolayısıyla, klinik semptomlar belirgin olduğunda Tau'nun hedeflenmesinin A β klirensinden daha etkili olması beklenmektedir. Potansiyel anti-Tau terapileri esas olarak kinazların ve Tau agregasyonunun inhibisyonuna veya mikrotübüllerin stabilizasyonuna dayanmakla birlikte, bu yaklaşımların çoğu toksisite ve/veya etkinlik eksikliği nedeniyle durdurulmuştur. Şu anda, klinik öncesi veya klinik geliştirme deneylerindeki Tau hedefleme tedavilerinin çoğu aktif ve pasif anti-Tau antikoları (o-deglikosilasyon, agregasyon, kinazlar, asetilasyon, kaspazlar veya Tau ekspresyonu inhibitörleri; fosfataz aktivatörleri; mikrotübül stabilizatörleri; ve otofaji veya proteozomal bozulma modülatörleri) ile yapılan immünoterapilerdir (Congdon ve Sigurdsson, 2018).

Tau patolojisini hedef alan sentetik ilaçların klinik denemelerde iki aktif aşı (AADvac1 ve ACI-35) ve altı antikor (LY3303560, RO 7105705, BMS-986168, C2N-8E12, JNJ-63733657 ve UCB0107) bulunmaktadır. Ancak bu denemelerin çoğu hala geliştirmenin erken aşamalarında. 'X', durdurulan veya sonlandırılan denemeleri göstermektedir (Congdon ve Sigurdsson, 2018). PH'de α -syn kümelenmesini hedeflemek için kullanılan bileşikler, bu protein kümelerine karşı antisens oligonükleotidleri (ASO), oligomer modülatörleri (Anle138, SynucleanD and NPT200-11) ve aktive edilmiş abelson reseptör olmayan tirozin kinaz (cAbl) inhibitörleridir (Nilotinib). Ayrıca, patojenik α -syn agregasyonunun, 14-3-3 protein aktivasyonu ve aktif (PD03A) veya pasif (PRX002 ve

BIIB054) immünizasyon kullanımı ile önlenebileceği bildirilmiştir (Van Bulck, Sierra-Magro, Alarcon-Gil, Perez-Castillo ve Morales-Garcia, 2019). HH'de hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak polyQ proteinlerinin güçlü bir konformasyon stabilizatörü ve agregasyon inhibitörü olarak arjinin dikkat çekmektedir (Pozitif yüklü bir polyarjinine bağlı bir polyQ'yu barındıran 8R10Q adlı iki parçalı bir peptit tasarlanmıştır). 8R10Q'nun, kültürlenmiş hücrelerde mHtt proteinlerinin oligomerini ve inklüzyon oluşumunu baskıladığı, iyodin-124-etiketli 8R10Q'nun intranazal uygulamasının da, motor açığın baskılanması ve nöral ölümün iyileştirilmesi ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Minakawa ve Nagai, 2021). ALS'de, hastalığa neden olan insan SOD1-G37R veya SOD1-G93A mutasyonlarını aşırı eksprese eden transgenik farelerde, α -miSOD1 (bir rekombinant insan monoklonal antikoru) antikoru ile tedavi, motor semptomların başlamasını geciktirmiş ve yanlış katlanmış SOD1 ve motor nöron dejenerasyonunun agregasyonunu azaltmıştır. Benzer şekilde, TDP-43'ün agregasyonunun inhibisyonu, D247 olarak adlandırılan TDP-43 nükleer dışı aktarma sinyalinin belirli bir bölgesini tanıyabilen 3B12A monoklonal antikordan türetilen tek zincirli değişken parça kullanılarak hedeflenmiş ve olumlu sonuçlar alındığı raporlanmıştır (Malik ve Wiedau, 2020).

Nöral ölümün baskılanması

Oksidatif stres oluşumu, mitokondriyal değişiklik ve NMDA reseptörlerinin aracılık ettiği nöral ölüm yollarından apoptozun inhibisyonu, NH'ler için uygun bir terapötik strateji oluşturabilir (Cui ve diğerleri, 2021; X Sureda ve diğerleri, 2011). AH'de bir flavonoid glikozit olan hesperidinin esas olarak anti-oksidan mekanizmalarla, Bax ekspresyonunu azaltan nöroproteksiyon uyguladığı, ebselen adlı anti-oksidan ilacın da hastalıklı farelerde apoptozu baskılayabildiği bildirilmiştir (Justin Thenmozhi, William Raja, Manivasagam, Janakiraman ve Essa, 2017; Martini ve diğerleri, 2019). Bununla birlikte, NH'lerde klinik denemelerde kullanılan anti-apoptotik ilaçlardan minosiklinin AH'de bilişsel veya işlevsel bozulmanın ilerlemesini geciktirmediği ve faz II aşamasında kaldığı, diğer bir ilaç olan koenzim Q10'nun AH'li hastalarda bilişsel gerilemeyi yavaşlatamadığı ve faz III aşamasında olduğu raporlanmıştır (Howard ve diğerleri, 2020; Thal ve diğerleri, 2003). PH'de kaspaz inhibisyonunun, farelerde DA nöronları ölümden koruduğu gösterilmiştir (Eberhardt ve diğerleri, 2000). Propargilamin türevi CGP 3466 ilacının anti-apoptotik Bcl-2'nin yukarı regülasyonu ve pro-apoptotik Bax ve aktif-Kaspaz-3'ün azaltılmış ekspresyonunu sağladığı bildirilmiştir (Maruyama ve diğerleri, 2002). Hesperidinin ise

AH'deki gibi temelde anti-oksidan mekanizmalarla, sıçanlarda Kaspaz-3 ve -9 aktivitesini azaltarak nöroproteksiyon gösterdiği raporlanmıştır (Justin Thenmozhi ve diğerleri, 2017). Anti-apoptotik ilaç olan minosiklinin PH, HH ve ALS'de, anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyonunu artırarak mitokondriyal sitokrom-c salınımını inhibe ettiği bildirilmiştir (Çankaya, Çankaya, Kılıç, Kılıç ve Yuluğ, 2019). HH ve ALS'de kaspaz inhibisyonunun, bir transgenik fare modelinde hastalığın ilerlemesini yavaşlattığı gösterilmiştir (Mejia ve Friedlander, 2001; Rohn, 2010). Ayrıca, Bcl-2 aşırı ekspresyonu ve pro-apoptotik Bax ve Bak'ın silinmesinin, lomber omuriliğin motor nöronlarının apoptozunu bloke ederek hastalıklı farelerde nöroproteksiyon uyguladığı gösterilmiştir (Moujalled, Strasser ve Liddell, 2021; Reyes ve diğerleri, 2010). Minosiklinin PH, HH ve ALS'deki klinik çalışmaları incelendiğinde, PH için faz II aşamasında olup, faz III denemelerine geçilebileceği, HH için ilacın faz II aşamasını geçemediği, ALS için ise, faz III aşamasında iken hastalar üzerinde zararlı etkilerinin olduğu raporlanmıştır (The Huntington Study Group DOMINO Investigators, 2010; Gordon ve diğerleri, 2007; Ninds Net-Pd Investigators, 2008). Diğer anti-apoptotik ilaç olan koenzim Q10'nun PH, HH ve ALS ile yapılan klinik denemelerinde, PH ve HH'de bu ilacın faz III aşamasında olduğu ve sırasıyla plaseboya kıyasla herhangi bir klinik faydasının olmadığı ve tedavi olarak kullanımının doğrulanmadığı, ALS'de ise faz II aşamasında olduğu ve verilerin faz III'e geçiş için yeterli olmadığı bildirilmiştir (McGarry ve diğerleri, 2017; Kaufmann ve diğerleri, 2009; Parkinson Study Group QE3 Investigators, 2014).

2.5. Nörodejeneratif Hastalıkların Tedavisinde Nöroprotektif Ajan Olarak Fitokimyasallar

Günümüzde hiçbir NH iyileştirilebilir olmayıp mevcut tedaviler yalnızca semptomları kontrol altına almakta ya da hastalığın ilerlemesini durdurmaktadırlar (Durães, Pinto ve Sousa, 2018). Aynı zamanda, NH hastaları arasındaki fenotipik heterojenite, etkili biyobelirteçlerin olmaması, deneysel modellerin sınırlı translasyonel potansiyeli ve diğer faktörler, NH'ler için ilaç geliştirilmesini engellemektedir (Pasteuning-Vuhman, de Jongh, Timmers ve Pasterkamp, 2021). Dolayısıyla, bu hastalıkları hafifleten çeşitli tedavilerin tanımlanmasına ve moleküler yolları hedefleyerek AH ve diğer NH'lerin ilerlemesini bloke eden ilaçların keşfedilmesine yönelik çalışmalar devam etmekte olup, araştırmalar özellikle çok hedefli terapötik seçeneklere yoğunlaşmıştır. Bu odaklanma, çok hedefli özellikleri olan fitokimyasallar gibi doğal ürünlerin türevleri için de tutarlıdır (Efferth ve Koch, 2011; Kumar ve Khanum, 2012; Kurz ve Perneczky, 2011). Yakın zamanda, yeni

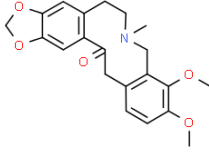
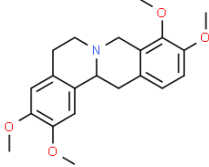
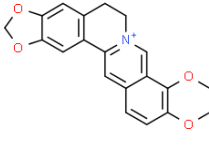
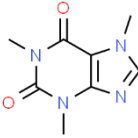
sentetik ilaçlardan daha az toksik, minimal yan etkiye sahip ve daha etkili olmaları nedeniyle nöroprotektif fitokimyasalların NH'deki nörodejenerasyonda önemli bir potansiyele sahip olduğu üzerinde durulmuştur (Kavitha, Kumar, Egbuna ve Ifemeje, 2020: 161-178; Kim, Lee ve Lee, 2010a). Fitokimyasalların geleneksel kullanımlarının geçmişi ve hayvan çalışmalarından elde edilen çok sayıda veri KBB'ye nüfuz etme kabiliyetlerini göstermektedir (Kam ve diğerleri, 2012). Bu durum, NH'lerin önlenmesinde ve tedavisinde birçok moleküler yolağı hedefleyen fitokimyasallara odaklanılmasının önemini göstermektedir (Naoi, Shamoto-Nagai ve Maruyama, 2019). Son zamanlarda fitokimyasallar ile ilgili araştırmalar, bütün bir bitki yerine spesifik aktif bileşenlere odaklanmıştır. Dolayısıyla, bir dizi aktif bileşeni tanımlamaya ve bunların, AH gibi NH'lere karşı etkilerine odaklanarak, terapötik potansiyellerine göre karakterize edilmesine ihtiyaç vardır (Kim ve diğerleri, 2010a; Morales, Guzmán-Martínez, Cerda-Troncoso, Farías ve Maccioni, 2014). Fitokimyasallar, kimyasal yapılarına göre çeşitli gruplara ayrılmaktadır (Kennedy ve Wightman, 2011). Bu doğal ürün türevleri alkaloitler, fenoller, steroidler, glikozidler, tanenler, terpenoidler ve fitoaleksinlerdir (Koche, Shirsat ve Kawale, 2016).

2.5.1. Alkaloitler

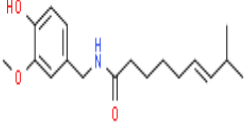
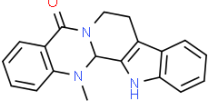
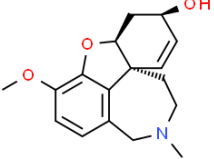
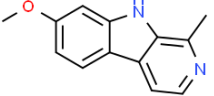
Alkaloitler, düşük molekül ağırlıklı nitrojen içeren amino asit türevi bazik siklik organik bileşikler olup, başlıca bitkilerde bulunurlar (Glenn, Runguphan ve O'Connor, 2013; Verpoorte, 2005: 56-61). Bu zamana kadar yaklaşık 27 bin alkaloit bildirilmiş olup, bunların 21 bini bitki kökenlidir (URL-13). Alkaloitlerin en doğru ve yaygın sınıflaması ana yapıları olan C-N iskeletine göre dağılımlarıdır (Gutiérrez-Grijalva, López-Martínez, Contreras-Angulo, Elizalde-Romero ve Heredia, 2020: 85-117). Buna göre; en büyük iki grup indol alkaloitleri ve izokinolin alkaloitleridir (her biri 4000'den fazla bileşik). Diğer önemli gruplar, tropan alkaloitleri (~300 bileşik), steroid alkaloitler (~450 bileşik) ve piridin ve pirolizidin alkaloitleridir (sırasıyla, ~250 ve 570 bileşik) (Verpoorte, 2005: 56-61). Bu grupların her biri, temsilcilerinin yapısal özelliklerine bağlı olarak birkaç alt gruba ayrılırlar (Bribi, 2018). Birçok alkaloit insanda güçlü biyolojik aktivitelere sahiptir. Bu durum alkaloitlerin dopamin, asetilkolin, nöradrenalin ve serotonin gibi önemli sinyal bileşikleriyle (nörotransmitterler) olan yapısal ilişkisi ile açıklanabilir. Alkaloitlerin asidik koşullar altında suda çözünür olmaları, nötr ve bazik koşullar altında lipidlerde çözünabilmeleri, protonlanmış formda taşınabilmeleri ve nötr formda zarlardan geçebilmeleri onlara tıbbi kullanım için benzersiz özellikler verir (Verpoorte, 2005: 56-61). Dolayısıyla, alkaloitler,

doğrudan birçok vücut fonksiyonunu ve davranışlarını kontrol eden beyin ve omurilik sinir hücreleri de dahil olmak üzere MSS'yi etkileyebilirler (Kumar ve Khanum, 2012). Aynı zamanda, kalp hızının, kan dolaşımının ve solunumun düzenlenmesi de dahil olmak üzere otonom sinir sistemini de etkileyebilirler (Reddy ve diğerleri, 2020). Değişik gruplardaki alkaloidlerin, anti-apoptotik, anti-otofajik, anti-genotoksik, anti-inflamatuar, anti-mutajenik, anti-oksidan, Ca^{+2} homeostaz regülatörü ve nörotransmitter modülatörü vb. gibi çok hedefli özellikleri nedeniyle oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, hücre siklus disregülasyonu, Ca^{+2} homeostazında disregülasyon, MAPK sinyal yollarının aktivasyonu, protein yanlış katlanması/agregasyonu ve azalmış nöral sağkalım mekanizmalarını hedef alarak NH'leri tedavi etme potansiyeli vardır (Fan, Liu, Wu ve Cao, 2019; Girdhar, Girdhar, Verma, Lather ve Pandita, 2015; Hussain ve diğerleri, 2018; Hugel, de Silva, Siddiqui, Blanch ve Lingham, 2021; Liu ve diğerleri, 2018; Michel, Hirsch ve Hunot, 2016; Moura, Richter, Boeira, Pêgas Henriques ve Saffi, 2007; Nie ve diğerleri, 2016; Xie ve diğerleri, 2013; Yang ve diğerleri, 2021; Zhou ve diğerleri, 2020; Zhou ve Zhou, 2012). Bununla birlikte, NH patolojisinde yer alan birden çok hedefe bağlanabilen moleküller olan çok hedefli ligandların geliştirilmesine dayalı yaklaşımlar giderek daha fazla uygulanmaktadır (Lima ve Hamerski, 2019). Şu anda, çok hedefli ligandlar ya patolojide yer alan farklı hedeflere karşı tarama yaparak ya da tek bir moleküler varlıktaki farmakoforların yapılarının kombinasyonu ile rasyonel stratejilerle tasarlanarak araştırılmaktadır (Benek, Korabecny ve Soukup, 2020). Nörotransmitterlerle yapısal benzerliklerinden dolayı alkaloidlerin çok hedefli potansiyelinin akılcı bir şekilde keşfedilmesi, NH için terapötik ajanların araştırılması ve geliştirilmesinin ilk aşamalarında dikkate değer bir katkı oluşturmaktadır (Plazas, Avila, Muñoz ve Cusa, 2022). Bazı NH'lerde çeşitli bitki alkaloidlerinin nöroprotektif etkileri Çizelge 2.3'te özetlenmiştir.

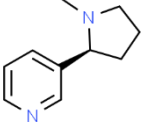
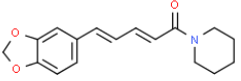
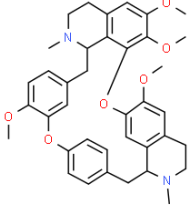
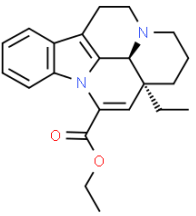
Çizelge 2.3. Nörodejenaratif hastalıklarda bitki alkaloidlerinin nöroprotektif etkileri

Alkaloit	2 Boyutlu Şekli	Alkaloit sınıfı	Etki mekanizması	Hastalık	Kaynaklar
Allokriptopin		İzokinolin alkaloidleri	Aβ ↓ Tau ↓ AChE ↓ BChE ↓ Rekombinant prolil oligopeptidaz ↓	AH	(Iyaswamy ve diğerleri, 2020; Siatka ve diğerleri, 2017)
Tetrahidropalmatin		İzokinolin alkaloidleri	Malondialdehit ve NO• içeriği ↓ GSH seviyeleri ↑ SOD ↑ KAT ↑ GPx ↑ Asetilkolin seviyeleri ↑ AChE aktivitesi ↓ NF-κB ↓ Glial fibriler asidik protein ↓	AH ve PH	(Qu ve diğerleri, 2016)
Berberin		Benzilizokinolin alkaloidleri	TDP-43 agregat oluşumu ↓ Tau hiperfosforilasyonu ↓ α-syn ↓ Mikrotübül ile ilişkili protein hafif zincir 3 ↑ Adenozin 5'-monofosfatla aktive olan protein kinaz ↑	AH, ALS, HH, PH	(Chang ve diğerleri, 2016; Chen, Li, Liu ve Song, 2020; Deng ve Ma, 2021; Jiang, Wei, Gaertig, Li ve Li, 2015)
Kafein		Metilksantin alkaloidleri	Poliglutamin agregatları ↓ Isı şoku tepkisi ↑ Adenozin A2A reseptörü ↓ Oksidatif stres ↓ Nöroinflamasyon ↓ α-syn ↓ Tau hiperfosforilasyonu ↓ Amiloidogenez ↓ Hücre sağkalımı ↑ Apoptoz ↓	AH, HH, PH	(Brunquell, Morris, Snyder ve Westerheide, 2018; Ikram Park, Ali ve Kim, 2020; Luo, Huang, Huang, Lu ve Fu, 2017)

Çizelge 2.3. (devam) Nörodegeneratif hastalıklarda bitki alkaloidlerinin nöroprotektif etkileri

Kapsaisin		Kapsaisin alkaloidleri	Geçici reseptör potansiyeli vanilloid kanal 1 ↑ Oksidatif stres ↓ Nöroinflamasyon ↓ ADAM metalopeptidaz domain 10 (ADAM10) ↑ Aβ oluşumu ↓ Tau hiperfosforilasyonu ↓	AH, HH, PH	(Chung ve diğerleri, 2017; Lastres-Becker ve diğerleri, 2003; Wang, Wang, Mai ve Qu, 2020)
Evodiamin		Kinazolinokarbolin alkaloidleri	Proinflamatuvar mediyatörler [siklooksijenaz-2, indüklenbilir NO• sentaz, interlökin-6 ve tümör nekroz faktörü-α] ↓ AKT/Nrf2/HO-1 ↑ NF-κB p65 ↓	AH, HH, PH	(Meng ve diğerleri, 2021; Pang ve diğerleri, 2020)
Galantamin		İzokinolin alkaloidleri	Kolin esteraz aktivitesi ↓ Nikotinik reseptörler ↑ Dopamin salınımı ↑ Protein kinaz C (PKC)/PI3K/Akt ↑ Hem oksijenaz-1 ↑ Proinflamatuvar sitokinler ↓	AH, ALS, HH, PH	(Aarsland, Hutchinson ve Larsen, 2003; Park, Lee, Im, Chu ve Kim, 2008; Romero, Egea, García ve López, 2010; Saito ve diğerleri, 2019)
Harmin		β-karbolin harmala alkaloidleri	α-syn ↓ Ubikuitin proteazom sistemi alt tabakalarının ayrışması ↑ Protein kinaz A fosforilasyonu ↑ Eksitatör amino asit taşıyıcı 2 (EAAT2)/Glutamat taşıyıcı-1 (GLT-1) ↑ Glutamat alımı ↑ GSK-3β/Çift özgüllük tirozin fosforilasyonla düzenlenen kinaz 1A (DYRK1A) ↓ Tau proteininin hiperfosforilasyonu ↓	AH, ALS, HH, PH	(Cai ve diğerleri, 2019; Li ve diğerleri, 2011; Liu ve diğerleri, 2021a; Sun, Zhang, Li ve Wang, 2014)

Çizelge 2.3. (devam) Nörodegeneratif hastalıklarda bitki alkaloidlerinin nöroprotektif etkileri

Nikotin		Piridin alkaloidleri	Konneksin 36 aktivitesi ↑ Isı şoku proteini 70 ↑ Apoptozu tetikleyen faktörün translokasyonu ↓ IP3 reseptörü ↑ Mitokondriyal biyogenez ↑ Aβ plakları ↓ Aβ oligomerleri ↓ ROS ↓	AD, ALS, HD, PD	(Corsini, Tortora, Rauti, ve Nistri, 2017; Getachew, Csoka, Aschner ve Tizabi, 2019; Godoy, Valdivieso ve Inestrosa, 2018; Lu ve diğerleri, 2021)
Piperin		Piperidin alkaloidleri	α-syn ↓ Hücre canlılığı ↑ Otofaji akışı ↑ Otofagozom-lizozom membran füzyonu ↑ Oksidatif nitrozatif stres ↓ Nöroinflamasyon ↓	AD, ALS, HD, PD	(Li ve diğerleri, 2021; Salman, Tabassum ve Parvez, 2020; Wang ve diğerleri, 2019; Zhang, Wu, Huang, Chen ve Ni, 2021b)
Tetrandrin		Bisbenzilizokinolin alkaloidleri	Oksidatif stres ↓ İnflamasyon ↓ Nörotoksosite ↓ P-glikoprotein ↓	AH, ALS, HH, PH	(Bao, Li, Qi, Wang ve He, 2016; Li ve diğerleri, 2015a; Ren ve diğerleri, 2021)
Vinposetin		Vinka alkaloid vinkamin türevi	Oksidatif stres ↓ Nöroinflamasyon ↓ Anti-oksidan savunma sistemi ↑ Nöroinflamatuvar sitokinler ↓	AH, ALS, PH	(Ishola, Akinyede, Adeluwa ve Micah, 2018; Ratra, Sharma ve Gupta, 2011; Shekarian ve diğerleri, 2020)

İzokinolin alkaloidler ve nörodejeneratif hastalıklar üzerindeki etkileri

İzokinolin alkaloidler, başlıcaları Berberidaceae, Rutaceae, Fumariaceae, Rubiaceae, Amaryllidaceae, Magnoliaceae, Papaveraceae, Menispermaceae, Ranunculaceae, Cactaceae ve Annonaceae vb. olmak üzere bitkilerde bolca bulunurlar (Singh, Pathak, Fatima ve Negi, 2021). İzokinolin alkaloidleri, 4'-O-metilnorbelleadinin biyosentezinde anahtar ara ürünler üretmek için kullanılan fenilalanin ve tirozin aromatik amino asitlerinden türetilmiştir (Cahliková ve diğerleri, 2021). Bu grup alkaloidler aşağıdaki gibi daha ileri şekilde de sınıflandırılabilirler: Basit izokinolin alkaloidleri, benzil izokinolin alkaloidleri, bisbenzilizokinolin alkaloidleri (bir eter bağı içeren, iki eter bağı içeren, yalnız aril bağı içeren, bir aromatik bağı ve bir veya iki eter bağı içeren), manzamin alkaloidleri, psödobenzilizokinolin alkaloidleri ve sekobisbenzilizokinolin alkaloidleri (Dey ve diğerleri, 2020). Bitkilerden izole edilen izokinolin alkaloidleri, benzersiz yapısal çeşitliliğe ve değişken farmakolojik aktivite aralığına sahip geniş bir multimodal ajan kaynağını içermektedir (Plazas, Avila, Muñoz ve Cusa, 2022). İzokinolin alkaloidleri, beynin sinapslarında GABA'nın artmasına neden olan oldukça güçlü analjezik ve narkotik bir ilaç olma özelliklerini taşımaktadırlar (Kumar ve diğerleri, 2015). Özellikle bu grupta üzerinde en çok çalışılan alkaloidlerden biri olan berberinin NMDA, NO• ve serotonin gibi nörotransmitter sistemleri modüle ettiği de bilinmektedir (Cheng ve diğerleri, 2022; Kumar ve diğerleri, 2015). Bu nedenle, son zamanlarda yapılan araştırmalar izokinolin alkaloidlerinin multimodal kapasitesini önererek, özellikle çok faktörlü patolojiler içeren NH'ler alanında, bu alkaloidlerin polifarmakolojik araştırmalarına artan bir ilgiyi teşvik etmiştir. Araştırmalara göre, izokinolin alkaloidlerinin NH'deki çok hedefli aktivitesinin, bazik nitrojen içeren ve hidroksi metoksi grupları ile ikame edilen dihidro veya tetrahidro iskeleler tarafından desteklendiği düşünülmektedir (Plazas, Avila, Muñoz ve Cusa, 2022). Bu bağlamda ilaç keşfi ve geliştirme sürecinde önde gelen bileşikler olarak izokinolin alkaloidlerinin başarı şansı yüksektir. Bu nedenle, umut vadeden ilaç öncülleri olarak yeni izokinolin alkaloid arayışları doğal ürün kimyası sektöründe aktif araştırma alanı olmayı sürdürmektedir. İzokinolin alkaloidleri üzerine geçmiş 200 yılda birkaç bin yayın (dergi makaleleri, kitaplar ve patentler) kaydedilmiştir. Artan yayın sayıları, bu alandaki araştırma yoğunluğunu, önemini ve aynı zamanda bu bileşiklerden ilaç geliştirilmesine yönelik parlak beklentiyi yansıtmaktadır (Shang ve diğerleri, 2020).

Tetrahidropalmanın biyolojik aktivitesi ve nörodejeneratif hastalıklar üzerindeki etkisi

Tetrahidropalmanın, sedatif ve hipnotik etkilerini açığa çıkarmak için geniş araştırmalardan geçen doğal bir izokinolin alkaloitidir. Tetrahidropalmanın etki mekanizması olarak DA nörotransmisyon sistemini hedef aldığı varsayılır (Leung, Zheng, Huen, Law ve Xue, 2003; Yu ve diğerleri, 2018). Qu ve diğerleri (2016) tetrahidropalmanın, azalan malondialdehit ve NO• içeriği, artan GSH düzeyleri ve artan SOD, KAT ve GPx aktiviteleri ile ilişkili D-galaktoz aracılı hafıza bozukluğu üzerinde etkili olduğunu göstermişlerdir. Dahası, tetrahidropalmanın anormal asetilkolin düzeylerini ve AChE aktivitesini geri çevirdiğini göstermişlerdir. Ek olarak, tetrahidropalmanın NF-κB ve glial fibriler asidik proteinin ekspresyonlarını azalttığını ve bu yolla D-galaktoz verilen sıçanlarda nöroinflamasyon ve hafıza bozukluğunu önlediğini keşfetmişlerdir. Bu sonuçlar, tetrahidropalmanın klinik uygulamaları için deneysel bir dayanak oluşturmuştur. Liu, Liu, Zhao, Zhao ve Wang (2021b) yaptıkları çalışmada tetrahidropalmanın metamfetamin tarafından indüklenen nörotoksiteyi azaltmak için tirozin kinaz reseptörü B (TrkB)/CAM etkileşimi yoluyla BDNF'yi düzenlediğini bulmuşlardır. Tetrahidropalmanın, metamfetamin ile ilgili nörotoksik ve NH'ler için potansiyel bir terapötik ilaç olabileceğini tespit etmişlerdir. Zhang ve diğerleri (2018) yaptıkları çalışmada tetrahidropalmanın, AChE aktivitesinde ketamin kaynaklı dalgalanmayı zayıflattığını bulmuşlardır. Elde edilen sonuçlar tetrahidropalmanın asetilkolin seviyelerinde ketamin kaynaklı düşüşü geçersiz kıldığını göstermiştir. Ayrıca, ketaminle indüklenmiş farelerde tetrahidropalmanın sinir hücresi apoptozuna karşı koruyucu etki gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Tetrahidroberberin N-oksit (trans-kanadin-N-oksit)'in biyolojik aktivitesi ve nörodejeneratif hastalıklar üzerindeki etkisi

Kanadin olarak da bilinen tetrahidroberberin, önemli farmakolojik özellikler ve oksidatif hasara karşı anti-oksidan koruma gösteren doğal bir izokinolin alkaloitidir (Mari ve diğerleri, 2018; URL-14). Tetrahidroberberinin biyolojik aktivite profilinin homolog berberinlerin profilinden farklı olduğu, daha az sitotoksik olduğu ve anti-oksidanlar ve iyon kanalı blokerleri olarak daha iyi nöroprotektif potansiyel gösterdiği bildirilmiştir (Pingali, Donahue ve Payton-Stewart, 2015). Wu ve diğerleri (2010) yaptıkları çalışmada SNpc'deki DA nöronlarda tetrahidroberberin tarafından nöral ATP'ye duyarlı potasyum (K⁺) kanallarının blokajının PH'de nöroprotektif etkilerine katkıda bulunabileceğini tespit etmişlerdir. Jing ve diğerleri (2022) yaptıkları çalışmada demetilentetrahidroberberinin davranış bozukluğunu

hafiflettiğini ve anti-apoptotik, anti-inflamatuar ve anti-oksidan etkiler dahil çoklu hedef etkileri yoluyla DA nöronları koruduğunu göstermişlerdir. Chlebek ve diğerleri (2016) yaptıkları çalışmada *Corydalis cava* (L.) Schweigg. et Koerte (Fumariaceae) bitkisinin kanadin içeren alkaloit ekstraktının AH hedeflerine (prolil oligopeptidaz, kolinesterazlar ve β -sekretaz) karşı çok işlevli aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca *Corydalis cava* alkaloit ekstraktının halk hekimliğinde hafıza bozukluklarındaki tedavi etkinliğini aydınlatmaya çalışmışlardır.

Allokriptopinin biyolojik aktivitesi ve nörodejeneratif hastalıklar üzerindeki etkisi

Allokriptopin ($C_{21}H_{23}NO_5$) bir izokinolin alkaloiti olup, genellikle kuvvetli elektrostatik etkileşim ile stabilize edilmiş bir üçüncül azot ve karbonil grubu içeren on üyeli heterosiklik bir halka ile serbest (trisiklik) baz olarak formüle edilir ve molekül ağırlığı 369,41 g/mol'dür (Shamma, 1972: 1-624; Shamma ve Moniot, 1978: 1-426; Vacek, Walterova, Vrublova ve Simanek, 2010). Allokriptopin, çok sayıda fitopreparasyonun bileşenidir ve geniş yelpazede biyolojik işleve sahiptir. Bunlar arasında anti-inflamatuar ve nöroprotektif aktiviteler vardır (Vacek ve diğerleri, 2010). Siatka ve diğerleri (2017) yaptıkları çalışmada *Argemone platyceras* Link et Otto (Papaveraceae) bitkisinden elde edilen allokriptopinin kolinesteraz ve oligopeptidaz inhibitör aktivitesini belirlemişlerdir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda AChE, BChE ve prolil oligopeptidazın inhibisyonunun, NH'lerin tedavisinde faydalı hedefler olabileceği tespit edilmiştir. Iyaswamy ve diğerleri (2020) yaptıkları çalışmada allokriptopin içeren yeni bir Çin ilacı olan NeuroDefend'in, deneysel AH modellerinde anti-A β ve anti-Tau etkisini desteklemişlerdir. NeuroDefend formülü, 3XTg-AD ve 5XFAD fare modellerinde uzamsal belleği ve öğrenme belleğini geliştirmiştir. Bu çalışma, AH'nin tedavisi için yeni bir Çin ilaç formülünün geliştirilmesine katkıda bulunmuştur. Ivanov ve diğerleri (2020) yaptıkları çalışmada Bulgaristan'da yetişen 3 farklı *Corydalis* türünün toprak üstü kısımlarından (yaprak, gövde ve çiçek) elde edilen allokriptopin içeren alkaloit ekstraktlarının AChE inhibitör aktivitesini belirlemişlerdir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar, incelenen *Corydalis* türlerini, farklı NH'lerin tedavisi için doğal bileşiklerin yeni perspektif kaynakları olarak tanımlamıştır. Dong ve diğerleri (2022) yaptıkları çalışmada *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. bitkisinden elde edilen allokriptopin içeren total alkaloit ekstraktının anti-inflamatuar etkisinin potansiyel hedeflerini ve sinyal yollarını çeşitli araçlar (Swiss Target Prediction, GeneCards ve STRING gibi) kullanarak tespit etmişlerdir. Al-Snafi, Talab ve Majid (2019) yaptıkları çalışmada *Eschscholzia californica*'dan elde edilen

allokriptopinin sıçan beyni sinaptik membran reseptörlerine GABA bağlanmasını arttırdığını göstermişlerdir. Bu etki ile, allokriptopinin benzodiazepin benzeri bir aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

2.6. *Glaucium grandiflorum* Boiss. & A. Huet subsp. *refractum* (Nábělek) Mory Bitkisi ve Sekonder Metabolitleri

Papaveraceae familyasının önemli cinslerinden birisi *Glaucium*'dur. *Glaucium*, halk arasında "boynuzlu gelincik" ve "çömlekçatlatan" olarak bilinmektedir (Kılıç, Yıldız ve Kılıç, 2018). *Glaucium* cinsinin dünya dağılım çizelgesine göre Avrupa, Afrika, Asya, Tropik Asya ve Avustralya'da yayılış gösterdiği görülmektedir. En çok yayılış İran'da görülmektedir. *Glaucium* cinsi İran'da 17 tür ile yayılış göstermektedir. Ülkemizde ise *Glaucium* cinsi A1(A)-A2-5, A7-9, B1-9, C1-6 karelerinde yayılış göstermektedir. Bununla birlikte, ülkemizde dünyada yayılış gösteren türlerin yaklaşık üçte biri yetişmektedir (Kılıç, Yıldız ve Kılıç, 2019). *Glaucium* cinsi bir, iki ya da çok yıllık otsu bitkilerdir. Yapraklar elsi bölmeli veya tüysü derin parçalıdır. Segmentler çoğunlukla loblu ya da dişli özellik göstermektedirler. Çiçekler tek ve gösterişlidir. Çanak yaprakları 2 adettir ve erken dökülücü özellik göstermektedirler. Taç yaprakları 4 adettir. Sarı, turuncu, kırmızı ya da açık mor renkte olup, genellikle tabandan lekelidirler (Mungan, 2016). Erkek üreme organları çok sayıdadır. Dişi üreme organları doğrusal, yumuşak kılsı, yumru gibi veya çıplak, tüsüzdür. Meyveleri, tohumlarının içine gömülü olduğu süngerimsi bölme ile birlikte silikuvu şeklinde, doğrusal ve 10-25 cm'dir. Tohumlar çok sayıdadır. *Glaucium* cinsi genellikle kumlu, taşlık, kuru alanlarda ve 0-2000 m yükseklikte yetişmektedirler (Kılıç ve diğerleri, 2019). *G. grandiflorum*, Kafkas Dağları'nın güney kesiminde Türkiye'ye özgüdür ancak Suriye, İran ve Sina'da da bulunur. *G. grandiflorum*, onu diğer *Glaucium* türlerinden ayıran özelliklere sahiptir. Sadece bir ana çiçek sapına sahipken, diğer türler rozetin tabanından büyüyen birden fazla çiçek sapına sahiptir. Çanak yaprakların yüzeyi kıllı yapan kısa, sert tüyleri vardır. Yapraklar, taç yaprağının tabanında siyah bir nokta ile koyu turuncudan koyu kırmızıya kadardır. Çiçeğin pedikülü, diğer *Glaucium* türlerinden farklı olarak, alttaki yaprağı aşmaktadır (Getlawi, Shahba ve Hughes, 2019). *G. grandiflorum*, Türkiye'de halk ilacı olarak kanın temizlenmesi ve göz hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Bitkinin terapötik faydası genellikle alkaloidlerine atfedilir. *G. grandiflorum*'un alkaloidleri üzerine yapılan çalışmalarda, protoberberin, protopin, aporfin ve benzofenantridin tipi alkaloidlerin varlığı ortaya konulmuştur. Türkiye'den toplanan *G. grandiflorum* Boiss. & Huet var. *grandiflorum*'un alkaloidleri şunlardır: protoberberin ((-)- α -N-metilkanadin, (-)- β -N-

metilkanadin), protopin (allokriptopin, protopin), aporfin (izokoridin, koritüberin, koridin) , benzilizokinolin ((+)-retikülin ve berbitin) tipi alkaloitler (Özsoy ve diğerleri, 2018). Bozkurt ve diğerleri (2018) yaptıkları çalışmada Türkiye florasında yer alan *Glaucium* türlerinin GC-MS tekniği ile alkaloit profillerini araştırmışlardır. *G. grandiflorum*'un (Merkez, Gümüşhane) alkaloit profilinde M353, kanadin, allokriptopin ve kriptopin saptanmıştır. *G. corniculatum* subsp. *refractum*'un (Suçatı, Sivas) alkaloit profilinde retikulin, M311, izokoridin, M341, glausin, M339, allokriptopin, M369, M355, dihidrosanguinarin, M383, M339 ve dehidroglausin bulunurken, *G. corniculatum* subsp. *refractum*'un (Gürün, Sivas) alkaloit profilinde ise M353, glausin, kanadin, protopin, allokriptopin, dihidrosanguinarin, dihidroşeleritrin, M351, dehidroglausin, M337, norsanguinarin ve M365 bulunmuştur. Shafiee ve diğerleri (1985) yaptıkları çalışmada İran kaynaklı (Pol-Dokhtar) *G. corniculatum* (L.) Rudolph. subsp. *refractum* (NAB) Cullen'de dehidrodisentrin, disentrin, protopin, glausin, allokriptopin, bulbokapnin, isokoridin, koridin, N-metillaurotetanin ve O-metilflavinantin alkaloitlerini tespit etmişlerdir. Doncheva ve diğerleri (2014) yaptıkları çalışmada Bulgaristan veya Cezayir kaynaklı *G. corniculatum*'da on yedi izokinolin alkaloiti tanımlamışlardır. *G. corniculatum*'un iki kaynağından elde edilen majör alkaloit allokriptopindir. Aynı çalışmada, *G. corniculatum*'daki bu tür izokinolin alkaloitlerinin biyosentezinin, bitkinin büyüdüğü coğrafi bölgeye bağlı olduğu ve bitkilerin kaynağının belirlenmesinde kemotaksonomik belirteçler olarak kullanılabileceği de bildirilmiştir. Kocanci ve diğerleri (2017) yaptıkları çalışmada *G. corniculatum* (L.) RUD. subsp. *refractum* (Nábělek) Cullen (*G. grandiflorum* Boiss. & A. Huet subsp. *refractum* (Nábělek) Mory)'den elde edilen metanol ve su ekstraktının total alkaloit, flavanoid ve fenolik içeriklerini belirlemişlerdir. *G. corniculatum* (L.) RUD. subsp. *refractum* (Nábělek) Cullen (*G. grandiflorum* Boiss. & A. Huet subsp. *refractum* (Nábělek) Mory)'nin tüm ekstraktlarında alkaloitin majör bileşik olduğu, flavonoid ve fenolik içeriklerinin ise daha az olduğu tespit edilmiştir. Kocanci ve Aslim (2021) yaptıkları çalışmada *G. corniculatum* (L.) RUD. subsp. *refractum* (Nábělek) Cullen (*G. grandiflorum* Boiss. & A. Huet subsp. *refractum* (Nábělek) Mory)'nin kloroform, metanol ve su ekstraktlarının kimyasal bileşimini tespit etmişlerdir. Ekstraktların farklı nispi oranlarda alkaloit, yağ asidi, alkol, alkan hidrokarbon, ester, eter, alkan, alken, alifatik, aromatik ve fenolik bileşikler içerdiğini belirlemişlerdir. Üç ekstraktın hepsinde, majör bileşik allokriptopin olarak bulunmuştur. Oleamid ve 2-monopalmitin sırasıyla su ve metanol ekstraktlarında tanımlanan ana yağ asitleridir.

2.6.1. *G. grandiflorum*'un nörodejeneratif hastalıklar üzerindeki etkileri

Literatürde, *G. grandiflorum*'un NH'ler üzerindeki etkilerini gösteren çalışmalar tarandığında bu çalışmaların kısıtlı sayıda olduğu gözlenmiştir. *G. grandiflorum*, *G. corniculatum* ve *G. corniculatum* (L.) RUD. subsp. *refractum* (Nábělek) Cullen (*G. grandiflorum* Boiss. & A. Huet subsp. *refractum* (Nábělek) Mory)'den elde edilen sekonder metabolitlerin, anti-oksidan, anti-apoptotik, anti-tümör, anti-proliferatif, anti-genotoksik, anti-inflamatuar, anti-kolinesteraz, analjezik, DNA hasarını önleyici, siklooksijenaz-2 inhibitör ve nörokoruyucu etkinliğe sahip olduğuna dair çalışmalar vardır (Akaberi ve diğerleri, 2021; Bozkurt ve diğerleri, 2018; Kocanci ve Aslim, 2017; Kocanci ve diğerleri, 2017; Kocanci ve Aslim, 2021; Kocanci, Hamamcioglu ve Aslim, 2022; Morteza-Semnani ve diğerleri, 2002; Morteza-Semnani ve diğerleri, 2004; Orhan ve diğerleri, 2004; Özsoy ve diğerleri, 2018; Saraç ve diğerleri, 2018). Ancak, *G. grandiflorum*'un Ca^{+2} homeostazı, MAPK ve nöral ölüm yolları üzerinde etkisini ileri düzey moleküler çalışmalar ile ortaya koyan bir literatüre rastlanmamış olup, bu etkiler ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir. Bozkurt ve diğerleri (2018) yaptıkları çalışmada, Türkiye florasında yetişen *Glaucium* türlerinin alkaloid profillerini ve biyolojik aktivite potansiyellerini araştırmışlardır. *G. corniculatum* (Harmancık, Gümüşdere), *G. grandiflorum* (Merkez, Gümüşhane) ve *G. corniculatum* subsp. *refractum*'un (Suçatı ve Gürun, Sivas) AChE, BChE ve prolin oligopeptidaz inhibitör aktivitesi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Özsoy ve diğerleri (2018) yaptıkları çalışmada, *G. grandiflorum* Boiss. & Huet var. *grandiflorum*'un anti-oksidan, anti-AChE, anti-inflamatuar, DNA hasarını önleyici ve siklooksijenaz-2 inhibitör etkilerinin olduğunu göstermiştir. Orhan ve diğerleri (2004) yaptıkları çalışmada *G. corniculatum* (L.) J. H. Rudolph'un 1 mg/mL'de %50'nin üzerinde kayda değer AChE inhibitör aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Kocanci ve Aslim (2017) yaptıkları çalışmada *G. corniculatum* (L.) RUD. subsp. *refractum* (Nábělek) Cullen (*G. grandiflorum* Boiss. & A. Huet subsp. *refractum* (Nábělek) Mory)'den elde edilen metanol ve su ekstraktlarının doza bağımlı bir şekilde anti-inflamatuar etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. *G. corniculatum* (L.) RUD. subsp. *refractum* (Nábělek) Cullen (*G. grandiflorum* Boiss. & A. Huet subsp. *refractum* (Nábělek) Mory)'nin metanol ve su ekstraktlarında tespit edilen rutin ve kersetin flavonoidlerinin anti-inflamasyon yoluyla nöroprotektif etkiye sahip olduğunu bulmuşlardır. Kocanci ve diğerleri (2017) yaptıkları çalışmada *G. corniculatum* (L.) RUD. subsp. *refractum* (Nábělek) Cullen (*G. grandiflorum* Boiss. & A. Huet subsp. *refractum* (Nábělek) Mory)'nin metanol ve su ekstraktlarının anti-AChE etkileri ile NH'lerde etkili olabileceğini

göstermişlerdir. Kocanci ve Aslim (2021) yaptıkları çalışmada *G. corniculatum* (L.) RUD. subsp. *refractum* (Nábělek) Cullen (*G. grandiflorum* Boiss. & A. Huet subsp. *refractum* (Nábělek) Mory)'nin kloroform, metanol ve su total ekstraktlarının fPC12 hücrelerinde apoptozu baskıladığını ve allokriptopin, oleamide ve 2-monopalmatine'nin apoptozu baskılayıcı etkiden sorumlu olabileceğini tespit etmişlerdir. Kocanci ve diğerleri (2022) yaptıkları çalışmada *G. corniculatum* (L.) RUD. subsp. *refractum* (Nábělek) Cullen (*G. grandiflorum* Boiss. & A. Huet subsp. *refractum* (Nábělek) Mory)'den elde edilen rutin ve kersetin flavonoidleri bakımından zengin metanol ve su ekstraktlarının AChE inhibitörü ve anti-genotoksik etkisi ile nöroprotektif aktivitesi arasındaki ilişkiyi göstermişler ve bu terapötik etkinliğin flavonoid içeriği ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışmada kullanılan bitki

Çalışmada Gazi Üniversitesi Herbaryum materyali olan, *Glaucium grandiflorum* Boiss. & A. Huet subsp. *refractum* (Nábělek) Mory kullanılmıştır. Bu isim, *Glaucium* cinsindeki *Glaucium grandiflorum* Boiss. & A. Huet türünün, tür altı bir taksonunun kabul edilen adıdır. *Glaucium grandiflorum* Boiss. & A. Huet subsp. *refractum* (Nábělek) Mory'nin üç sinonimi bulunmaktadır. Bunlar; *Glaucium corniculatum* subsp. *refractum* (Nábělek) Cullen, *Glaucium grandiflorum* var. *helissopelma* Fedde ve *Glaucium refractum* Nábělek) (Tavakkoli ve Assadi, 2019; URL-15, 16). Bitki materyali, Prof. Dr. Zeki AYTAÇ tarafından 27.07.2015'te Beypazarı/Ankara'dan toplanmış ve daha sonra teşhis edilmiştir. Materyalin herbaryum numarası ZA10700'dür. Teşhisi yapılan bitkinin deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere toprak üstü bölümleri kurutulmuş olup, toz halinde saklanmıştır. Doktora tez çıktısı olan yayın ve bildiriler, 1001 TÜBİTAK 116S299 No'lu proje ve Gazi Üniversitesi BAP kaynaklı doktora tez projesinde (FDK-2021-7249) bitkinin *Glaucium corniculatum* (L.) RUD. subsp. *refractum* (Nábělek) Cullen adlı sinonim ismi kullanılmış olup, bu tezde bitkinin kabul edilen ismi olan *Glaucium grandiflorum* Boiss. & A. Huet subsp. *refractum* (Nábělek) Mory kullanılmıştır. Tez sonrası yapılacak çalışmalarda da yine bitkinin kabul edilen ismi kullanılacaktır.

3.1.2. Çalışmada kullanılan PC12 hücre hattı

Çalışmada kullanılan hücreler, *Rattus norvegicus*'dan elde edilen ve rat adrenal medullasından türetilen feokromositoma-12 (PC12, ATCC® CRL-1721™) hücre hattıdır (Koshimura, Tanaka, Murakami ve Kato, 2003; Molatore ve diğerleri, 2010; Slanzi, Iannoto, Rossi, Zenaro ve Constantin ve diğerleri, 2020). Oksidatif stres indüklü nöral hasar ve oluşan nöral hasara karşı nöroprotektif etki mekanizmalarının incelenmesinde nöron büyüme faktörü (nerve growth factor, NGF) ile farklılaştırılmış PC12 (fPC12) hücre hattı kullanılmıştır (Baran, 2022; Jiang ve diğerleri, 2016a; Kudo ve diğerleri, 2015; Lenkiewicz ve diğerleri, 2016; Muthaiyah, Essa, Chauhan ve Chauhan, 2011; Liu ve diğerleri, 2017a; Sierra-Fonseca ve diğerleri, 2014; Xiao ve diğerleri, 2008, 2011; Zhang, Ye ve Dong, 2010).

3.2. Yöntem

3.2.1. Alkaloit ekstraktlarının elde edilmesi

Bu deneyde, GC-MS analizinde ve diğer çalışmalarda kullanılmak üzere *G. grandiflorum* bitkisinden üç çözücü (kloroform, metanol ve su) ile üç farklı alkaloit ekstraktı hazırlanmıştır. Çalışmada metanol çözücüsü ile yapılan alkaloit ekstraktında kullanılan yöntem, Khamtache-Abderrahim ve diğerleri (2016) ile Sarıkaya ve diğerleri (2013) tarafından kullanılan yöntemlerden modifiye edilmiştir. Buna göre, 10 g toz bitki örnekleri, 8 saat boyunca Soxhlet aparatında (LabHeat, Almanya) 150 mL metanol çözücüsü ile ekstrakte edilmiştir. Çözücüler, sıcaklık kontrollü (40 °C) ve düşük basınç altında dönen evaporatör (Heidolph Laborota 4000, Almanya) ile uzaklaştırılmıştır. Bitki ekstraktları 10 mL yüzde (%) 2'lik sülfürik asit içerisinde çözündürülmüş ve 3 × 50 mL dietil eter ((C₂H₅)₂O) ile muamele edilmiştir. Sulu asit çözeltisi, amonyum hidroksit (NH₄OH) ile pH 9,0'a ayarlanmış ve üzerine 3 × 50 mL kloroform eklenmiştir. Sodyum sülfat (Na₂SO₄) ile kurutulan örneklerin çözücüleri, sıcaklık kontrollü (40 °C) ve düşük basınç altında dönen evaporatör içinde buharlaştırılmıştır. Kloroform ve su çözücüsü ile hazırlanan alkaloit ekstraktında da benzer işlemler yapılmış olup, metanol çözücüsü ile hazırlanan alkaloit ekstraktından farklı olarak detaylarda Friedman, Levin, Choi, Kozukue ve Kozukue (2006), Udoidong, Etuk ve Udo (2014), Hu, Ding, Chen ve Han (2017) ile Xu ve diğerleri (2021) tarafından kullanılan yöntemlerden yararlanılmıştır. Elde edilen alkaloit ekstraktları deneysel çalışmalarda kullanılabilecek kadar +4 °C'de saklanmıştır.

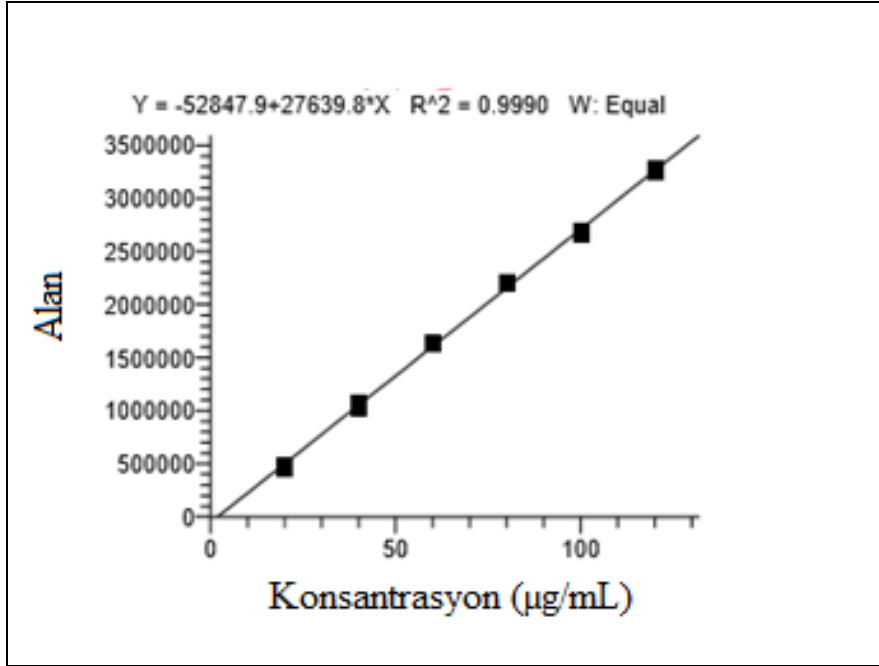
3.2.2. Alkaloit ekstraktlarının kalitatif ve kantitatif içeriğinin GC-MS ile belirlenmesi

Bu çalışmada, kloroform, metanol ve su alkaloit ekstraktlarının kalitatif ve kantitatif içerik analizi, Ege Üniversitesi Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı (FABAL)'da Trace GC Ultra MS DSQ II (versiyon; 2.0, Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazı kullanılarak GC-MS ile yapılmıştır (hizmet alımı). Bunun için, 2 mg alkaloit ekstraktı 100 µL metanol içinde çözünerek hazırlanmış ve 1:20 oranında dilüe edilerek cihaza yüklenmiştir. Kromatografik piklere sahip spektrumlar Xcalibur™ yazılımı (versiyon; 2.07, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. WILEY7, REPLIB, MAINLIB, PMWTOX 3N kütüphaneleri veritabanlarının standart referans spektrumları karşılaştırılarak ve WILEY7 kütüphane veritabanı temel alınarak alkaloitlerin kütle spektral fragmentasyonu

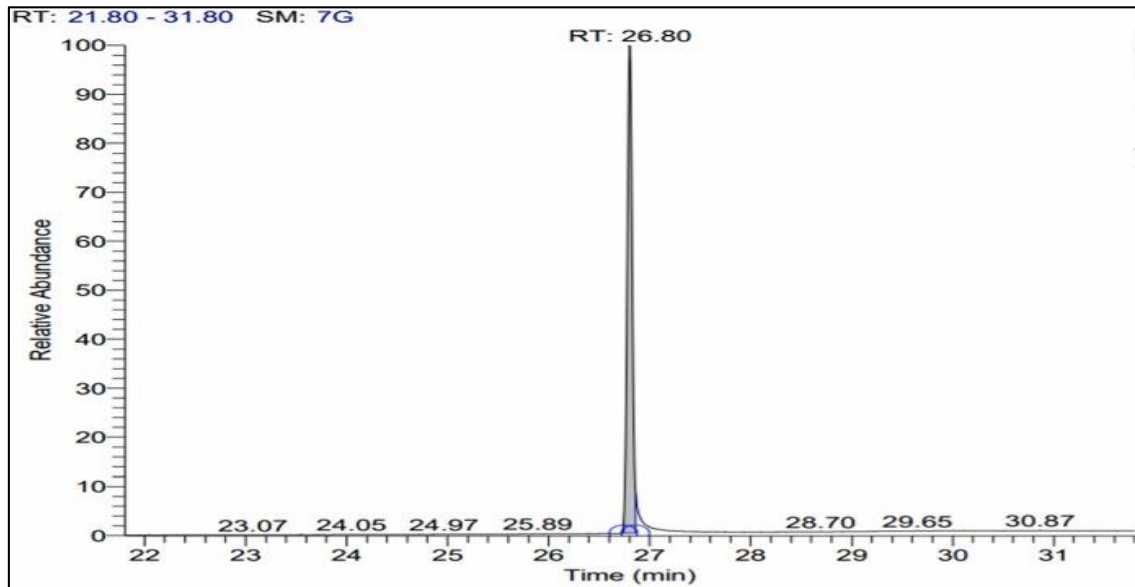
belirlenmiştir (Sarıkaya ve diğerleri, 2013). Her spektrumdaki tüm iyonların yoğunlukları toplanabilir ve bu toplam, görünümü geleneksel bir kromatografik detektörün çıktısına benzer olan bir toplam iyon kromatogramı vermek üzere kromatografik alıkonma zamanının (Rt) bir fonksiyonu olarak çizilebilir (Sleeman ve Carter, 2005: 337-344). Dolayısıyla, bilinmeyen bileşiğin Rt beklenen yoğunluk oranları kütüphanede tanımlı bileşiklerle büyük oranda eşleşme göstermesi esas alınarak tanımlanmıştır. Buna göre alkaloit içerik analizlerinde; her bir örneğe ait çalışma üç paralelli yapılmış olup, hem maddenin kolondan çıkış süresini gösteren Rt değeri hem de piki oluşturan eğri ile taban çizgisi arasındaki % alan, üç paraleldeki değerlerin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Çalışmada standart olarak ticari allokriptopin (S450987-Sigma-Aldrich, Almanya) alkaloiti kullanılmıştır. Allokriptopin standardına ait ortalama alan değerleri Çizelge 3.1’de, standart eğrisi ve regresyon denklemi Şekil 3.1’de, standart kromatogramı ise Şekil 3.2’de gösterilmiştir (Bozkurt, Coban, Kaya, Onur ve Unver-Somer, 2017a; Bozkurt ve diğerleri, 2017b; Sarıkaya ve diğerleri, 2013).

Çizelge 3.1. Allokriptopin standardının konsantrasyon ve ortalama alan değerleri

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Ortalama alan değerleri
20	475.503,31
40	1.051.965,44
60	1.633.975,10
80	2.197.563,51
100	2.672.728,23
120	3.259.903,46



Şekil 3.1. Allokriptopin standart ölçü eğrisi ve regresyon denklemini.



Şekil 3.2. Standart allokriptopine ait kromatogram.

3.2.3. PC12 hücrelerinin geliştirilmesi, farklılaştırılması ve stoklanması

PC12 hücreleri, %10 ısıyla inaktive edilmiş fetal bovin serumu (10270106-Gibco, ABD), %10 ısıyla inaktive edilmiş at serumu (26050088-Gibco, ABD), %1 penisilin/streptomisin (P4333-Sigma-Aldrich, Almanya) ve %1 L-Glutamin (A2916801- Gibco, ABD) ile desteklenen Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (41966029-Gibco, ABD)

ortamında, %5 CO₂ içeren ve nemli bir atmosfer sağlayan inkübatörde (MCO-18AC-PE-Panasonic, Japonya) 37 °C’de geliştirilmiştir (Balon ve Wiatrak, 2021; Jiang ve diğerleri, 2016a; Medina Benavente, Mogami, Sakurai ve Sawada, 2014; Qian, Wang, Yao ve Gao, 2008). Kollajen (A1048301-Thermo Fisher Scientific, ABD) ile kaplanmış flasklarda (3290-Corning, İngiltere) geliştirilen PC12 hücrelerinin besi ortamı her iki günde bir değiştirilerek gelişimi takip edilmiştir. Flasklarda %80-90 yayılma gösteren PC12 hücreleri kaldırılarak sayılmış ve deneysel gereksinime uygun yoğunlukta (10^4 , 10^5 ya da 5×10^5 hücre/kuyucuk) olacak şekilde 96 ve 6 kuyucuklu mikrolakalara aktarılmıştır. PC12 hücrelerinin nöron benzeri hücrelere farklılaşması, hücrelerin 100 ng/mL NGF (G5141-Promega, ABD) ile 4 gün inkübasyonu sonrasında sağlanmıştır (Aimé, Sun ve Greene, 2018: 1-372; Balon ve Wiatrak, 2021; Costa, Giordano ve Guizzetti, 2011; Orlowska ve diğerleri, 2017; Wiatrak, Kubis-Kubiak, Piwowar ve Barg, 2020; Wu ve diğerleri, 2007). Hücreler, %10 dimetil sülfoksit (DMSO) (D2650-Sigma-Aldrich, Almanya) içeren PC12 kültür ortamına alınarak, sıvı nitrojen tankında (International Cryogenics, Inc., IC 38RX, ABD) stoklanmıştır.

3.2.4. Sitotoksosite testi

Uygulamalar sonrası hücre canlılıkları 3- (4,5-dimetil-2-tiazil) -2,5-difenil-2H tetrazolium bromür (MTT) (M5655-Sigma-Aldrich, Almanya) yöntemi kullanılarak, sitotoksosite testi ile belirlenmiştir. Buna göre; uygulama yapılmış her bir kuyucuğa 20 µL MTT eklenerek, 4 saat %5 CO₂’li inkübatörde inkübe edilmiştir. Kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırılarak tüm kuyucuklara 200 µL DMSO eklenmiş ve mikrolakalar 30 dakika (dk) %5 CO₂’li inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası mikrolakalar, mikrolaka okuyucuda (Epoch, Biotek, ABD) 570 nm’de okutulmuştur. Canlı hücrelerin kontrole göre %’si aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

Canlı hücreler (%) = (her kuyucuktaki uygulama yapılmış hücrelerin absorbansı/kontrol hücrelerinin absorbansı) $\times$ 100 (Liu, Zhang, Zhang, Li ve Zhang, 2019; Mosmann, 1983; Neshatia ve diğerleri, 2009; Park ve Xian, 2015; Saberzadeh, Omrani ve Takhshid, 2016).

H₂O₂ ve alkaloit ekstraktlarının PC12 hücre canlılığı üzerine etkileri

Bu çalışmada, oksidatif stres ile nöral hasara indüklenmiş hücre modelinin oluşturulmasında kullanılan H₂O₂’nin, yüksek oranda hücre ölümüne sebep olmayan ancak, özellikle nöral

apoptoz indüksiyonunda etkin olabilecek doz ve süresinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Aynı şekilde, kloroform, metanol ve su olmak üzere üç farklı çözücü ile elde edilmiş alkaloit ekstraktlarının PC12 hücrelerinde H₂O₂ ile indüklenen nöral hasarın önlenmesinde etkin ve toksik etki göstermeyecek doz/dozlar ve süresinin belirlenmesi amacı ile toksisite testleri yapılmıştır. Bunun için, 96 kuyucuklu mikrolakalar kollajen ile kaplanmış ve PC12 hücreleri 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde mikrolakalara aktarılmıştır. 24 saat inkübasyon sonrasında hücrelere; H₂O₂ (H1009-Sigma-Aldrich, Almanya) (100, 150, 200 ve 300 µM) 12, 24 ve 48 saat (H1009-Sigma-Aldrich, Almanya) veya alkaloit ekstraktları (100, 250, 500 ve 1000 µg/mL) 12, 18 ve 24 saat uygulanmış ve hücreler 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Herhangi bir uygulama yapılmamış ve normal hücre kültürü ortamında geliştirilen hücreler, kontrol olarak kullanılmıştır. Tüm deneme gruplarında alkaloit ekstraktlarının çözünmesinde kullanılan DMSO'nun (D8418-Sigma-Aldrich, Almanya) hücre canlılığı üzerindeki etkisi ayrıca test edilmiştir (Her örnekteki son DMSO konsantrasyonu %1'den azdır).

H₂O₂ ile indüklenen PC12 hücrelerinde alkaloit ekstraktlarının hücre canlılığı üzerine etkileri

Bu deneyde, kloroform, metanol ve su alkaloit ekstraktlarının H₂O₂ ile oksidatif strese indüklenen PC12 hücrelerinin canlılığını koruyucu etkilerinin olup-olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Alkaloit ekstraktlarının PC12 hücrelerine denenmesinde bir önceki çalışmadan elde edilen sonuçlara göre belirlenen konsantrasyonlar (100, 250 ve 500 µg/mL) 18 saat uygulanırken, H₂O₂'nin 200 µM konsantrasyonu 24 saat süre ile uygulanmıştır. Alkaloit ekstraktı ve H₂O₂ uygulaması yapılmadan, normal hücre kültüründe geliştirilen hücreler, kontrol olarak kullanılmıştır. Deneylerde kontrole göre hücre canlılıkları MTT testi ile (bakınız (bkz.) 3.2.4) belirlenmiştir (Liu ve diğerleri, 2019; Mosmann, 1983; Neshatia ve diğerleri, 2009; Park ve Xian, 2015; Saberzadeh ve diğerleri, 2016).

3.2.5. Nörodejeneratif hücre modeli ve uygulama grupları

Çalışmada, MTT ile yapılan ön doz ve süre belirleme çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre, fPC12 hücrelerine uygulanan gruplar ve nörodejeneratif hücre modeli aşağıdaki gibidir:

1. Kontrol grubu: PC12 hücreleri NGF içeren DMEM ile 6 gün muamele edilmiştir (İki günde bir çoğaltma ortamı, NGF’li farklılaşma ortamı ile değiştirilmiştir). fPC12 hücrelerine herhangi bir uygulama yapılmamıştır.
2. H₂O₂ grubu (nörodejeneratif hücre modeli): H₂O₂ son konsantrasyonu 200 µM olacak şekilde NGF içeren DMEM’de çözünmüştür. fPC12 hücreleri 6. gün H₂O₂ ile 24 saat muamele edilmiştir.
3. Alkaloit ekstraktı grubu: Alkaloit ekstraktları (kloroform, metanol ve su) son konsantrasyonları 100-500 µg/mL olacak şekilde NGF içeren DMEM’de çözünmüştür. NGF ile 4 gün muamele sonrası fPC12 hücreleri, alkaloit ekstraktlarıyla 5. gün 18 saat muamele edilmiştir.
4. Alkaloit ekstraktı + H₂O₂ grubu (deney grubu): fPC12 hücreleri alkaloit ekstraktları (100-500 µg/mL) ile 18 saat inkübe edildikten sonra, 200 µM H₂O₂ ile 24 saat muamele edilmiştir (Lv ve diğerleri, 2017; Olatunji, Chen ve Zhou, 2017; Shaerzadeh ve diğerleri, 2011; Shaykhalishahi, Yazdanparast, Ha ve Chang, 2009; Wiatrak ve diğerleri, 2020).

3.2.6. Flow sitometre analizleri

Flow sitometrik analizler için, 6 kuyucuklu mikropalakalar kollajen ile kaplandıktan sonra PC12 hücreleri 1×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. 4 günlük NGF uygulamasının ardından fPC12 hücreleri, 2 mL besiyeri (100 ng/mL NGF içeren) içinde çözünmüş alkaloit ekstraktları (100, 250 ve 500 µg/mL) ile 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde 18 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler, yine aynı koşullarda 200 µM H₂O₂ içeren NGF’li besiyerinde ise 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. H₂O₂ ve alkaloit ekstraktı uygulaması yapılmadan, normal NGF’li hücre kültürü koşullarında geliştirilen hücreler, kontrol olarak kullanılmıştır. Flow sitometre analizleri NovoCyte® 3000 Flow Sitometri cihazı (ACEA Biosciences, Inc., ABD) ve NovoCyte® 2060R Flow Sitometri cihazı (Agilent, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Örnekler, ACEA NovoExpress yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Tüm flow sitometri analizleri Bilkent Üniversitesi THORVACS Biyoteknoloji Laboratuvarı’nda hizmet alımı olarak yapılmıştır.

Hücre içi reaktif oksijen türleri seviyesinin analizi

Çalışmada, fPC12 hücrelerinde H₂O₂ ile indüklenen hücre içi ROS seviyesi üzerinde kloroform, metanol ve su alkaloit ekstraktlarının baskılayıcı, bununla ilişkili olarak anti-oksidatif etkiler gösterip-göstermediklerinin flow sitometri ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için hücresel uygulamalar 3.2.5'te belirtildiği gibi yapılmış ve hücre içi ROS analizi, 2',7'-diklorodihidrofloresan diasetat (H₂DCFDA) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Kısaca, uygulama yapılmış ve uygulama yapılmamış (kontrol) hücreler toplanmış, 1 × fosfat tamponlu tuzlu su çözeltisi (PBS) (00-3002-Invitrogen, ABD) ile yıkanmış ve karanlıkta 500 µL 10 µM CM-H₂DCFDA reaktifini (H₂DCFDA'nın 5- (ve 6) klorometil türevi) (C6827-InvitrogenTM, ABD) içeren 1 × PBS çözeltisi içinde 37 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, 2',7'-diklorofluoresin (DCF)'nin floresanı ölçülmüştür (Mao, Iwai, Keng, Vulapalli ve Liang, 2006; Zhou, Zhang, Wu, Shi ve Zhou, 2017). Hücre başına düşen ROS miktarı için cihaza 30 × 10³ hücre okutulmuş, sonuçlar ortalama floresan yoğunluğu (MFI) değeri olarak elde edilmiştir. Tüm şekillerde, flow sitometri histogramında; x-ekseni değişkenin yoğunluğunu, y-ekseni ise belirli bir sinyal yoğunluğuna sahip hücrelerin sayısını göstermektedir (Rothe, 2009: 53-88). Tek parametrelili histogramlarda, veriler popülasyondaki hücrelerin yüzdesi veya MFI şeklinde ifade edilir (Shehat ve Tigno-Aranjuez, 2019). Her bir hücre başına düşen MFI hesaplandıktan sonra ortalama değerler sütun grafiğine dönüştürülmüştür. Sütun grafiğinde verilen kontrol grubu; hiçbir uygulama yapılmamış, H₂O₂ grubu; H₂O₂ uygulanmış ve diğer gruplar ise; belirlenen konsantrasyonlardaki alkaloit ekstraktları ve H₂O₂ ile muamele edilmiş fPC12 hücrelerini temsil etmektedir.

Nöral apoptozun analizi

Bu çalışmada, H₂O₂ ile nöral apoptoza indüklenen fPC12 hücrelerinde, kloroform, metanol ve su alkaloit ekstraktlarının anti-apoptotik etkilerinin olup-olmadığının flow sitometri ile analizi amaçlanmıştır. Bunun için hücresel uygulamalar 3.2.5'te belirtildiği gibi yapılmış ve anneksin V-floresin izotiyosiyanat (FITC) (ANXVF-200T-Immunostep, İspanya) ve propidyum iyodür (PI) (Immunostep, İspanya) kiti kullanılarak çift boyama tekniği uygulanmıştır. Uygulama yapılmış ve yapılmamış hücreler santrifüjle toplanmış ve 1 × PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra hücreler, 4 mL 1 × anneksin V bağlama tamponu (1 × BB) (10 × BB-Immunostep, İspanya) içerisinde yeniden süspanse edilmiş ve 500 × g'de 5 dk

santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve hücreler 200 μ L 1 $\times$ BB içerisinde çözünmüştür. Hücre solüsyonundan 100 μ L alınarak, üzerine 5 μ L aneksin V-FITC ve son konsantrasyon 40 μ g/mL olacak şekilde PI eklenerek oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30 dk inkübe edilmiştir. Hücrelerin üzerine 100 μ L 1 $\times$ BB ilave edilmiştir. Floresans yoğunluğu 488 nm'de eksitasyon, 515-545 nm'de emisyon ile belirlenmiştir. Analiz sonuçları canlı hücre (CH), toplam apoptik hücre (TAH), erken apoptotik hücre (EAH), geç apoptotik hücre (GAH) ve nekrotik hücre (NH) yüzdeleri şeklinde verilmiştir (Lv ve diğerleri, 2017; Qiu ve diğerleri, 2016; Tricarico ve diğerleri, 2016). Tüm şekillerde aneksin V (-)/PI (-) hücreler canlı, aneksin V (+)/PI (-) hücreler erken apoptotik, aneksin V (+)/PI (+) hücreler geç apoptotik/ikincil nekrotik hücreler ve aneksin V (-)/PI (+) hücreler ise birincil nekrotik hücreler olarak değerlendirilmiştir (Wlodkowic, Skommer ve Darzynkiewicz, 2009). Her bölümdeki hücre yüzdeleri (CH, TAH, EAH, GAH ve NH) hesaplanıp, ortalama yüzde değerler grafiğe (histogram) dönüştürülmüştür. Grafiklerde EAH ve GAH'lere ait yüzde değerleri toplanarak TAH olarak belirtilmiştir. Tüm şekillerde, flow sitometri diyagramında x eksenini hücrelerin aneksin V-FITC ışımaya göre, y eksenini ise PI ışımaya göre dağılımlarını belirtmektedir. Her bir mavi nokta tek bir hücreyi ifade etmektedir. Yüzde değerler diyagramın ilgili bölümündeki hücre sayısının, sayılan hücrelerin tamamına oranını göstermektedir. Histogramda verilen kontrol grubu; hiçbir uygulama yapılmamış, H₂O₂ grubu; H₂O₂ uygulanmış ve diğer gruplar ise; belirlenen konsantrasyonlarda alkaloit ekstraktları ve H₂O₂ ile muamele edilmiş fPC12 hücrelerini temsil etmektedir.

Hücre döngüsünün analizi

Bu çalışma kapsamında, flow sitometri ile apoptotik hücre analizine yönelik çalışmaların, fPC12 hücrelerinin bölünme fazlarındaki oransal değişiminin tespitiyle validasyonu amaçlanmıştır. Hücresel uygulamalar 3.2.5'te belirtildiği gibi yapılmıştır. Uygulama yapılmış ve yapılmamış hücreler toplanmış ve hücrelere 5 mL 1 $\times$ PBS eklenerek 5 dk 500 $\times$ g'de santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Hücreler, 1 mL soğuk %70 etanol içerisinde süspanse edilmiş ve 30 dk +4°C'de inkübe edilmiştir. Bekleme sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve hücreler 200 mg/mL konsantrasyonda 50 mL RNaz A solüsyonunda (EN0531-Thermo Fisher, ABD) süspanse edilerek 37°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra, hücrelerin üzerine 50 mg/mL 200 mL PI solüsyonu (PI-Immunostep, İspanya) ilave edilerek 30 dk 37°C'de bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra hücrelere 250 mL 1 $\times$ PBS ilave edilmiş ve

hücrelerin floresanı ölçülmüştür. Floresans yoğunluğu 488 nm’de eksitasyon, 515-545 nm’de emisyon ile belirlenmiştir. Analiz sonuçları G1, S, G2 ve Sub G1 hücre yüzdeleri olarak verilmiştir (Qiu ve diğerleri, 2016; Riccardi ve Nicoletti, 2006; Tang ve diğerleri, 2005). Apoptoza uğramış hücrelerin küçülmesi ve azalmış DNA içeriğine bağlı flow sitometride gözlenen hipodiploid (Sub G1) piki apoptozun değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerdendir (Liu ve diğerleri, 2016; Öniz, 2003). Hücrelerdeki DNA içerikleri değerlendirilip G1 ve G2 fazları tespit edilmiştir. Bu pikler arasındaki bölge S fazı olarak belirtilmiştir. G1 pikinden daha az DNA içeriğine sahip hücreler ise Sub G1 fazı ve apoptotik hücre olarak nitelendirilmiştir (Darzynkiewicz, Halicka ve Zhao, 2010). Pik alanlarındaki hücre sayısı sayılan toplam hücre sayısına oranlanmış, tüm fazlar (G1, S, G2 ve Sub G1) için hücre yüzdeleri hesaplanmış ve ortalama yüzde değerler grafiğe dönüştürülmüştür.

Hücre içi kalsiyum seviyesinin analizi

Bu çalışmada, fPC12 hücrelerinde H₂O₂ ile indüklenen hücre içi Ca⁺² seviyesi üzerinde kloroform alkaloit ekstraktının baskılayıcı, dolayısıyla hücre içi Ca⁺² homeostazını regüle edici etkisinin olup-olmadığının Ca⁺² sensör boyası kullanılarak flow sitometri ile analizi amaçlanmıştır. Bunun için hücresel uygulamalar 3.2.5’te belirtildiği gibi yapılmıştır. Uygulama yapılmış ve yapılmamış hücreler toplanmış ve 1000 rpm’de 10 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler Ca⁺² içermeyen PBS ile süspanse edilmiş ve karanlıkta 5 µM eBioscience™ Calcium Sensor Dye eFluor™ 514 (65-0859-70-Invitrogen™, ABD) ile 37°C’de 30 dk ve oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler, arka plan floresansını ve spesifik olmayan boyamayı en aza indirmek için iki kez PBS ile yıkanmıştır. eFluor 514 floresans yoğunluğu, 490 nm’de eksitasyon ve 514 nm’de emisyon ile ölçülmüştür. Analiz sonuçları, kontrol grubuna göre kat değişimi olarak ifade edilen eFluor 514 floresan yoğunlukları şeklinde verilmiştir (Cai ve diğerleri, 2015; Feng ve diğerleri, 2013; He, Leung, Zhuo ve Ge, 2009). Histogramda verilen kontrol grubu; hiçbir uygulama yapılmamış, H₂O₂ grubu; H₂O₂ uygulanmış ve diğer gruplar ise; belirlenen konsantrasyonlarda kloroform alkaloit ekstraktı ve H₂O₂ ile muamele edilmiş fPC12 hücrelerini temsil etmektedir.

3.2.7. Gen ekspresyon çalışmaları

Nöral apoptozun gen ekspresyonu düzeyinde belirlenmesi

Bu çalışmada, H₂O₂ ile nöral apoptoza indüklenen fPC12 hücrelerinde, kloroform, metanol ve su alkaloit ekstraktlarının, pro-apoptotik genler (Bax, Kaspaz-9 ve Kaspaz-3) ve anti-apoptotik genin (Bcl-2) mRNA ekspresyon düzeylerine etkileriyle ilişkili anti-apoptotik etkilerinin olup-olmadığının kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Hücresel uygulamalar 3.2.5'te belirtildiği gibi yapılmıştır. Uygulama yapılmış ve yapılmamış fPC12 hücrelerinden total RNA izolasyonu yapılmıştır. Tüm denemelerde kontrol grubu; hiçbir uygulama yapılmamış, H₂O₂ grubu; H₂O₂ uygulanmış ve diğer gruplar ise; belirlenen konsantrasyonlarda alkaloit ekstraktları ve H₂O₂ ile muamele edilmiş fPC12 hücrelerini temsil etmektedir.

fPC12 hücrelerinden RNA izolasyonu ve komplementer DNA sentezi

fPC12 hücrelerinden total RNA izolasyonu, RNeasy Mini kit (74104-Qiagen, ABD), Quick-RNA™ MiniPrep kit (R1054-Zymo Research, ABD) ve PureLink™ RNA Mini kit (12183018A-Invitrogen™, ABD) kullanılarak üretici firma talimatları doğrultusunda yapılmıştır. İzole edilen RNA'ların miktarı ve saflık derecesi 2,0 ile 2,2 arasındaki A260/280 ve A260/230 absorbans oranları dikkate alınarak mikropilaka okuyucu ve Epoch Take3 Plate ile belirlenmiştir. RNA örnekleri son konsantrasyon 1 µg olacak şekilde eşitlenmiş ve bu örneklerden komplementer DNA (cDNA) eldesi, SensiFAST cDNA Synthesis kit (65053-Bioline, ABD) ve High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (4368814-Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak üretici firma talimatları doğrultusunda yapılmıştır. Sentezlenen cDNA'ların absorbans değerleri mikropilaka okuyucu ve Take3 Plate'i kullanılarak 260 ve 280 nm'de ölçülmüş, saflık dereceleri ve miktarları belirlenmiştir. Saflık derecesi 1,7-1,8 olan cDNA örnekleri ile çalışılmış olup, bu cDNA'lar 1/20 oranında distile su (dH₂O) ile dilüe edilmiştir. Elde edilen cDNA'lar qRT-PCR çalışmalarında kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir (Alles ve diğerleri, 2018; Dominguez, van Weering, Borges, Toonen ve Verhage, 2018; Pires Da Silva ve diğerleri, 2020; Saadeldin ve diğerleri, 2018; Sarkadi ve diğerleri, 2020).

qRT-PCR reaksiyonu

qRT-PCR reaksiyonu kalıp olarak kullanılan cDNA'lar ve spesifik primerler ile oluşturulmuştur. Çalışmada SensiFAST™ SYBR® Lo-ROX kit (94005-Bioline, ABD) ve AMPIGENE® qPCR Green Mix Lo-ROX kit (ENZ-NUC103-1000-Enzo, İsviçre) kullanılmıştır. Deneylerde tüm cDNA örnekleri Applied Biosystems™ QuantStudio™ 3 Real-Time PCR cihazında (A28131-Thermo Fisher Scientific, ABD) çalışılmış olup, qRT-PCR reaksiyon koşulları Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. qRT-PCR reaksiyon koşulları

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

20 μL qRT-PCR reaksiyonu 95 °C'de 2 dk'lık polimeraz aktivasyonu sonrası 1 döngü 95°C'de 5 sn denatürasyon ve 40 döngü 63-65°C'de 10 sn bağlanma, 72°C'de 20 sn uzama olarak yapılmıştır. Çalışmada, internal kontrol olarak bir housekeeping (zorunlu idare) geni olan gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) kullanılmış ve sonuçların değerlendirilmesinde; Bax, Kaspaz-9, Kaspaz-3 ve Bcl-2 GAPDH'a oranlanarak normalize edilmiş, sonrasında mRNA ifade düzeylerinin kendi içinde kontrole oranlaması yapılmıştır. Bu analizler için, karşılaştırmalı döngü eşiği (C_T) yöntemi (2^{-ΔΔCT} yöntemi) kullanılmıştır. Veriler, ilgilenilen genin ortalama C_T değeri ile GAPDH referans geninin ortalama C_T değeri karşılaştırılarak normalize edilmiş ve sonuçlar katlanma değişiklikleri olarak ifade edilmiştir. Katlanma değişiklikleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Katlanma değışikliği} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$2^{-\Delta\Delta C_T} = \text{Örnek (C}_T \text{ Hedef gen} - \text{C}_T \text{ İnternal kontrol/Referans gen}) - \text{Kontrol (C}_T \text{ Hedef gen} - \text{C}_T \text{ İnternal kontrol/Referans gen)}$. Örnek; uygulama yapılmış gruplarda hedef genin C_T değerinin referans genin C_T değerine göre farkıdır. Kontrol; uygulama yapılmamış gruplarda hedef genin C_T değerinin referans genin C_T değerine göre farkıdır (Dominguez ve diğerleri, 2018; Guo ve diğerleri, 2016; Kleyer, Tecon ve Or, 2017; Livak ve Schmittgen, 2001; Schmittgen ve

Livak, 2008; Vandesompele ve diğerleri, 2002). Genlere özgü primerler ve primerlere ait baz çifti (bç) sayıları Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. qRT-PCR’da kullanılan genler, genlere özgü primerler ve baz çifti sayıları

Gen adı	Primer dizisi	bç	Kaynak
Bax	F 5’ CTGCAGAGGATGATTGCTGA 3’	20	(Guo ve diğerleri, 2013b)
	R 5’ GAGGAAGTCCAGTGTCCAGC 3’	20	
Kaspaz -9	F 5’ GGATCTGGACTGCGTCTCATCAA 3’	23	(Lacraz, Figeac, Movassat, Kassis, ve Portha, 2010)
	R 5’ CCGAGACCTTGGAACACAGAGAA 3’	23	
Kaspaz-3	F 5’ TGGCCCTGAAATACGAAG 3’	18	(Xu ve diğerleri, 2013)
	R 5’ GGCAGTAGTCGCCTCTGA 3’	18	
Bcl-2	F 5’ ATCGCTCTGTGGATGACTGAGTAC 3’	24	(Almasi ve diğerleri, 2015)
	R 5’ AGAGACAGCCAGGAGAAATCAAAC 3’	24	
GAPDH	F 5’ CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA 3’	24	(Pillai ve Mini, 2016).
	R 5’ GGCATGGACTGTGGTCATGA 3’	20	

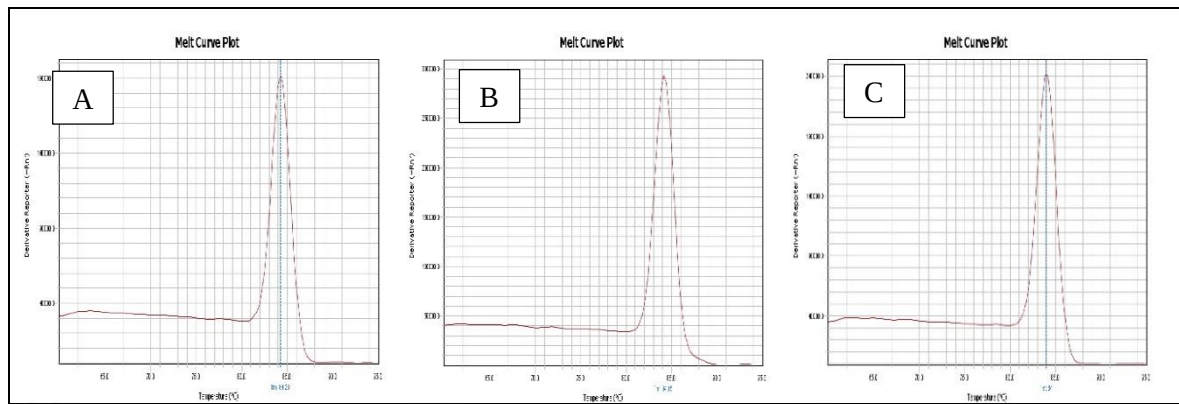
Amplifiye edilmiş ürünü spesifik (istenen) ile spesifik olmayan (istenmeyen) arasında ayırt etmek için, primer dimerleri ve spesifik olmayan ürünler daha düşük sıcaklıkta denatüre edildiğinden melting curve (erime eğrisi) analizi önerilir (Kanwal ve Tahir, 2018: 805-822). Bu nedenle, primerlerin erime eğrisi analizleri yapılmıştır (daha önceki tez çalışmaları kapsamında). Buna göre; primerlerin erime sıcaklıkları; Bax 85 °C, Kaspaz-9 80 °C, Kaspaz-3 81 °C, Bcl-2 85 °C ve GAPDH ise 83 °C’dir (Koçancı, 2018).

L-tipi voltaj-kapılı kalsiyum kanalı alt tiplerinin gen ekspresyonu düzeyinin belirlenmesi

Bu çalışmada, fPC12 hücrelerinde H₂O₂ ile aktive edilen L-tipi VGCC alt tiplerinden olan Cav1.2 ve Cav1.3 mRNA ekspresyonunu, kloroform alkaloit ekstraktının baskılayıcı ve buna bağlı olarak L-tipi Ca²⁺ kanal blokeri potansiyeline sahip olup-olmadığının qRT-PCR ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada hücresel uygulamalar 3.2.5’te belirtildiği gibi yapılmıştır. Yukarıda belirtilen koşullardan farklı olarak, 20 µL qRT-PCR reaksiyonu 95 °C’de 2 dk’lık polimeraz aktivasyonunun ardından, 1 döngü 95°C’de 5 sn denatürasyon, 40 döngü 60-65°C’de 20-30 sn bağlanma/uzama olarak yapılmıştır (Jeong ve diğerleri, 2018). Çalışmada kullanılan genlere özgü primerler, primerlere ait bç sayıları Çizelge 3.4’te verilmiş olup, primerlerin erime sıcaklıkları ise; Şekil 3.3’te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. qRT-PCR’da kullanılan genler, genlere özgü primerler ve baz çifti sayıları

Gen adı	Primer dizisi	bç	Kaynak
CACNA1C (Ca _v 1.2 alt birimi)	F 5’ GTTGCCCTGGGTGTATTTTG 3’	20	(Saminathan, Pachiappan, Feng, Rowan ve Gopalakrishnakone, 2009).
	R 5’ TAGCTGCTGCTTCTCACGAA 3’	20	
CACNA1D (Ca _v 1.3 alt birimi)	F 5’ ATAGACGTGGCACTCAGCGA 3’	20	
	R 5’ CGACATATGGGAGTGCCTGGA 3’	21	
GAPDH	F 5’ CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA 3’	24	
	R 5’ GGCATGGACTGTGGTTCATGA 3’	20	

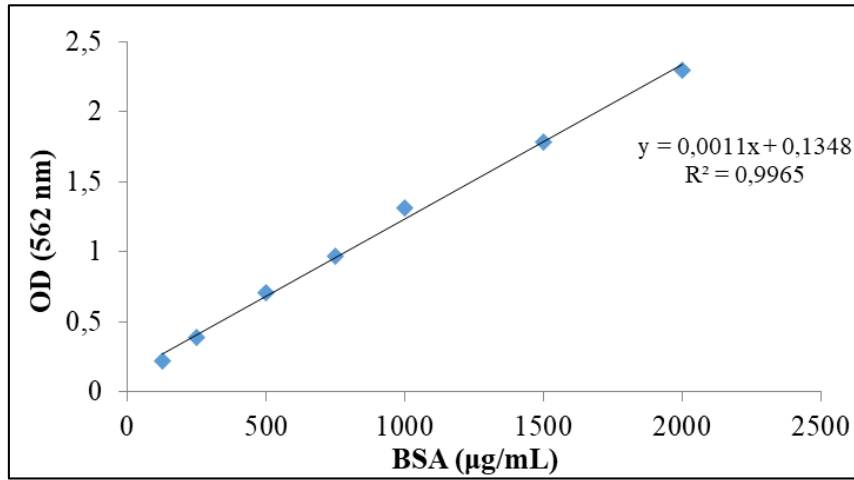
Şekil 3.3. Hedef genler ve referans genin erime eğrileri. A: CACNA1C, B: CACNA1D, C: GAPDH; *Rattus norvegicus*.

3.2.8. Western blot hidridizasyon tekniği ile protein ekspresyon çalışmaları

Total protein izolasyonu ve protein miktarının belirlenmesi

Total protein izolasyonu için Jiang ve diğerlerinin (2016b) çalışmalarında kullandıkları metot bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. Uygulama yapılmış ve yapılmamış hücreler soğuk $1 \times \text{PBS}$ ile yıkanmış ve steril bir tüpe toplanmıştır. Tüpler 5 dk $2,500 \times g$ hızda $+4^\circ\text{C}$ ’de santrifüj edilmiştir. Hücre pelletlerinin üzerine, proteaz inhibitörü kokteyl tableti (11 836 153 001-Roche, Almanya veya A32963- Thermo Fisher Scientific, ABD) ve fosfataz inhibitörü kokteyl tableti eklenmiş (04 906 837 001-Roche, Almanya veya A32957- Thermo Fisher Scientific, ABD) $500 \mu\text{L}$ soğuk radyo-immünopresipitasyon (Ripa) lizis tamponu (89900-Thermo Fisher Scientific, ABD) uygulanmıştır. Tüpler, 5 dk’da bir vorteksenerek $+4^\circ\text{C}$ ’de 30 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra, tüpler 30 dk $16,000 \times g$ hızda $+4^\circ\text{C}$ ’de santrifüj edilmiş ve süpernatantta bulunan protein miktarları belirlenmiştir. Protein miktarları, Pierce Biokimyasal asit (BCA) Protein Assay kit (23228-Thermo Fisher Scientific,

ABD) kullanılarak üretici firma talimatları doğrultusunda belirlenmiştir. Standart eğrinin oluşturulması için konsantrasyonları 25-2000 µg arasında değişen 8 adet Pierce Bovine Serum Albumin (BSA) (23209-Thermo Fisher Scientific, ABD) dilüsyonları oluşturulmuştur. 25-2000 µg/mL standart BSA çözeltilerinin ve örneklerin 562 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen standart grafiği ile her örneğin içerdiği total protein miktarı µg/mL olarak hesaplanmıştır (Jiang ve diğerleri, 2016b; Wang ve diğerleri, 2017) (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. BSA proteini standart eğrisi ve regresyon denklemi.

Protein fosforilasyonu, bir fosforil grubunun bir serin (Ser), treonin (Thr) veya tirozine (Tyr) bir kinaz tarafından kovalent olarak bağlandığı ve bir fosfataz tarafından çıkarıldığı en iyi çalışılmış translasyon sonrası modifikasyondur. Fosforilasyon, protein yapısını, işlevini ve etkileşimlerini değiştirebilir. Bu nedenle fosforilasyon, sinyal iletimi, hücre döngüsü, farklılaşma, proliferasyon, metabolizma, hareketlilik ve ölüm dahil olmak üzere homeostaz ve hastalıktaki hemen hemen tüm hücresel süreçlerde kritik bir rol oynar. Daha da önemlisi, farklı kalıntılardaki fosforilasyon farklı sonuçlara neden olabilir. Spesifik yerleri ve fosforilasyon seviyesini anlamak, hücre sinyalini ve fenotipini anlamada çok önemlidir (URL-17, 18). Bu nedenle, tüm Western blot çalışmalarında NH'lerde etkili Akt/GSK-3β/Tau ve MAPK sinyal yolağındaki proteinlerin fosforilasyon seviyesi incelenmiştir. Bunun için çalışmalarda, hedef proteinin hem fosforile hem de total ekspresyon seviyesini (hem fosforile edilmiş hem de fosforile edilmemiş protein) saptayan antikorlar kullanılmış, total fraksiyona göre fosforile fraksiyon belirlenmiştir. Bu durum, protein fosforilasyonunun veya protein ekspresyonunun yukarı veya aşağı regüle edilip edilmediğinin belirlenmesini sağlamıştır.

Western blot hibridizasyon yöntemi

Bu çalışmada, Western blot hibridizasyonu Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Kullanılan sistemdeki protein ifade düzeylerinin belirlenmesi için izlenen basamaklar şöyledir:

Protein örneklerinin denatürasyonu

Trans-Blot Turbo Transfer System için protein örnekleri kuyucuk başına 10-30 µg olacak biçimde ve 1:1 hacimde %5 β-merkaptoetanol içeren 2 × yükleme tamponu (Laemmli Sample Buffer) (1610737-Bio-Rad, ABD) ile karıştırılmış ve 90 °C’de 10 dk denatüre edilmiştir (Jiang ve diğerleri, 2016b; Linan-Rico ve diğerleri, 2017; Maharjan, Serova ve Sabban, 2010; Tifoun ve diğerleri, 2022).

Örneklerin sodyum-dodesil-sülfat poliakrilamid jel elektroforezi jel kuyucuklarına yüklenmesi

Trans-Blot Turbo Transfer Sistemi’nde kullanılan %4–20’lik hazır bis-tris jel (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 10-well, 50 µl) (4561094-Bio-Rad, ABD) sodyum-dodesil-sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) için dikey elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tank 1 × Tris/Glycine/SDS (1610732- Bio-Rad, ABD) yürütme tamponu ile doldurulduktan sonra protein örnekleri ve marker jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. Çalışmalarda, Ca_v1.2 ve Ca_v1.3 proteinlerinin analizi için marker olarak PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (26619-Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılırken, diğer proteinlerin analizi için PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-170 kDa) (26616-Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır. Yürütme işlemi 120 voltta 60 dk olarak (Mini Trans-Blot®Cell-Bio-Rad, ABD) yapılmıştır (Fedorenko ve diğerleri, 2020; Mohammad ve diğerleri, 2021; Tifoun ve diğerleri, 2022).

SDS-PAGE jelde yürütülen proteinlerin membrana transferi (Ca_v, ERK1/2, JNK ve p38)

Proteinlerin SDS jelden polivinilidin florür (PVDF) membrana transferi için Trans-Blot Turbo RTA Mini 0,20 µm PVDF Transfer kit, for 40 blots (1704272-Bio-Rad, ABD) kullanılmıştır. Daha sonra, Trans-Blot Turbo Transfer System jel transfer cihazı (1704150-

Bio-Rad, ABD) kullanılarak proteinlerin jelden PVDF membrana aktarılması sağlanmıştır (Jiang ve diğerleri, 2016b; Liu ve diğerleri, 2015a; Wang ve diğerleri, 2017).

Western blot hibridizasyon yöntemi (iBlot 2 Dry Blotting System)(Akt, GSK-3 β ve Tau)

iBlot 2 Dry Blotting System için protein örnekleri kuyucuk başına 30-40 μ g olacak şekilde Bolt 4 $\times$ LDS sample buffer (B0007-Thermo Fisher Scientific, ABD) ve Bolt 10 $\times$ reducing agent (B0009-Thermo Fisher Scientific, ABD) ile belirli oranlarda karıştırılmış ve 70 °C’de 10 dk denatüre edilmiştir (Coleman, Kulp ve Venditti, 2015; Feng ve diğerleri, 2021; Gaude ve diğerleri, 2018; Jiang ve diğerleri, 2016b; Wang ve diğerleri, 2017). Daha sonra %4-12’lik hazır Bolt bis-tris jel (Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus Gels, 12-well, 10 per/box) (NW04122BOX-Thermo Fisher Scientific, ABD), dikey elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tank %0,1 NuPAGE anti-oxidant (NP0005-Thermo Fisher Scientific, ABD) içeren Bolt 1 $\times$ 2-(N-morfolino) etan sülfonik asit (MES) SDS (B0002-Thermo Fisher Scientific, ABD) yürütme tamponu ile doldurulduktan sonra protein örnekleri ve marker jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. Çalışmada marker olarak PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-170 kDa) (26616-Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır. Yürütme işlemi 200 voltta 30-35 dk (Bolt Mini Gel Tank-Invitrogen, ABD) yapılmıştır (Coleman ve diğerleri, 2015; Gaude ve diğerleri, 2018). SDS jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana transferi için ise, iBlot® 2 Transfer Stacks, nitrocellulose, regular size, 10 blots (IB23001-Thermo Scientific, ABD) ve iBlot® 2 Gel Transfer cihazı (IB21001-Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır (Coleman ve diğerleri, 2015; Fedorenko ve diğerleri, 2020; Zhu, Guo, Feng, ve Sun, 2013).

Bloklama

Transfer işleminden sonra PVDF membran %5’lik süt tozu ve %0,1’lik tween-20 içeren 1 $\times$ Tris-tamponlu tuzlu su (TBS) (1706435-Bio-Rad, ABD) çözeltisinden oluşan bloklama solüsyonunda 1 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Daha sonra, membran 5 mL %0,1’lik tween-20 içeren 1 $\times$ TBS ile 3 kez 5’er dk yıkanmıştır (Mohammad ve diğerleri, 2021).

Membrandaki proteinlerin immünolojik olarak gösterilmesi

Hücrede ifade edilen proteinin gösterilmesi için primer antikorlar, 10 mL bloklama solüsyonunda üretici firma talimatlarına göre dilüe edilerek hazırlanmıştır. Bloklanmış ve sonrasında yıkanmış PVDF membran, primer antikor ile oda koşullarında 2 saat muamele edilmiştir. Daha sonra, membran 5 mL %0,1'lik tween-20 içeren $1 \times$ TBS ile 3 kez 5'er dk yıkanmıştır. Primer antikora benzer şekilde sekonder antikor da, 10 mL bloklama solüsyonunda üretici firma talimatlarına göre dilüe edilerek hazırlanmıştır. Primer antikor sonrası yıkanmış olan PVDF membran, sekonder antikor ile oda koşullarında 1 saat muamele edilmiştir. Daha sonra, membran 5 mL %0,1'lik tween-20 içeren $1 \times$ TBS ile 3 kez 5'er dk yıkanmıştır (Coleman ve diğerleri, 2015; Gaude ve diğerleri, 2018; Mohammad ve diğerleri, 2021).

Kromojenik boya ile muamele ve analiz

Yıkama aşamasından sonra PVDF membran 10 mL alkaline phosphatase (AP) Conjugate Substrate kit (1706432-Bio-Rad, ABD) ile 1 saat çalkalayıcıda muamele edilmiştir (Amanat ve diğerleri, 2018). Daha sonra membran boyanın fazlasının giderilmesi için 10 mL steril dH₂O içinde 10 dk 1 veya 2 kez yıkanmıştır. Membran üzerindeki protein bantları jel ve blot görüntüleme sisteminde (Gel DocTM XR+Imaging System-Bio-Rad, ABD) tespit edilmiştir. Protein bantlarının analizi Bio-Rad Image Lab 6.0.1 programı kullanılarak yapılmıştır (Takalo ve diğerleri, 2020).

L-tipi voltaj-kapılı kalsiyum kanalı alt tiplerinin protein ekspresyonu düzeyinin belirlenmesi

Bu çalışmada, fPC12 hücrelerinde H₂O₂ ile aktive edilen L-tipi VGCC alt tiplerinden olan Cav1.2 ve Cav1.3 proteinlerinin ekspresyonu üzerinde, kloroform alkaloit ekstraktının baskılayıcı etkisinin olup-olmadığının Western blot ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Kloroform alkaloit ekstraktının H₂O₂ ile artması beklenen Cav1.2 ve Cav1.3 protein seviyeleri üzerinde olası baskılayıcı ve buna bağlı L-tipi Ca⁺² kanalını bloklayıcı etkisinin tespit edilebilmesi için 6 kuyucuklu mikrolakalara 5×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler ekilmiş ve tüm hücrel uygulamalar 3.2.5'te belirtildiği gibi yapılmıştır. Uygulamaların ardından fPC12 hücrelerinden total protein izolasyonu yapılmış ve protein miktarları belirlenmiştir. Uygulama yapılmamış fPC12 hücrelerinden izole edilen proteinler,

kontrol olarak kabul edilmiştir. Çalışmada kullanılan antikorlar, antikorlara ait dilüsyon oranları ve moleküler ağırlıkları Çizelge 3.5’de gösterilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesinde, referans protein olarak bir housekeeping protein olan GAPDH kullanılmıştır. Cav1.2 ve Cav1.3 hedef proteinlerin ifade düzeyleri GAPDH ile karşılaştırılarak incelenmiş, GAPDH’e göre normalize edilmiş ve protein seviyelerinin kendi içinde kontrole oranlanması yapılmıştır. Western blotlamadan elde edilen dansitometrik değerler, istatistiksel analizleri yapmak için kullanılmıştır (Feng ve diğerleri, 2021; Jiang ve diğerleri, 2016b; Kim ve Rhim, 2011; Liu, Yin, Guo, Deng ve Hu, 2009; Liu ve diğerleri, 2015a; Wang ve diğerleri, 2017).

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

Antikor adı	Katalog numarası	Dilüsyon oranı	Molekül ağırlığı (kDa)	Üretici firma
GAPDH antibody	10494-1AP	1/2000	36	Proteintech
CACNA1C antibody	orb335100	1/200	249	Biorbyt
CACNA1D antibody	PA5-78902	1/10-5/10	245	Thermo Fisher Scientific
Goat anti-rabbit IgG H+L), AP conjugate secondary antibody	SA00002-2	1/1000		Proteintech

Mitojenle aktiveleştirilen protein kinaz sinyal yollarının protein ekspresyonu düzeyinin belirlenmesi

Çalışmada, H₂O₂ ile nöral hasara indüklenen fPC12 hücrelerinde, p-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204), p-JNK (Thr 183/Tyr 185) ve p-p38 (Thr 180/Tyr 182) protein seviyeleri üzerinde kloroform alkaloit ekstraktının inhibe edici (MAPK sinyal yollarının aktivasyonunu inhibe edici) dolayısıyla nöral ölüm yolları üzerindeki baskılayıcı etkisinin olup-olmadığının Western blot ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Western blot analizinde hedef proteinlerin (p-ERK1/2, p-JNK ve p-p38 ile etken madde ile farklı rezidülerden fosforilasyon/defosforilasyona bağlı seviyesinde değişiklik beklenmeyen total (t) proteinler (t-ERK1/2, t-JNK ve t-p38) ifade düzeyleri GAPDH ile karşılaştırılarak incelenmiş, GAPDH’e göre normalize edilmiş ve protein seviyelerinin kendi içinde kontrole oranlanması yapılmıştır (Chen, Liu, Yin, Luo ve Huang, 2009; Jiang ve diğerleri, 2016b; You, Jang ve Kim, 2022). Çalışmada kullanılan antikor, dilüsyon oranları ve moleküler ağırlıkları Çizelge 3.6’da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Western blot için kullanılan antikorlar, dilüsyon oranları ve molekül ağırlıkları

Antikor adı	Katalog numarası	Dilüsyon oranı	Molekül ağırlığı (kDa)	Üretici firma
GAPDH antibody	10494-1AP	1/2000	36	Proteintech
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)(Thr202/Tyr204)XP® Rabbit mAb	4370	1/2000	44, 42	Cell Signaling Technology (CST)
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Antibody	9251	1/1000	46, 54	Cell Signaling Technology (CST)
p38 alpha [pThr180, pTyr182] Antibody	NB500-138	1/1000	~39	Novus Biologicals
p38 MAPK Rabbit Polyclonal Antibody	14064-1-AP	1/500	35/41	Proteintech
ERK1/2 Polyclonal Antibody	E-AB-31374	1/500-1/2000	42, 44/43	Elabscience
JNK Polyclonal antibody	E-AB-60070	1/500-1/2000	35/44/48, 50	Elabscience
Goat anti-rabbit IgG H+L), AP conjugate secondary antibody	SA00002-2	1/1000		Proteintech

Akt/GSK-3 β /Tau nöral ölüm sinyal yolağının protein ekspresyonu düzeyinin belirlenmesi

Çalışmada, H₂O₂ ile nöral hasara indüklenen fPC12 hücrelerinde, kloroform alkaloit ekstraktının p-Akt/Ser 473-aktif form ve p-GSK-3 β /Ser 9-inaktif form proteinlerinin artışı sağlayarak, Akt/GSK-3 β sinyal yolağını regüle edici ve buna bağlı Tau proteinlerinin (Ser 396 ve Thr 212) hiperfosforilasyonunu inhibe edici dolayısıyla nöral ölüm yolları üzerindeki baskılayıcı etkisinin olup-olmadığının Western blot ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

H₂O₂ ve kloroform alkaloit ekstraktının Akt/GSK-3 β /Tau nöral ölüm sinyal yolağı üzerine etkileri

Bu çalışmada, H₂O₂'nin fPC12 hücrelerinde nöral ölüm yolları üzerinde etkili olan proteinlerden p-Akt (Ser) 473, p-GSK-3 β (Ser 9), p-Tau/Ser 396 ve p-Tau/Thr 212 ile t-Akt,

t-GSK-3 β ve t-Tau/Tau-5 seviyeleri üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, 6 kuyucuklu mikropalakalara 5×10^5 hücre/kuyucuk yoğunluktaki hücreler ekilmiş ve hücrelerin farklılaştırılması 3.2.3'de belirtildiği gibi yapılmıştır. Daha sonra hücrelere 100, 150, 200 ve 300 ve 400 μ M H₂O₂ 24 saat uygulanmıştır. Ek olarak, kloroform çözücüsü ile elde edilmiş alkaloit ekstraktının, oluşturulan modelde p-Akt (Ser 473), p-GSK-3 β (Ser 9) p-Tau (Ser 396) ve p-Tau (Thr 212) protein seviyesi üzerinde etkin olabilecek konsantrasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Kloroform alkaloit ekstraktının tek başına uygulandığında, p-Akt ve p-GSK-3 β proteinlerinin fosforilasyon seviyesini azaltmaması, p-Tau proteinlerinin fosforilasyon seviyesini ise arttırmaması gerekmektedir. Bununla birlikte, kloroform alkaloit ekstraktının sadece yüksek konsantrasyonlarında Tau proteinini fosforile etmesi mümkün olabilir. Hücre modeline geçmeden bu durumun test edilerek ortaya konulması ve kloroform alkaloit ekstraktının ideal konsantrasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle, bu ön çalışmada kloroform alkaloit ekstraktının sadece yüksek konsantrasyonları olan 250 ve 500 μ g/mL 18 saat fPC12 hücrelerine uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan antikor, dilüsyon oranları ve moleküler ağırlıkları Çizelge 3.7'de gösterilmiştir.

H₂O₂ ile indüklenen Akt/GSK-3 β /Tau nöral ölüm sinyal yolağı üzerine kloroform alkaloit ekstraktının etkisi

Bu çalışmada, H₂O₂ ile nöral hasara indüklenen fPC12 hücrelerinde, kloroform alkaloit ekstraktının azalmış p-Akt (Ser 473)/t-Akt ve p-GSK-3 β (Ser 9)/t-GSK-3 β protein oranını arttırıcı, artmış p-Tau (Ser 396)/Tau-5 ve p-Tau (Thr 212)/Tau-5 protein oranlarını azaltıcı ve buna bağlı olarak nöral ölüm yolları üzerindeki baskılayıcı dolayısıyla nöroprotektif etkisinin olup-olmadığının Western blot hibridizasyon yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Western blot analizinde p-Akt (Ser 473), t-Akt, p-GSK-3 β (Ser 9), t-GSK-3 β , p-Tau (Ser 396), p-Tau (Thr 212) ve t-Tau/Tau-5 hedef proteinlerin ifade düzeyleri GAPDH ile karşılaştırılarak incelenmiş, GAPDH'e göre normalize edilmiş ve protein seviyelerinin kendi içinde kontrole oranlanması yapılmıştır (Huang ve diğerleri, 2017; Jiang ve diğerleri, 2016b; Liu ve diğerleri, 2015a; Liu, Iqbal, Grundke-Iqbal, Hart ve Gong, 2004; Wang ve diğerleri, 2017; Yao ve diğerleri, 2016). Çalışmada kullanılan antikor, dilüsyon oranları ve moleküler ağırlıkları Çizelge 3.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. Western blot için kullanılan antikorlar, dilüsyon oranları ve molekül ağırlıkları

Antikor adı	Katalog numarası	Dilüsyon oranı	Molekül ağırlığı (kDa)	Üretici firma
GAPDH antibody	10494-1AP	1/2000	36	Proteintech
Anti-Tau (phospho S396) antibody [EPR2731]	ab109390	1/10000	50-70	Abcam
Phospho-Tau (Thr212) Polyclonal antibody	44-740G	1/500	~42	Thermo Fisher Scientific
Tau antibody (TAU-5)	sc-58860	1/200	51-66	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Goat anti-rabbit IgG (H+L), AP conjugate secondary antibody	SA00002-2	1/1000		Proteintech
Goat anti-mouse IgG (H+L), AP conjugate secondary antibody	31320	1/5000		Thermo Fisher Scientific
Phospho-AKT1 (S473) Antibody	CSB-PA000732	1/1500	55-72	Cusabio
AKT1 Antibody	CSB-PA149203	1/1500	48-85	Cusabio
Phospho-GSK3 β (S9) Antibody	CSB-PA000636	1/1500	40-55	Cusabio
GSK3 β Antibody	CSB-PA002848	1/1500	40-55	Cusabio

3.2.9. İstatistiksel analiz

Çalışmada yapılan istatistiksel analizlerde IBM SPSS 21.0 versiyonu kullanılmıştır. GC-MS analizlerine göre, total alkaloit ekstraktlarındaki allokrriptopin miktarları arasında anlamlı bir fark olup-olmadığı Tek Yönlü Anova Post Hoc Tukey HSD testi ile belirlenmiştir. Tüm deneylerde uygulama yapılmamış (kontrol) grup ile H₂O₂ uygulanmış grup arasındaki istatistiksel farklılıklar Levene Bağımsız Örneklem T-testi ile belirlenmiştir. H₂O₂ uygulanmış grup ile deney grupları arasındaki konsantrasyon ve/veya süreye bağlı farklılıklar için ise Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından post hoc Tukey HSD

testi (gruplar arasında ikili karşılaştırmalar için) kullanılmış çoklu grup karşılaştırmaları yapılmıştır. Analizler tekrarlı (GC-MS, MTT, flow sitometri ve qRT-PCR çalışmaları üç tekrarlı, Western blot çalışmaları ise iki tekrarlı) ve paralelli (GC-MS; n:3, MTT; n:6, flow sitometri; n:3, qRT-PCR; n:3, Western blot; n:2) olarak yapılmış olup, sonuçlar ortalama değer $\pm$ standart sapma (SD) olarak verilmiştir. İstatistiksel fark; % 95 önem düzeyinde, $p<0,05$ veya % 99 önem düzeyinde $p<0,01$ olarak belirlenmiştir.

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Alkaloit Ekstraktlarının Elde Edilmesine İlişkin Bulgular

Çalışmada *Glaucium grandiflorum* bitkisi ile üç farklı çözücü (kloroform, metanol ve su) kullanılarak yapılan alkaloit ekstraksiyonunda, çözücülere göre elde edilen alkaloit miktarı farklılık göstermiştir. Buna göre elde edilen total alkaloit miktarı sırasıyla metanol, kloroform ve su şeklindedir (Sonuçlar, 1001 TÜBİTAK 116S299 No'lu proje kapsamında olup, bu tez çalışmasında verilmemiştir).

4.2. Alkaloit Ekstraktlarının İçerik Analizlerine İlişkin Bulgular

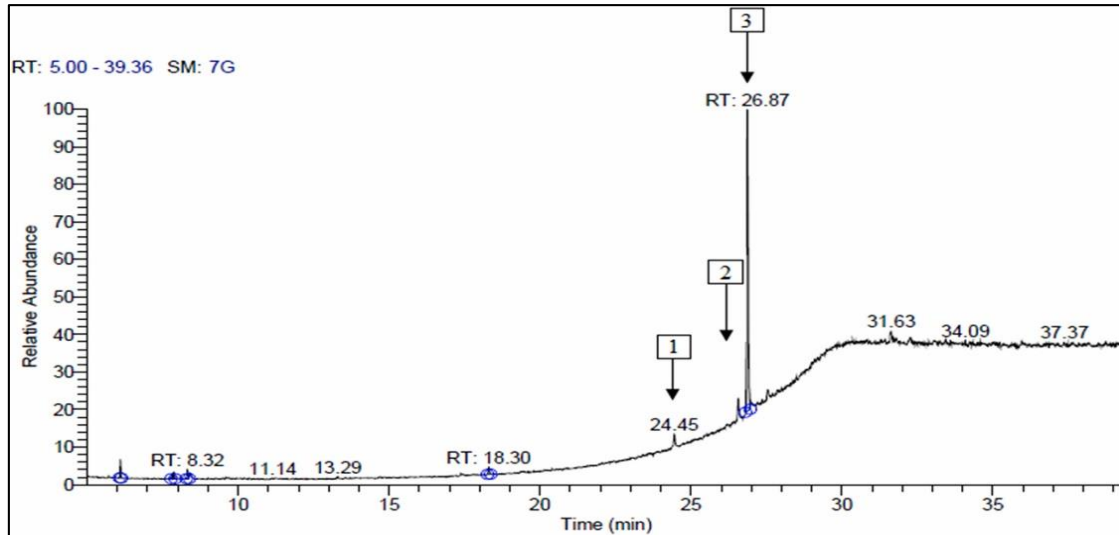
Bu çalışmada, *G. grandiflorum*'un üç farklı çözücüyle hazırlanan alkaloit ekstraktlarının GC-MS ile kalitatif ve kantitatif analizi yapılarak, majör alkaloit veya alkaloitleri, alkaloit profilleri ve bu alkaloitlerin % alanları ortaya konulmuştur. Ayrıca, ekstraksiyonda kullanılan farklı çözücülerle yapılan karşılaştırmalı çalışmalar ile *G. grandiflorum* bitkisi alkaloitlerinin en iyi çözücüdeki alkaloit çeşitliliği ve miktarı belirlenmiştir. Kloroform, metanol ve su alkaloit ekstraktlarına ait GC-MS sonuçlarına göre, kalitatif ve kantitatif analiz bulguları Çizelge 4.1-4.3'de ve alkaloit ekstraktlarına ait kromatogramlar ise Şekil 4.1-4.3'de gösterilmiştir. Alkaloitlerin, kütle spektral fragmentasyonu, WILEY7, REPLIB, PMWTOX 3N ve MAINLIB kütüphanelerine göre incelenmiş, sonuçlar WILEY7 kütüphanesi veri tabanının standart referans spektrumlarıyla karşılaştırılarak verilmiştir. Yapılan GC-MS analizlerinde, üç farklı çözücüde de aynı alkaloit bileşenleri belirlenmiş olup, çözücülere göre bu bileşenlerin oranlarının farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Alkaloit ekstraktlarında %46,4-91,5 [1,3]Benzodioxolo[5,6-e][2]benzazecin-14(6H)-one, 5,7,8,15-tetrahydro-3,4-dimethoxy-6-methyl-(allokriptopin), %1,5-31,8 6H-Dibenzo[a,g]quinolizine, 5,8,13,13a-tetrahydro-2,3,9,10-tetramethoxy-, (ñ)-(tetrahidropalmatin) ve %3,1-21,9 tetrahidroberberin N-oksit (Trans-kanadin-N-oksit) alkaloitleri belirlenmiştir. GC-MS analizine göre total alkaloit içeriği değerlendirildiğinde, en yüksek alkaloit oranı sırasıyla; metanol > su > kloroform olarak belirlenmiş olup, total alkaloit oranı üç farklı çözücünün ekstraksiyonunda da yüksek oranda bulunmuştur. Majör alkaloit ise, her üç çözücü için de allokriptopin olarak belirlenmiştir. Alkaloit ekstraktlarındaki en yüksek allokriptopin alanına göre sıralama; kloroform (%91,5) > su (%84,0) > metanol (%46,4) şeklinde olmuştur. Bu bulgular, alkaloit ekstraksiyonu ile yüksek

miktarda ve saflıkta alkaloit elde ettiğimiz göstergesidir. Ayrıca, kromatogramlarda yer alan pikler de bu sonucumuzu desteklemektedir.

Çizelge 4.1. WILEY7 kütüphanesi veri tabanına göre kloroform alkaloit ekstraktının bileşen içeriği

Pik	Bileşen	Sinonim	Formül	Yapı	*RT (dk)	Alan (%)
1	6H-Dibenzo[a,g]quinolizine, 5,8,13,13a-tetrahydro-2,3,9,10-tetramethoxy-, (R)-	Tetrahidropalmatin	$C_{21}H_{25}NO_4$	Alkaloit	24,45	1,45
2	Tetrahydroberberine N-oxide	Trans-kanadin-N-oksit	$C_{20}H_{21}NO_5$	Alkaloit	26,52	3,11
3	[1,3]Benzodioxolo[5,6-e][2]benzazecin-14(6H)-one, 5,7,8,15-tetrahydro-3,4-dimethoxy-6-methyl-	Allokriptopin	$C_{21}H_{23}NO_5$	Alkaloit	26,87	91,53

*RT (dk): Alıkonma zamanı. Bir maddenin GC-MS cihazına enjekte edilişi sonrası dedektörde sinyalinin görülmesine kadar geçen süre.

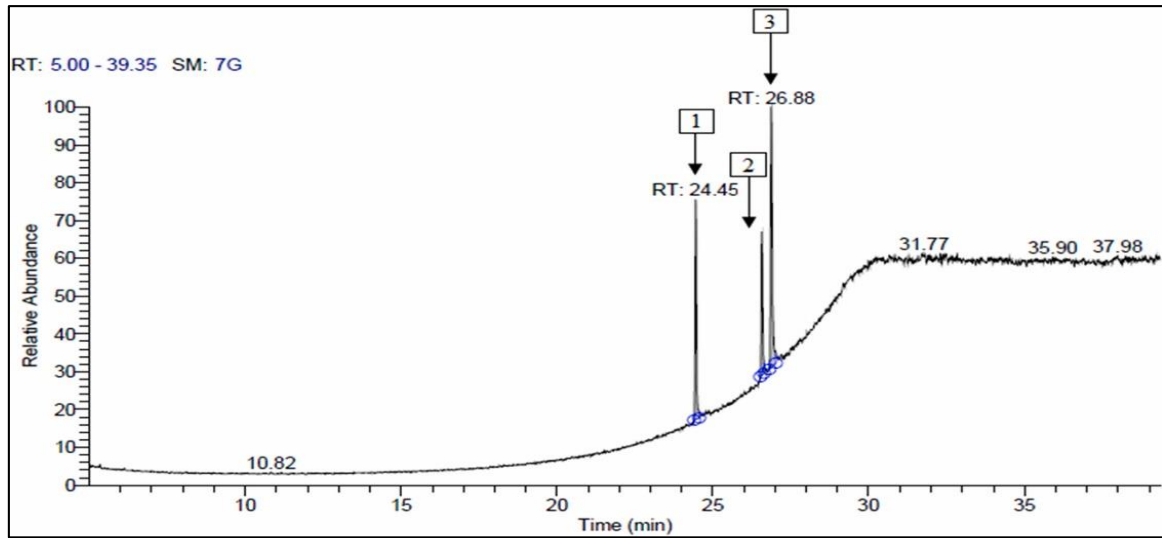


Şekil 4.1. Kloroform alkaloit ekstraktının kromatogramı.

Çizelge 4.2. WILEY7 kütüphanesi veri tabanına göre metanol alkaloit ekstraktının bileşen içeriği

Pik	Bileşen	Sinonim	Formül	Yapı	*RT (dk)	Alan (%)
1	6H-Dibenzo[a,g]quinolizine, 5,8,13,13a-tetrahydro-2,3,9,10-tetramethoxy-, (ñ)-	Tetrahidropalmatin	$C_{21}H_{25}NO_4$	Alkaloit	24,45	31,77
2	Tetrahydroberberine N-oxide	Trans-kanadin-N-oksit	$C_{20}H_{21}NO_5$	Alkaloit	26,58	21,87
3	[1,3]Benzodioxolo[5,6-e][2]benzazecin-14(6H)-one, 5,7,8,15-tetrahydro-3,4-dimethoxy-6-methyl-	Allokriptopin	$C_{21}H_{23}NO_5$	Alkaloit	26,88	46,36

*RT (dk): Alıkonma zamanı. Bir maddenin GC-MS cihazına enjekte edilişi sonrası dedektörde sinyalinin görülmesine kadar geçen süre.

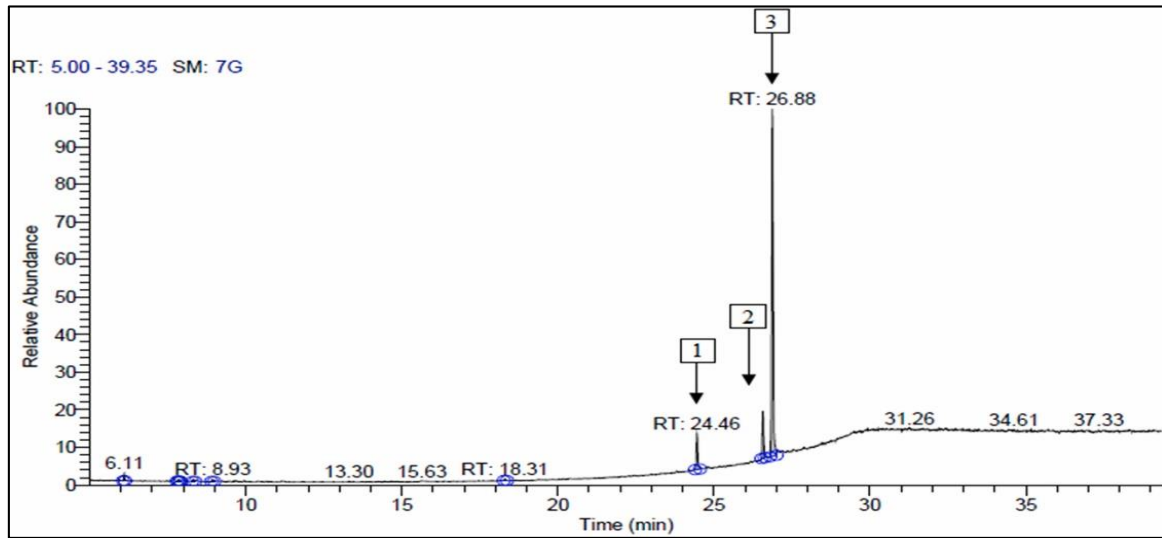


Şekil 4.2. Metanol alkaloit ekstraktının kromatogramı.

Çizelge 4.3. WILEY7 kütüphanesi veri tabanına göre su alkaloit ekstraktının bileşen içeriği

Pik	Bileşen	Sinonim	Formül	Yapı	*RT (dk)	Alan (%)
1	6H-Dibenzo[a,g]quinolizine, 5,8,13,13a-tetrahydro-2,3,9,10-tetramethoxy-, (ñ)-	Tetrahidropalmatin	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	Alkaloit	24,46	5,90
2	Tetrahydroberberine N-oxide	Trans-kanadin-N-oksit	C ₂₀ H ₂₁ NO ₅	Alkaloit	26,54	8,71
3	[1,3]Benzodioxolo[5,6-e][2]benzazecin-14(6H)-one, 5,7,8,15-tetrahydro-3,4-dimethoxy-6-methyl-	Allokriptopin	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	Alkaloit	26,88	84,03

*RT (dk): Altkonma zamanı. Bir maddenin GC-MS cihazına enjekte edilişi sonrası dedektörde sinyalinin görülmesine kadar geçen süre.



Şekil 4.3. Su alkaloit ekstraktının kromatogramı.

Çalışmada, *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform, metanol ve su alkaloit ekstraktlarının allokriptopin miktarı standart eğri denkleminde göre belirlenmiştir. Alkaloit ekstraktlarındaki allokriptopin miktarlarının kloroform (497 µg/mg) > metanol (248 µg/mg) > su (236 µg/mg) şeklinde olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). Alkaloit ekstraktlarındaki allokriptopin miktarı istatistiksel olarak incelendiğinde, kloroform alkaloit ekstraktındaki allokriptopin miktarı ile metanol ve su alkaloit ekstraktındaki allokriptopin miktarı arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, metanol ve su alkaloit ekstraktlarındaki allokriptopin miktarları arasında da bir fark bulunmuştur. İstatistiksel analizler, bu sonuçların 0,05 düzeyinde anlamlı olduğunu kanıtlamıştır (**p*<0,05).

Çizelge 4.4. GC-MS ile belirlenen alkaloit ekstraktlarındaki allokrriptopin miktarları

Ekstraktlar	Ortalama alan değerleri	Allokrriptopin miktarı (μg allokrriptopin/mg ekstrakt)*	% Allokrriptopin (g allokrriptopin/100 g bitki)*
Kloroform	1.894.570,22	497 $\pm$ 5	0,20 $\pm$ 0,01
Metanol	1.002.788,26	248 $\pm$ 4	0,12 $\pm$ 0,03
Su	885.011,94	236 $\pm$ 6	0,07 $\pm$ 0,01

Ortalama alan değeri: Kromatogramda yer alan piki oluşturan eğri ile taban çizgisi arasında kalan alanı ifade eden yüzde alan değeri. Ortalama değer $\pm$ SD, (n:3). * $p<0,05$ allokrriptopin miktarı açısından alkaloit ekstraktları arasındaki fark.

Kloroform alkaloit ekstraktında her iki alkaloit ekstraktına göre iki kat yüksek miktarda allokrriptopin belirlenmiştir. Bu sonuçlar, kloroformun diğer çözücüler ile karşılaştırıldığında, allokrriptopin için daha iyi bir çözücü olduğunu göstermektedir. Çalışmada, her üç alkaloit ekstraktında belirlenen allokrriptopin miktarı esas alınarak, alkaloit ekstraktlarının uygulama konsantrasyonlarındaki allokrriptopin miktarı $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır. Alkaloit ekstraktlarının uygulama gruplarında 100, 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ dozlara karşılık gelen allokrriptopin miktarları Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Uygulanan kloroform, metanol ve su alkaloit ekstraktı dozlarındaki allokrriptopin miktarı

Dozlar ($\mu\text{g/mL}$)	Allokrriptopin miktarı ($\mu\text{g/mL}$)		
	Kloroform	Metanol	Su
100	50	25	24
250	124	62	59
500	248	124	118

4.3. H_2O_2 ve Alkaloit Ekstraktlarının PC12 Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

Bu çalışmada, PC12 hücrelerinde toksik etkisi olmayan veya düşük etkisi olan ve hücreleri nöral hasara indükleyen yani deney modelinin oluşmasında etkili H_2O_2 konsantrasyonu ve uygulama süresi belirlenmiştir. Yapılan MTT analizlerinde, 200 μM H_2O_2 ’nin 24 saatlik uygulaması sonrası PC12 hücrelerinde %55 $\pm$ 5 hücre canlılığı tespit edilmiştir. Bu sonuç, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup (* $p<0,05$), istatistiksel analiz deney sonuçlarını doğrulamıştır. Çalışmada canlılığı %50’nin üzerinde bulduğumuz H_2O_2 konsantrasyon ve

uygulama süreleri kabul edilebilir düzeyde değerlendirilmiştir. Ağır sitotoksik etki gösterebileceği konsantrasyonlarda apoptozdan çok nekroz oluşturma ihtimali nedeniyle, çalışma için 24 saat uygulamada 300 μM konsantrasyon ile 48 saat uygulamada 200 ve 300 μM konsantrasyonlar tercih edilmemiştir (Çizelge 4.6). H_2O_2 'nin düşük konsantrasyon ve inkübasyonları da PC12 hücre modelimizde apoptozun belirlenememesi ihtimalinden dolayı tercih edilmemiştir. Çalışmada, amacımız PC12 hücreleri üzerinde orta derecede sitotoksik etki oluşturup, yüksek oranda apoptotik süreçlerin indüksiyonunu sağlayabilmektir. Bu nedenle, bundan sonraki çalışmalarda PC12 hücrelerinde orta derecede sitotoksisiteyi indükleyen en yüksek konsantrasyon ve süre olan 200 μM H_2O_2 konsantrasyonunun 24 saatlik uygulaması kullanılmıştır.

Çizelge 4.6. H_2O_2 uygulanmış PC12 hücrelerinin kontrole göre yüzde canlılıkları

Uygulama grupları	% Hücre canlılığı		
	12 saat	24 saat	48 saat
Kontrol ^a	100±6	100±2	100±3
<u>H_2O_2 (μM)^b</u>			
100	92±6*	81±5*	78±5*
150	90±7*	68±8*	68±6*
200	87±6*	55±5*	50±7*
300	86±5*	52±9*	50±4*

^aDMEM'de geliştirilmiş, herhangi bir uygulama yapılmamış PC12 hücreleri. ^b H_2O_2 içeren (100, 150, 200 ve 300 μM) DMEM'de geliştirilmiş PC12 hücreleri. Ortalama değer $\pm$ SD, (n:6). * $p<0,05$ kontrole göre H_2O_2 uygulanmış gruplarda hücre canlılığı.

Çalışmada, *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform, metanol ve su alkaloit ekstraktlarının PC12 hücreleri üzerinde toksik olmayan en yüksek dozu ve uygulama süresi MTT yöntemi ile tespit edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.7'de verilmiş olup, çizelgedeki kontrol 1; DMEM'de geliştirilmiş ve herhangi bir uygulama yapılmamış PC12 hücrelerinin canlılığını gösterirken, kontrol 2; %0,5 DMSO (alkaloit ekstraktı çözücüsü) içeren DMEM'de geliştirilmiş PC12 hücrelerinin canlılığını göstermektedir. Uygulanan tüm alkaloit ekstraktlarının doz (100-1000 $\mu\text{g/mL}$) ve süre ile doğru orantılı olarak hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. Alkaloit ekstraktlarının 18 saatlik uygulamalarında, 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda kontrole göre anlamlı bir hücre azalması tespit edilmezken ($p>0,05$), diğer tüm konsantrasyonların PC12 hücre canlılığını kontrole göre azalttığı tespit edilmiştir. İstatistiksel analizler, bu azalmanın 0,05 düzeyinde anlamlı olduğunu kanıtlamıştır (* $p<0,05$). Uygulamalarda en yüksek konsantrasyon olan 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik

konsantrasyonun %50'nin üzerinde ölümü indüklediği, bu nedenle deneysel çalışmalar için uygun olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuç esas alınarak bundan sonraki çalışmalarda her üç çözücü ekstraktı için 100, 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonları denenmiştir. 100-500 µg/mL konsantrasyonlarda hücre canlılığındaki azalmanın %50'nin üzerinde olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Alkaloit ekstraktlarının üç farklı uygulama sürelerinde artan süreye bağlı olarak hücre canlılığında azalma görülmekle birlikte, uygulama süreleri arasında farklılığın dikkate değer olmadığı belirlenmiştir. 24 saatlik inkübasyonda kısmi de olsa 12 ve 18 saatlik inkübasyona göre ölümün gözlenmesi, 12 saatlik uygulamada da etkinin tam belirlenememe riski göz önüne alınarak, PC12 hücrelerinin alkaloit ekstraktları ile inkübasyonunda en uygun süre 18 saat olarak belirlenmiştir. Bitki alkaloit ekstraktlarının toksik olmaması ve yüksek konsantrasyonlarda bile çok düşük düzeyde toksik etki göstermesi (ISO, 2009), çalışmamızın başarı ölçütlerini etkileyecek önemli bir sonucudur. Alkaloit ekstraktlarının toksik olmaması, bunların ticari olarak güvenli kullanımını mümkün kılacaktır.

Çizelge 4.7. Farklı konsantrasyon ve sürelerde alkaloit ekstraktları uygulanmış PC12 hücrelerinin kontrole göre yüzde canlılıkları

Uygulama grupları		% Hücre canlılığı		
		12 saat	18 saat	24 saat
Kontrol 1 ^a		100±3	100±5	100±5
Kontrol 2 ^b		99±7	99±4	98±5
	Konsantrasyonlar (µg/mL)			
Kloroform	100	96±5	95±4	94±5*
	250	91±4*	88±5*	83±7*
	500	82±3*	73±7*	73±5*
	1000	27±4*	17±7*	13±1*
Metanol	100	97±2	95±5	95±6
	250	94±3*	92±5*	90±6*
	500	87±8*	87±8*	86±8*
	1000	68±3*	49±8*	35±5*
Su	100	97±3	97±6	95±5
	250	94±6*	93±4*	91±4*
	500	88±2*	87±4*	85±6*
	1000	73±7*	29±8*	19±1*

^aDMEM'de geliştirilmiş, herhangi bir uygulama yapılmamış PC12 hücreleri. ^b% 0,5 DMSO (Alkaloit ekstraktı çözücüsü) içeren DMEM'de geliştirilmiş PC12 hücreleri. Ortalama değer ± SD, (n:6). *p<0,05 kontrole göre alkaloit ekstraktı uygulanmış gruplarda hücre canlılığı.

4.4. H₂O₂ ile İndüklenen PC12 Hücrelerinde Alkaloit Ekstraktlarının Hücre Canlılığı Üzerine Koruyucu Etkileri

Bu çalışmada, *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform, metanol ve su alkaloit ekstraktlarının oksidatif stresle indüklenmiş PC12 hücrelerinin canlılığını koruyucu etkileri ortaya konulmuştur. Bir önceki çalışmada belirlenen konsantrasyonlardaki (100, 250 ve 500 µg/mL) alkaloit ekstraktlarının 18 saat inkübasyonu sonrası, 200 µM H₂O₂'in 24 saat uygulanmasının ardından, PC12 hücrelerindeki canlılık oranları belirlenerek alkaloit ekstraktlarının koruyucu etkisi gösterilmiştir (Çizelge 4.8). H₂O₂ uygulaması sonrası PC12 hücre canlılığında kontrole göre bir azalma belirlenmiştir ve hücre canlılığı %55±8 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup ($p<0,05$), istatistiksel analiz deney sonucunu doğrulamıştır. Kloroform alkaloit ekstraktının 100 ve 250 µg/mL'lik konsantrasyonlarının PC12 hücrelerini H₂O₂'nin indüklediği hücre ölümünden koruduğu belirlenmiştir. Deneylerde, sadece H₂O₂ uygulanmış grup ile deney grupları arasındaki farklar istatistiksel olarak analiz edildiğinde, genel olarak hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark olduğu belirlenmiş olup ($p<0,05$), istatistiksel analiz deney sonuçlarını doğrulamıştır. Metanol ve su alkaloit ekstraktları ile yapılan uygulamalarda tüm konsantrasyonların (100-500 µg/mL), PC12 hücrelerini H₂O₂'nin indüklediği hücre ölümünden koruduğu belirlenmiştir. Alkaloit ekstraktları ile yapılan uygulamaların tüm konsantrasyonlarında en iyi korumayı (%42-71 oranlarında koruma) su alkaloit ekstraktı, ikinci sırada da metanol alkaloit ekstraktı göstermiştir.

Çizelge 4.8. Alkaloit ekstraktları ve H₂O₂ uygulanmış PC12 hücrelerinin kontrole göre yüzde canlılıkları

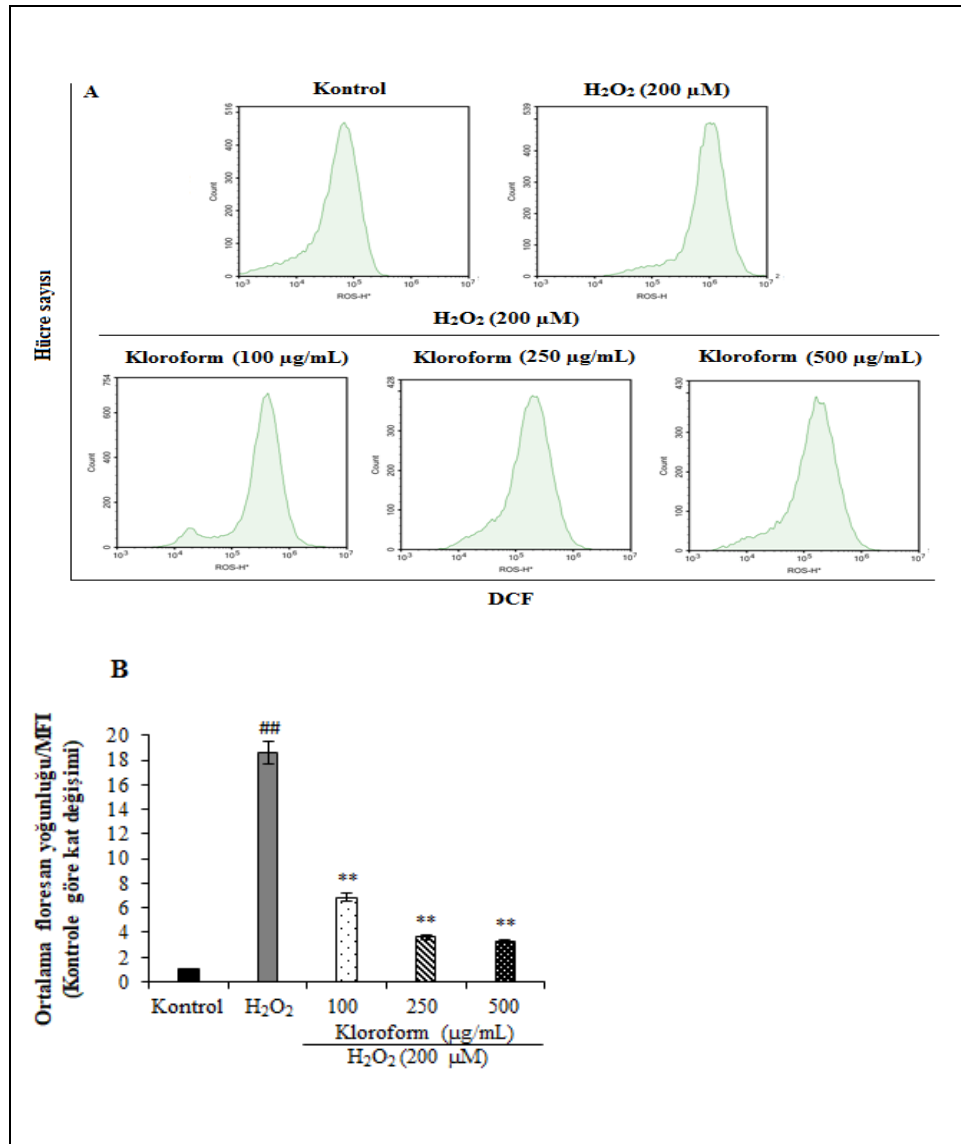
Uygulama grupları		% Hücre canlılığı
Kontrol 1 ^a		100±3
Kontrol 2 ^b		97±6
H ₂ O ₂ ^c		55±8 [#]
Ekstraktlar	Konsantrasyonlar (µg/mL)	
Kloroform + H ₂ O ₂	100	78±5*
	250	73±4*
	500	58±3
Metanol + H ₂ O ₂	100	80±6*
	250	78±2*
	500	64±7*
Su +H ₂ O ₂	100	94±6*
	250	91±4*
	500	78±6*

^aDMEM’de geliştirilmiş, herhangi bir uygulama yapılmamış PC12 hücreleri. ^b% 0,5 DMSO içeren DMEM’de geliştirilmiş PC12 hücreleri. ^c200 µM H₂O₂ içeren DMEM’de geliştirilmiş PC12 hücreleri. Ortalama değer ± SD, (n:6). [#]*p*<0,05 kontrole göre H₂O₂ uygulanmış grupta hücre canlılığı. **p*<0,05 H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında hücre canlılığı.

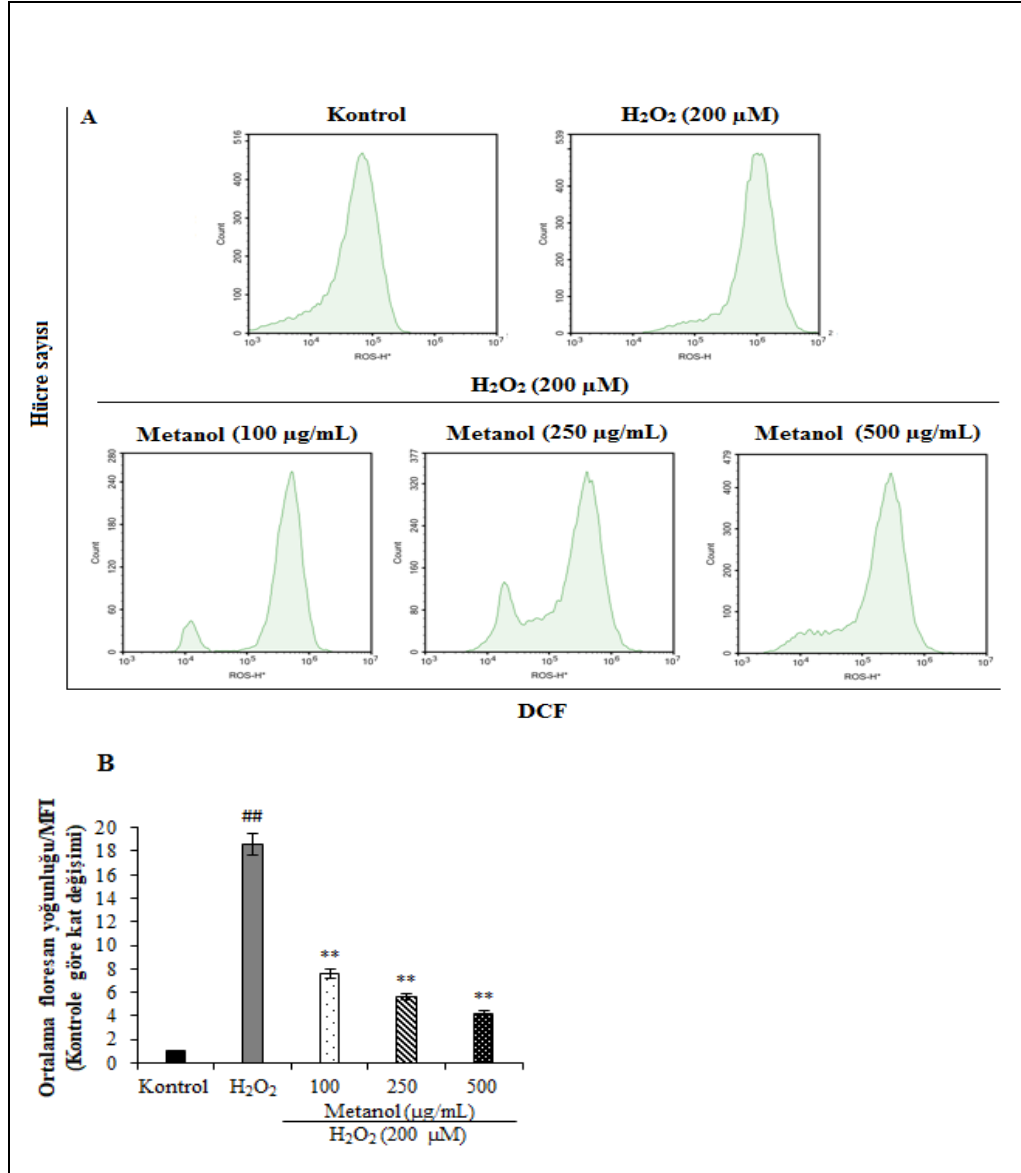
4.5. Alkaloit Ekstraktlarının Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri Seviyesi Üzerine Baskılayıcı Etkileri

Çalışmada, fPC12 hücrelerinde H₂O₂ ile indüklenen hücre içi ROS seviyesi üzerinde *G. grandiflorum*’dan elde edilen kloroform, metanol ve su alkaloit ekstraktlarının baskılayıcı, bununla ilişkili olarak da anti-oksidatif etkileri flow sitometri analizi ile ortaya konulmuştur. H₂O₂ ile oksidatif strese indüklenmiş fPC12 hücrelerinde kontrol grubuna göre ROS seviyesinde 18,6 kat artış gözlenmiştir (Şekil 4.4-4.6). Bu sonuç, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup ([#]*p*<0,01), istatistiksel analiz deney sonucunu doğrulamıştır. H₂O₂ grubunda ROS seviyesinin artışı oksidatif strese indüklenmiş nörodejeneratif hücre modelinin başarıyla oluşturulduğunun kanıtı olmuştur. Belirlenen konsantrasyonlarda kloroform alkaloit ekstraktı ve H₂O₂’nin uygulandığı fPC12 hücrelerinde, sadece H₂O₂ uygulanmış fPC12 hücrelerine göre MFI 2,7-5,7 kat baskılanmıştır. Bulgular, H₂O₂ indüklü ROS seviyesindeki artışın, alkaloit ekstraktının konsantrasyonunun artışına bağlı olarak azaldığını göstermiştir (Şekil 4.4). Metanol (2,4-4,4 kat baskılama) ve su (2,3-4,0 kat baskılama) alkaloit ekstraktları ile yapılan uygulamalarda da benzer şekilde H₂O₂’nin indüklediği ROS seviyesindeki artışın azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5 ve 4.6). Tüm uygulamalarda sadece

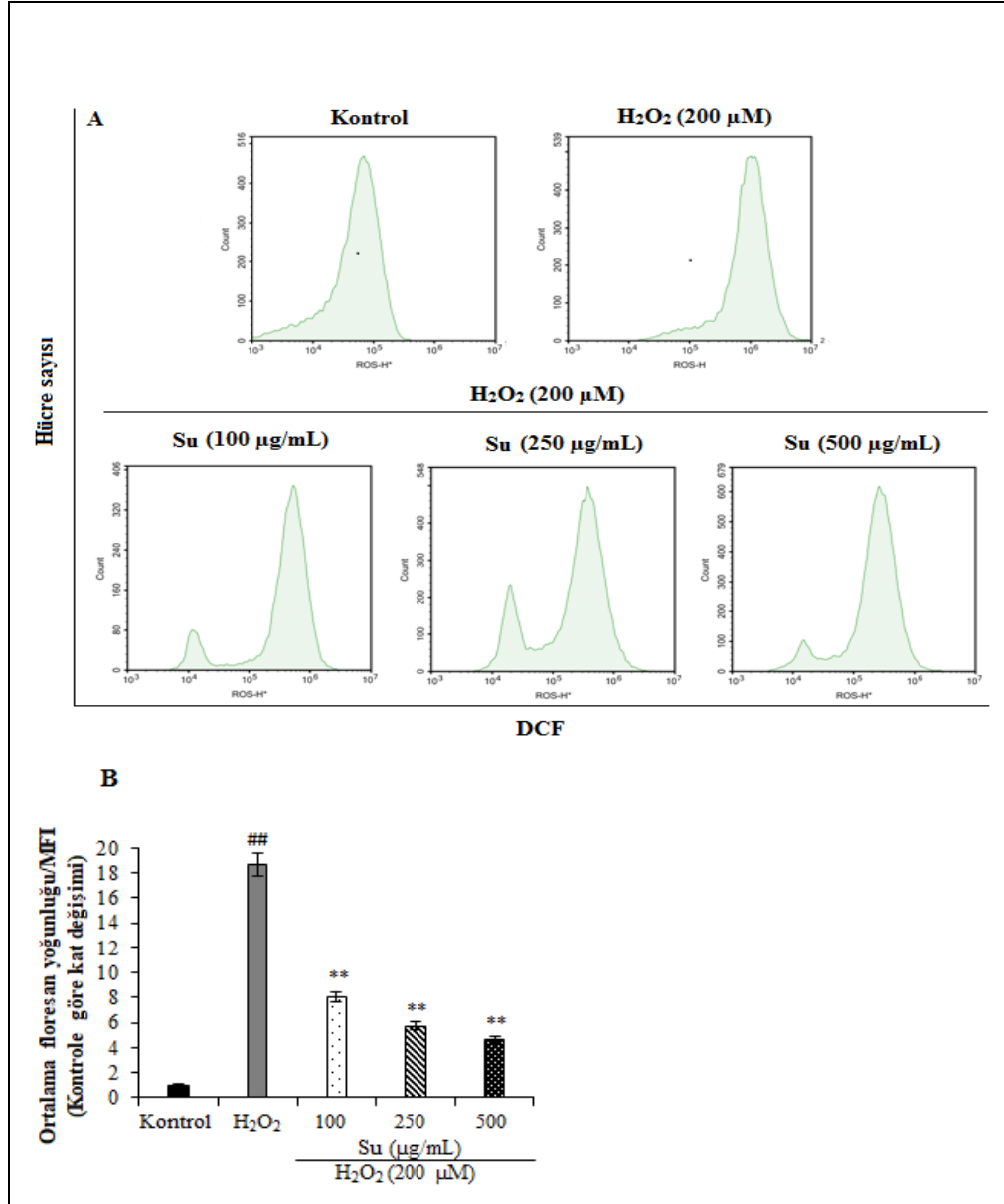
H₂O₂ uygulanmış grup ile deney grupları arasında hücre içi ROS seviyesi açısından bir fark tespit edilmiştir. İstatistiksel analizler, bu farkın 0,01 düzeyinde anlamlı olduğunu kanıtlamıştır (** $p<0,01$). Bulgular genel olarak değerlendirildiğinde, flow sitometri ve qRT-PCR ile yapılan apoptoz analizlerinde olduğu gibi (bkz.4,6-4,8) kloroform alkaloit ekstraktının diğer alkaloit ekstraktlarına göre, ROS'a karşı nöroprotektif etki bakımından daha öne çıktığı dikkati çekmiştir. Bu durumun kloroform alkaloit ekstraktındaki majör alkaloit olan allokriptopin miktarının metanol ve su ekstraktına göre daha fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.4. H₂O₂ ile indüklenen hücre içi ROS seviyesi üzerine kloroform alkaloit ekstraktının nöroprotektif etkisinin flow sitometri analizi ile belirlenmesi. A: Flow sitometri histogram grafiği. B: Sütun grafiği. Ortalama değer $\pm$ SD, n:3. ## $p<0,01$ kontrole göre H₂O₂ uygulanmış grupta MFI; ** $p<0,01$ H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında MFI.



Şekil 4.5. H₂O₂ ile indüklenen hücre içi ROS seviyesi üzerine metanol alkaloit ekstraktının nöroprotektif etkisinin flow sitometri analizi ile belirlenmesi. A: Flow sitometri histogram grafiği. B: Sütun grafiği. Ortalama değer $\pm$ SD, n:3. ## $p<0,01$ kontrole göre H₂O₂ uygulanmış grupta MFI; ** $p<0,01$ H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında MFI.

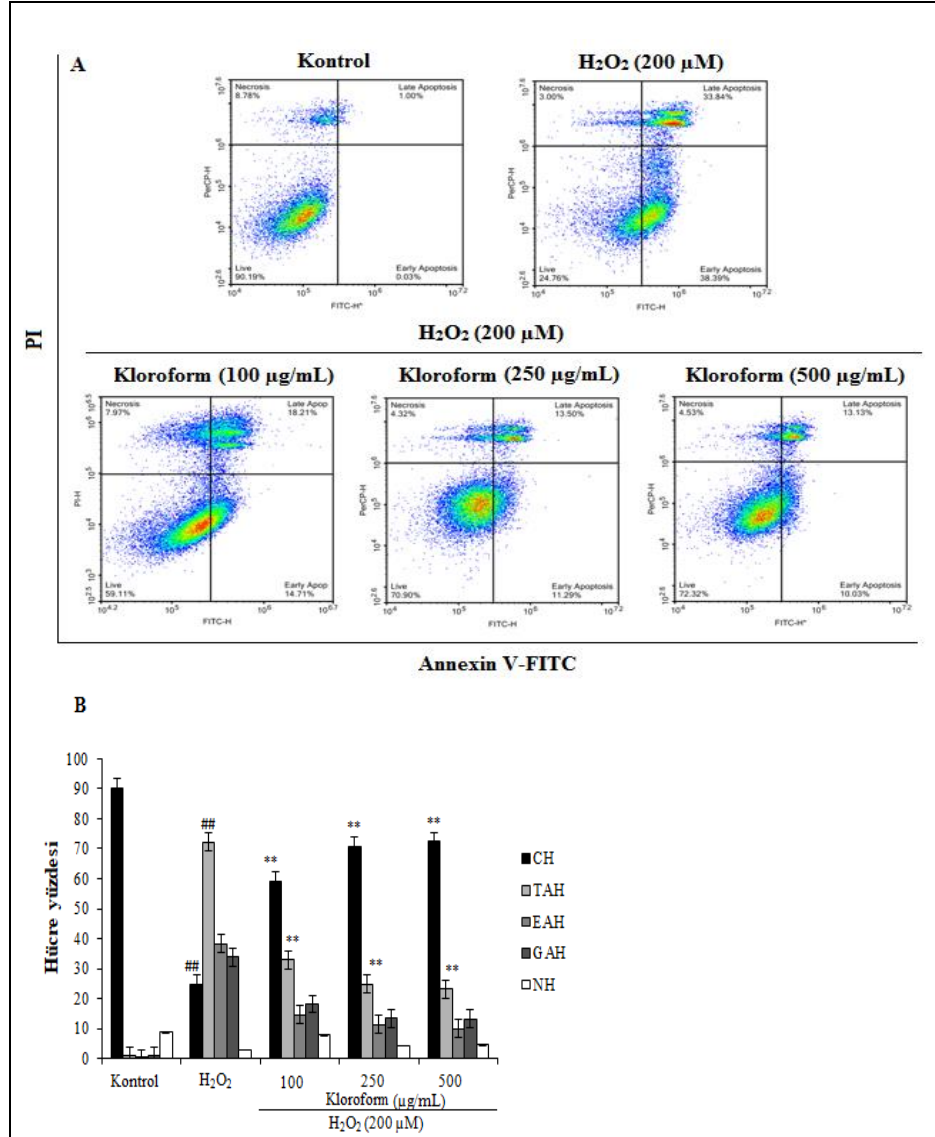


Şekil 4.6. H₂O₂ ile indüklenen hücre içi ROS seviyesi üzerine su alkaloit ekstraktının nöroprotektif etkisinin flow sitometri analizi ile belirlenmesi. A: Flow sitometri histogram grafiği. B: Sütun grafiği. Ortalama değer $\pm$ SD, n:3. ## $p < 0,01$ kontrole göre H₂O₂ uygulanmış grupta MFI; ** $p < 0,01$ H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında MFI.

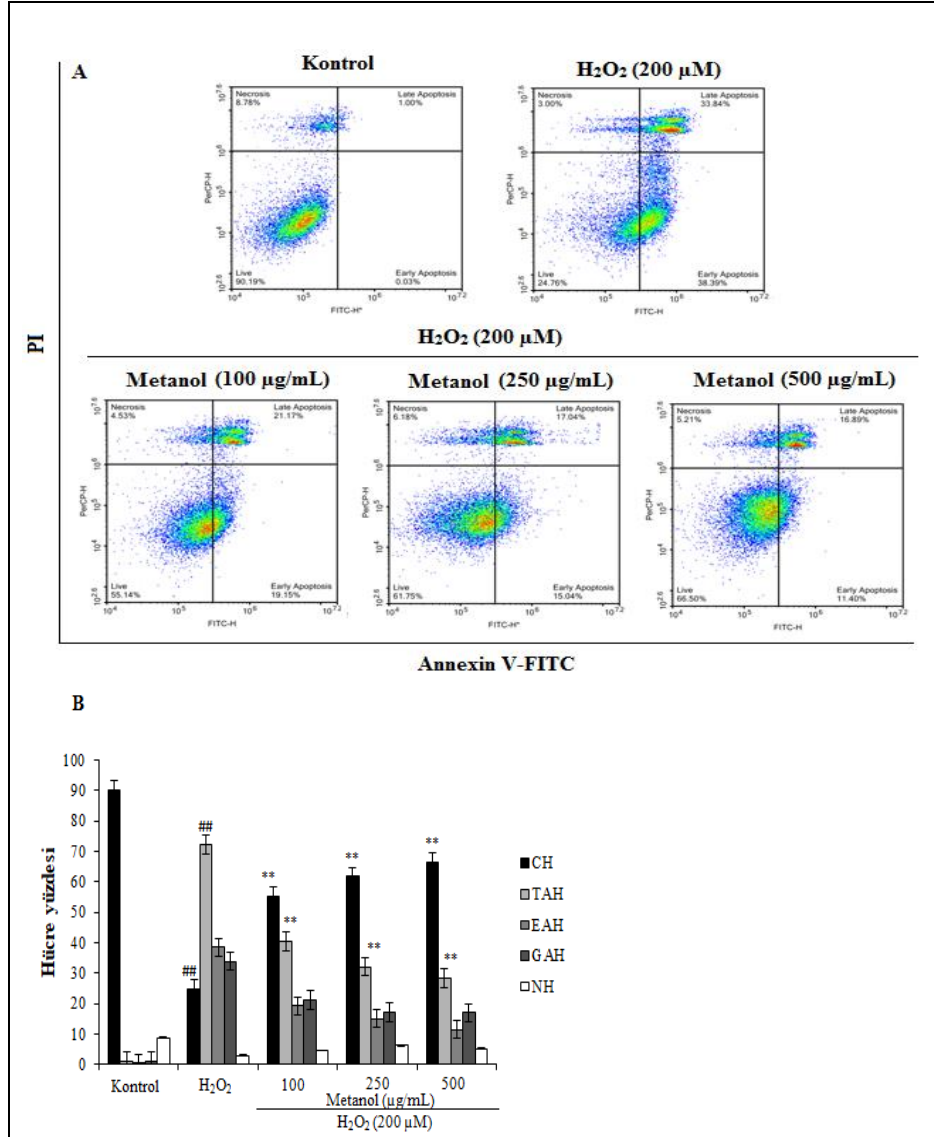
4.6. Alkaloit Ekstraktlarının Nöral Apoptoz Üzerine Baskılayıcı Etkileri

Bu çalışmada, H₂O₂ ile apoptoza indüklenen fPC12 hücrelerinde, hücre deney modelinin kontrolü ve oluşturulan bu deney modelinde *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform, metanol ve su alkaloit ekstraktlarının, nöral apoptoza karşı anti-apoptotik etkileri flow sitometrik analizle belirlenmiştir. Analiz sonuçları canlı hücre (CH), toplam apoptik hücre (TAH), erken apoptotik hücre (EAH), geç apoptotik hücre (GAH) ve nekrotik hücre (NH)

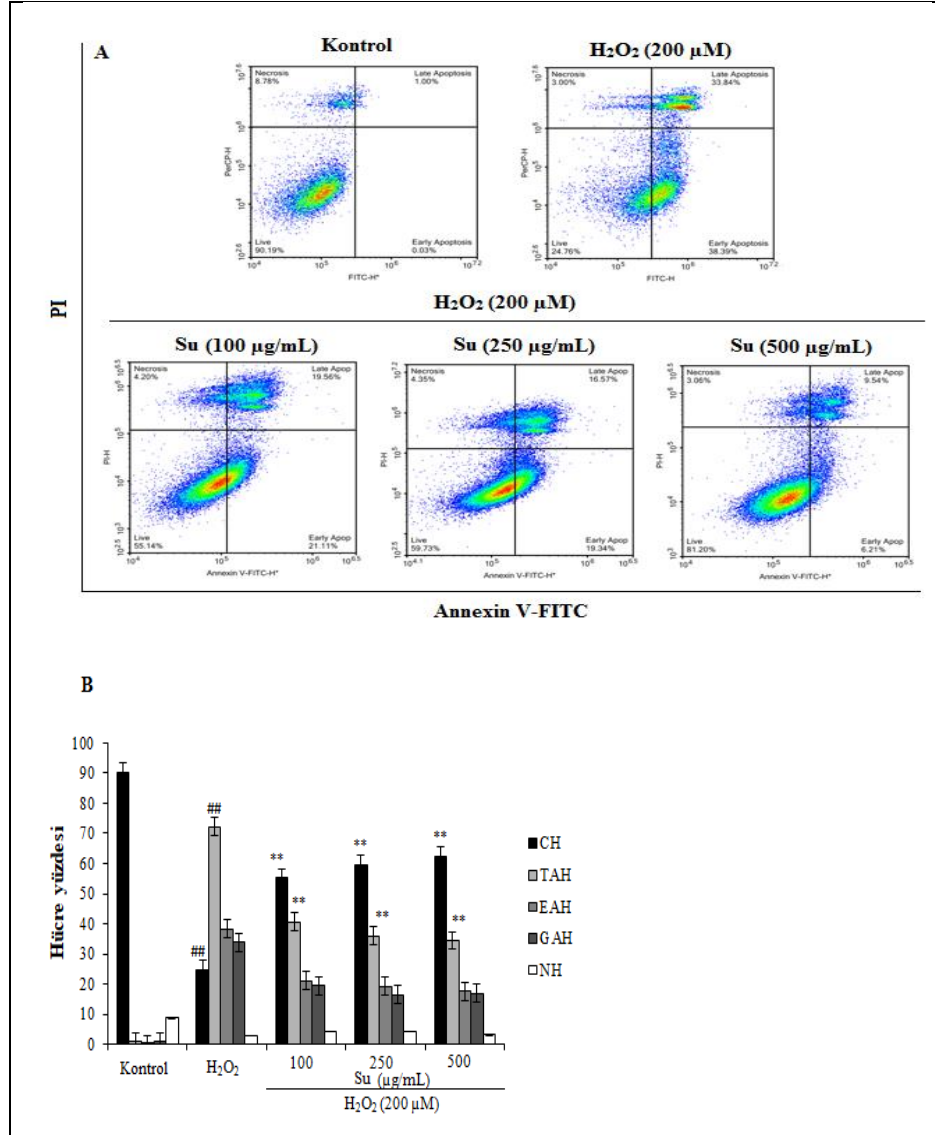
yüzdeleri şeklinde verilmiştir. Her bölümdeki hücre yüzdeleri hesaplanıp, ortalama yüzde değerler grafiğe dönüştürülmüştür. Çalışmada, hiçbir uygulama yapılmamış kontrol grubu hücrelerinde %1,0 ve H₂O₂ uygulanmış fPC12 hücrelerinde ise, %72,2 oranında apoptotik ve %3,0 oranında NH belirlenmiştir. NH yüzdesinin apoptotik hücre yüzdesine göre oldukça düşük kaldığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar, H₂O₂ ile oluşturulmuş nörodejeneratif hücre modelinin nekrozdan ziyade apoptoza indüklendiğinin kanıtı olmuştur. Buna göre, nörodejeneratif hücre modeli için gerekli olan nöral apoptoz modelinin başarı ile oluşturulduğu görülmüştür. H₂O₂ uygulamasına bağlı, CH yüzdesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalış ve EAH ile GAH yüzdesinde de (TAH yüzdesi) kontrol grubuna göre anlamlı bir artış belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık 0,01 düzeyinde belirlenmiş olup, istatistiksel analiz deney sonuçlarını doğrulamıştır (^{##}*p*<0,01). Diğer taraftan, belirlenen konsantrasyonlarda kloroform alkaloit ekstraktı ile H₂O₂'nin uygulandığı fPC12 hücrelerinde, apoptotik hücre oranları %23,2-32,9 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, H₂O₂'nin indüklediği apoptoz seviyesindeki artışın, alkaloit ekstraktının konsantrasyonunun artışına bağlı olarak azaldığını, dolayısıyla nöral apoptozun baskılandığını göstermiştir. Ayrıca, bu anti-apoptotik etkinin deney gruplarının birçoğunda erken apoptoz evresinde daha bariz olduğu görülmüştür (Şekil 4.7). Sadece H₂O₂ uygulanmış grup ile deney grupları arasında CH ve TAH yüzdesi açısından bir fark belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık 0,01 düzeyinde belirlenmiş olup, istatistiksel analiz deney sonuçlarını doğrulamıştır (^{**}*p*<0,01). Metanol (%24,8-40,3 apoptotik hücre) ve su (%34,5-40,7 apoptotik hücre) alkaloit ekstraktları ile yapılan uygulamalarda da benzer şekilde H₂O₂'nin indüklediği apoptoz seviyesindeki artışın doza bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.8 ve 4.9). Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, nörodejeneratif hücre modelinin nöral apoptozu indükleyerek başarılı bir şekilde oluştuğu gösterilmiştir. Kloroform alkaloit ekstraktının diğer ekstraktlara göre, nöral apoptoza karşı nöroprotektif etki bakımından daha öne çıktığı dikkati çekmiştir. Bu durumun kloroform alkaloit ekstraktındaki majör alkaloit olan allokriptopin miktarının metanol ve su alkaloit ekstraktlarına göre daha fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, gen ekspresyon çalışmalarında da kloroform alkaloit ekstraktının nöral apoptoza karşı nöroprotektif etkisinin diğer ekstraktlara göre öne çıkmış olması, bu sonucun iki ayrı çalışma ile desteklenmesini sağlamış ve öngörümüzü daha da kuvvetlendirmiştir (bkz. 4.8).



Şekil 4.7. H₂O₂ ile indüklenen nöral apoptoz üzerine kloroform alkaloit ekstraktının nöroprotektif etkisinin flow sitometri analizi ile belirlenmesi. A: Flow sitometri diyagramı. B: Histogram. Ortalama değer $\pm$ SD, n:3. ## $p < 0,01$ kontrole göre H₂O₂ uygulanmış grupta CH ve TAH yüzdeleri; ** $p < 0,01$ H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında CH ve TAH yüzdeleri.



Şekil 4.8. H₂O₂ ile indüklenen nöral apoptoz üzerine metanol alkaloit ekstraktının nöroprotektif etkisinin flow sitometri analizi ile belirlenmesi. A: Flow sitometri diyagramı. B: Histogram. Ortalama değer $\pm$ SD, n:3. ## $p < 0,01$ kontrole göre H₂O₂ uygulanmış grupta CH ve TAH yüzdeleri; ** $p < 0,01$ H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında CH ve TAH yüzdeleri.

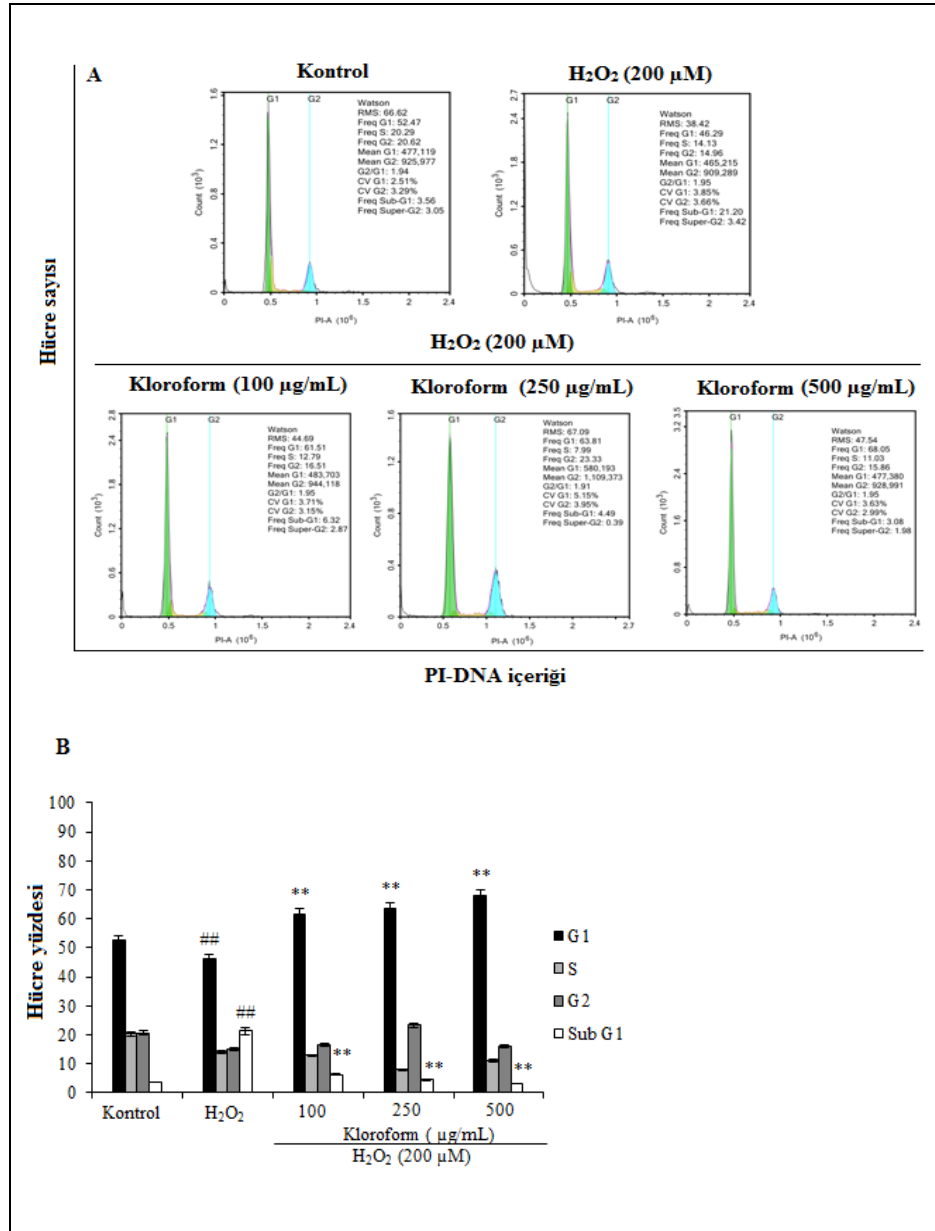


Şekil 4.9. H₂O₂ ile indüklenen nöral apoptoz üzerine su alkaloit ekstraktının nöroprotektif etkisinin flow sitometri analizi ile belirlenmesi. A: Flow sitometri diyagramı. B: Histogram. Ortalama değer $\pm$ SD, n:3. ## $p<0,01$ kontrole göre H₂O₂ uygulanmış grupta CH ve TAH yüzdeleri; ** $p<0,01$ H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında CH ve TAH yüzdeleri.

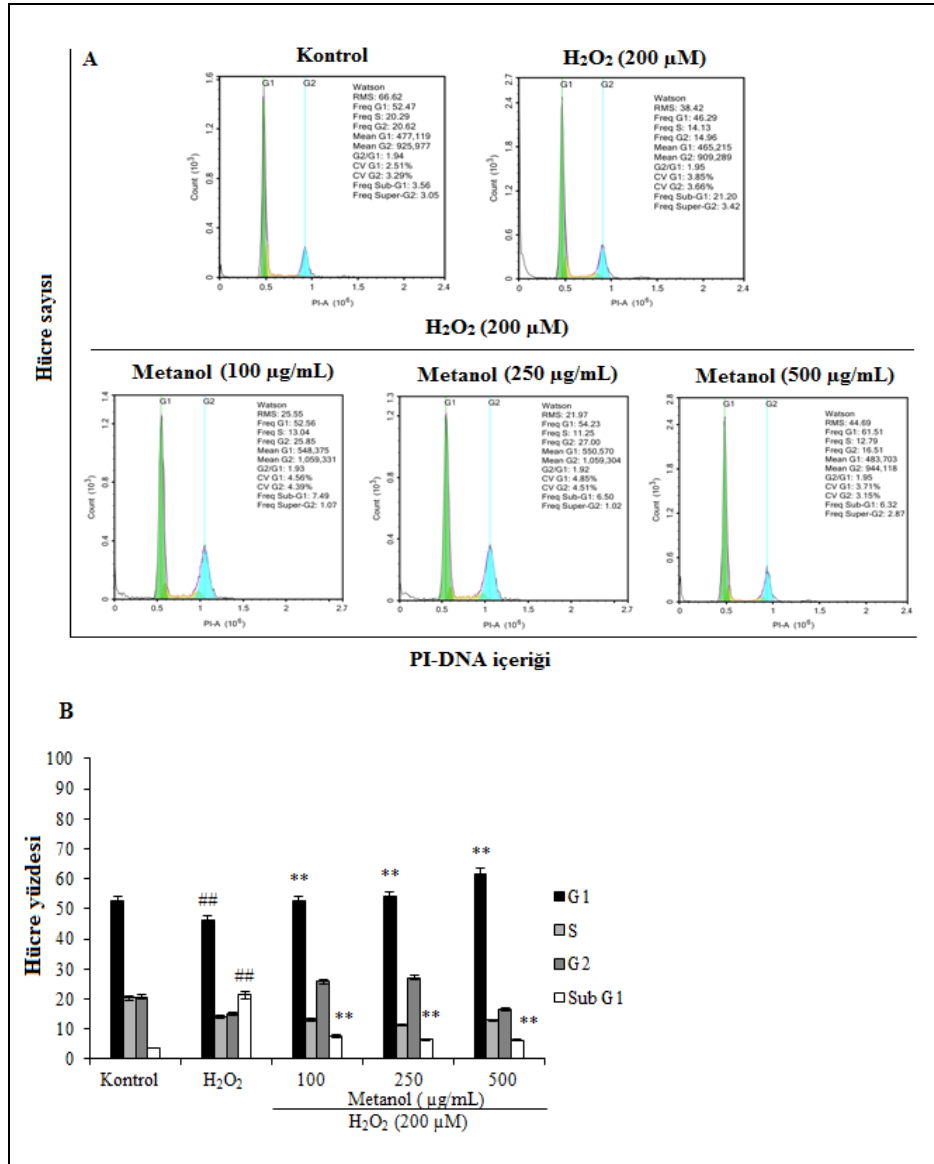
4.7. Alkaloit Ekstraktlarının Hücre Döngüsü Disregülasyonu Üzerine Baskılayıcı Etkileri

Bu çalışmada, nörodejeneratif hücre modelinde üç alkaloit ekstraktının, hücrelerin bölünme fazlarındaki oransal değişiminin tespiti aracılığıyla, hücrelerin çoğalma hızlarına etkisi ortaya konulmuştur. H₂O₂ ile oluşturulan nörodejeneratif hücre modelinde %46,3 oranında G1 ve %21,2 oranında Sub G1 fazı belirlenmiştir. H₂O₂'nin G1 fazındaki hücre yüzdesini hiçbir uygulama yapılmamış fPC12 hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde

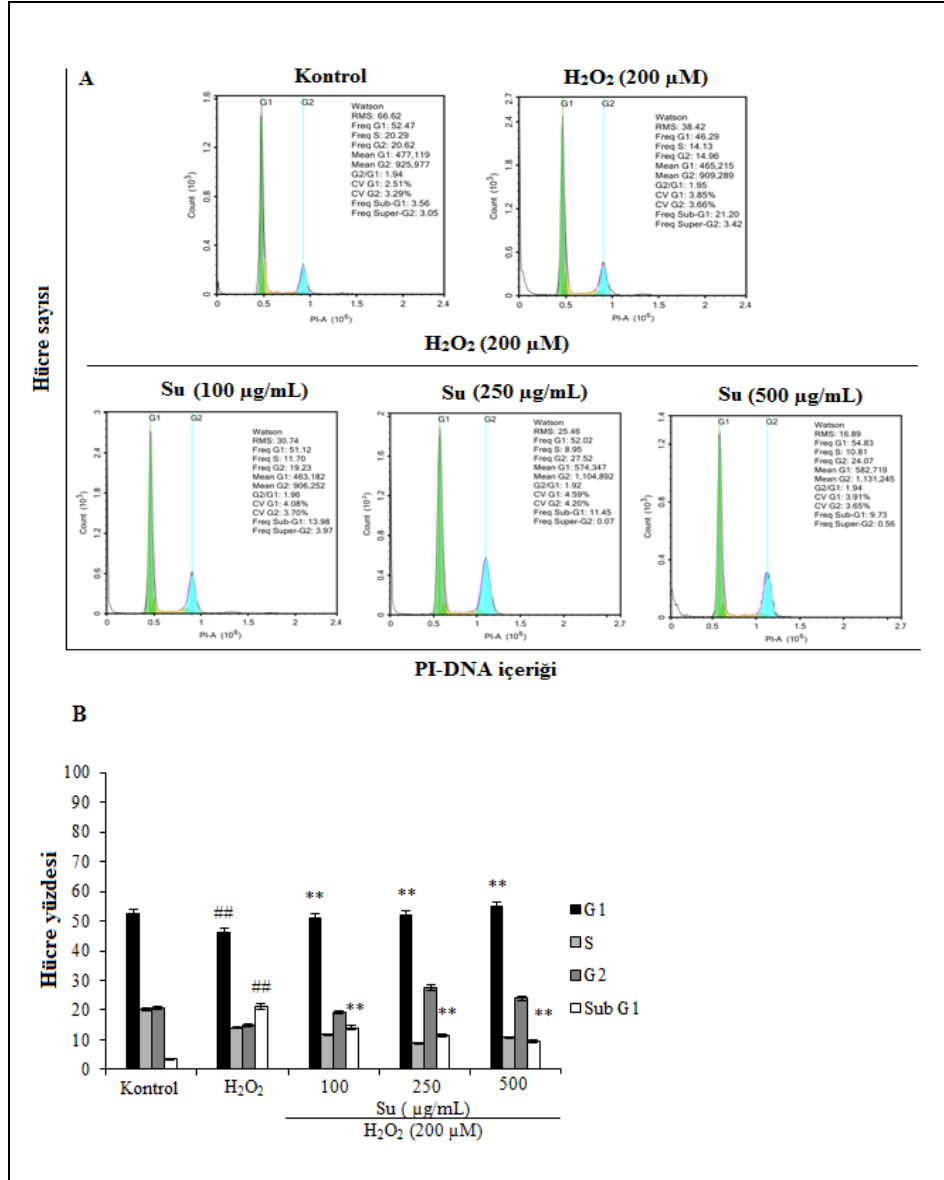
azalttığı ve Sub G1 fazındaki hücre yüzdesini ise anlamlı bir şekilde arttırdığı belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık 0,01 düzeyinde belirlenmiş olup, istatistiksel analiz deney sonuçlarını doğrulamıştır ($^{##}p<0,01$). Çalışmada, sadece H₂O₂ uygulanmış grup ile deney grupları ile mukayese edildiğinde, deney gruplarının artan konsantrasyonuna bağlı G1 fazındaki hücre oranında artış (%61,5-68,1; G1 fazındaki hücre) gözlenirken, Sub G1 fazındaki hücre oranında azalış (%3,1-6,3; Sub G1 fazındaki hücre) gözlenmiştir. Bu durum, H₂O₂ ile birlikte uygulanan kloroform alkaloit ekstraktının apoptotik hücre oluşumunu önemli ölçüde azaltarak, apoptozu baskıladığını ve nöral apoptoza karşı koruyucu etkisinin olduğunu göstermiştir. Metanol (G1 fazındaki hücre %52,6-61,5; Sub G1 fazındaki hücre %6,3-7,5) ve su (G1 fazındaki hücre %51,1-54,8; Sub G1 fazındaki hücre %9,7-14,0) alkaloit ekstraktlarının sonuçları, kloroform alkaloit ekstraktlarının sonuçları ile benzerlik göstermiş olup, buna bağlı metanol ve su alkaloit ekstraktlarının da konsantrasyona bağlı olarak nöral apoptozu baskılayıcı nöroprotektif etkisi olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.10-4.12). İstatistiksel analizlerde, sadece H₂O₂ uygulanmış grup ile deney grupları arasında, G1 ve Sub G1 fazındaki hücre yüzdesi açısından bir farkın olduğu belirlenmiştir. İstatistiksel analizler, bu farkın 0,01 düzeyinde anlamlı olduğunu kanıtlamıştır ($^{**}p<0,01$). G1 ve Sub G1 oranları bakımından üç alkaloit ekstraktı hücre döngüsü disregülasyonunun baskılaması açısından değerlendirildiğinde kloroform alkaloit ekstraktının diğer alkaloit ekstraktlarına göre daha iyi sonuç verdiği ve daha etkili olduğu söylenebilir. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, her üç alkaloit ekstraktının da hücre döngüsünün G1 fazında fPC12 hücrelerinin duraksamasına neden olduğu tespit edilmiştir. Alkaloit ekstraktlarının konsantrasyonları arttıkça G1 fazındaki hücrelerin yüzdesi artarken, S fazındaki hücrelerin yüzdesinin (100 ve 250 µg/mL) düzenli bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, kloroform alkaloit ekstraktının diğer ekstraktlara göre, hücre döngüsü disregülasyonuna dolayısıyla, nöral apoptoza karşı nöroprotektif etki bakımından daha öne çıktığı dikkati çekmiştir.



Şekil 4.10. H₂O₂ ile nöral apoptoza indüklenen fPC12 hücrelerinin hücre döngüsüne kloroform alkaloid ekstraktının etkisinin oransal değişim sonuçlarının flow sitometri analizi ile belirlenmesi. A: Flow sitometri diyagramı. B: Histogram. Ortalama değer $\pm$ SD, n:3. ## $p < 0,01$ kontrole göre H₂O₂ uygulanmış grupta G1 ve Sub G1 hücre yüzdeleri; ** $p < 0,01$ H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında G1 ve Sub G1 hücre yüzdeleri.



Şekil 4.11. H₂O₂ ile nöral apoptoza indüklenen fPC12 hücrelerinin hücre döngüsüne metanol alkaloid ekstraktının etkisinin oransal değişim sonuçlarının flow sitometri analizi ile belirlenmesi. A: Flow sitometri diyagramı. B: Histogram. Ortalama değer $\pm$ SD, n:3. # $p < 0,01$ kontrole göre H₂O₂ uygulanmış grupta G1 ve Sub G1 hücre yüzdesi; * $p < 0,01$ H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında G1 ve Sub G1 hücre yüzdesi.

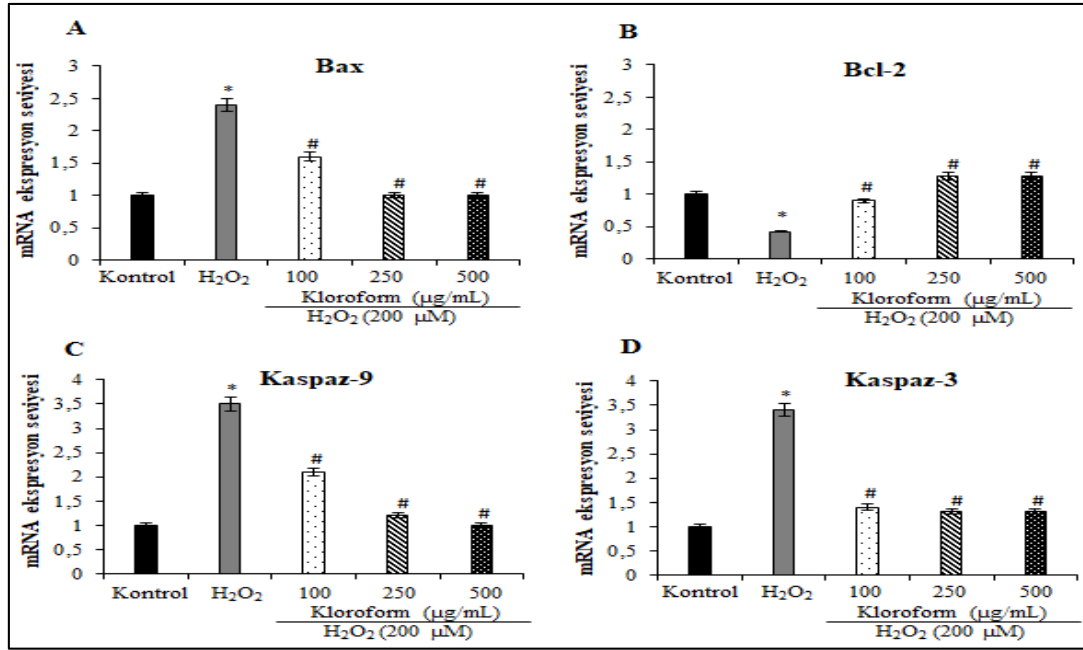


Şekil 4.12. H₂O₂ ile nöral apoptoza indüklenen fPC12 hücrelerinin hücre döngüsüne su alkaloit ekstraktının etkisinin oransal değişim sonuçlarının flow sitometri analizi ile belirlenmesi. A: Flow sitometri diyagramı. B: Histogram. Ortalama değer $\pm$ SD, n:3. ## $p < 0,01$ kontrole göre H₂O₂ uygulanmış grupta G1 ve Sub G1 hücre yüzdesi; ** $p < 0,01$ H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında G1 ve Sub G1 hücre yüzdesi.

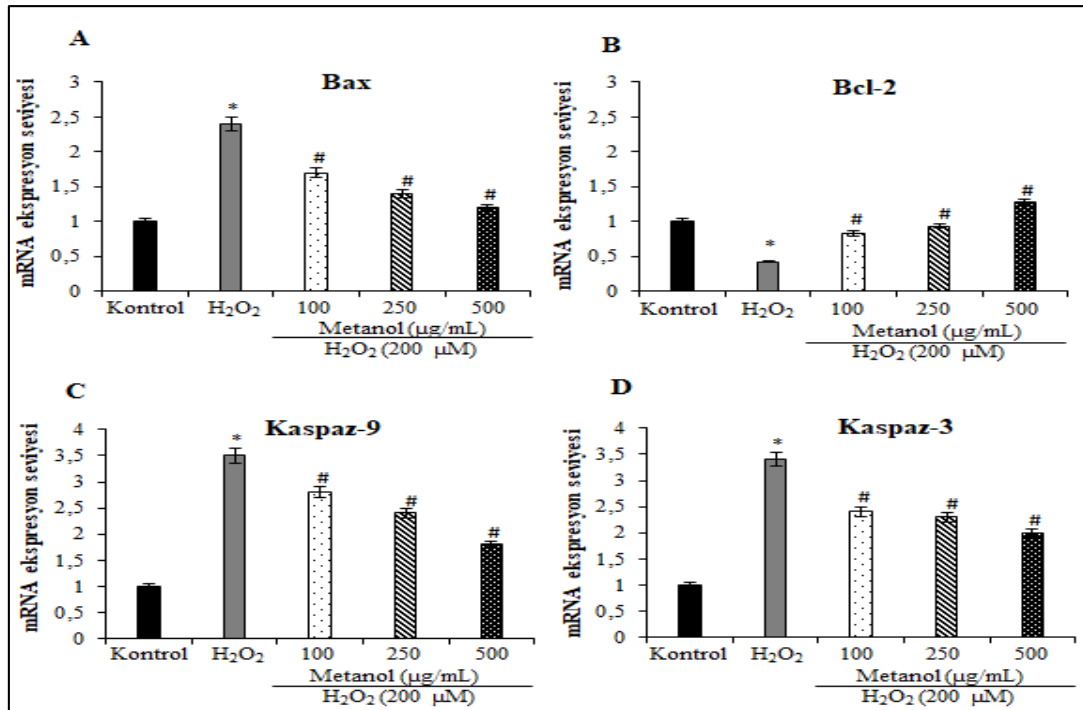
4.8. Alkaloit Ekstraktlarının Nöral Apoptoz Üzerine Gen Ekspresyonu Düzeyinde Baskılayıcı Etkileri

Bu çalışmada, H₂O₂ ile nöral apoptoza indüklenen fPC12 hücrelerinde, hücre deney modelinin kontrolü ve oluşturulan bu deney modelinde *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform, metanol ve su alkaloit ekstraktlarının, Bax, Kaspaz-9, Kaspaz-3 ve Bcl-2 mRNA ekspresyon düzeylerine etkileriyle ilişkili anti-apoptotik etkileri qRT-PCR ile ortaya

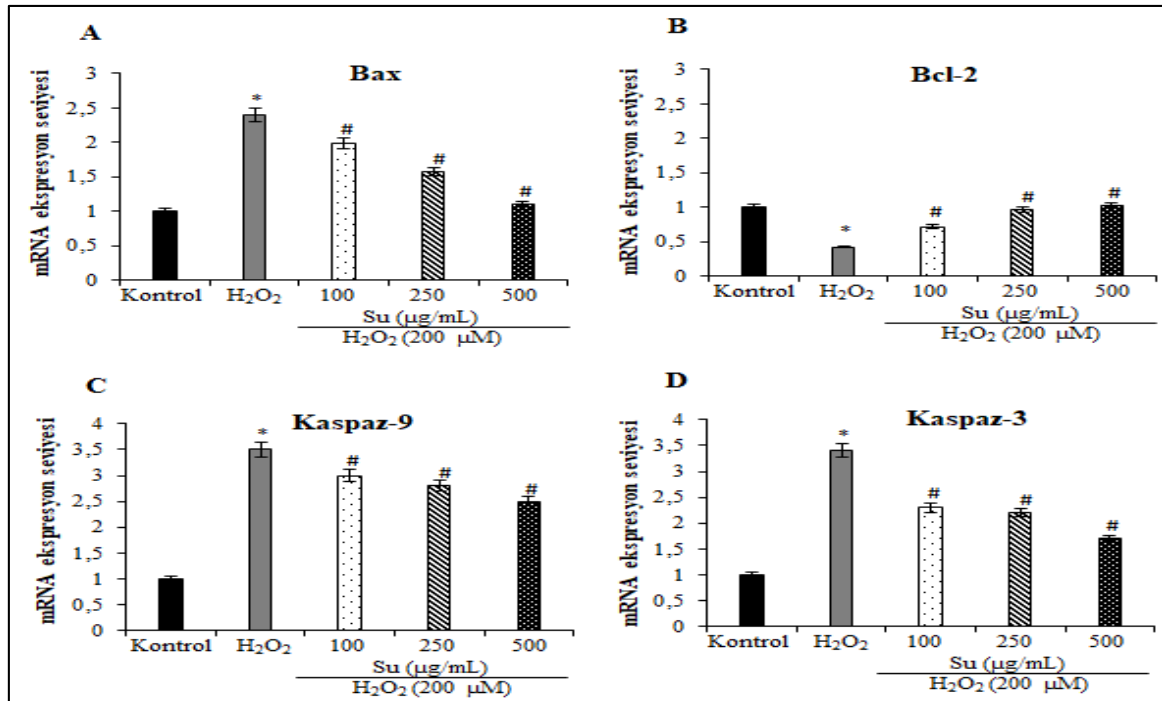
konulmuştur. Çalışmada qRT-PCR sonrası fPC12 hücrelerinde H₂O₂ uygulamasının, kontrol grubuna kıyasla Bax, Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerini sırasıyla 2,4; 3,5 ve 3,4 kat yükselttiği, Bcl-2 mRNA ekspresyon seviyesini ise 2,4 kat baskıladığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup ($*p<0,05$), istatistiksel analiz deney sonuçlarını doğrulamıştır (Şekil 4.13-4.15). Bu sonuçlara göre, pro-apoptotik ve anti-apoptotik genler düzeyinde *in vitro* hücre modelinin başarılı bir şekilde nöral apoptoza indüklendiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan, kloroform alkaloit ekstraktının H₂O₂ ile indüklenen Bax (1,5-2,4 kat baskılama), Kaspaz-9 (1,7-3,5 kat baskılama) ve Kaspaz-3 (2,4-2,6 kat baskılama) genlerinin seviyesini genel olarak doz bağımlı bir şekilde baskıladığı belirlenmiştir. Metanol (Bax: 1,4-2,0; Kaspaz-9: 1,3-1,9 ve Kaspaz-3: 1,4-1,7 kat baskılama) ve su (Bax: 1,2-2,2; Kaspaz-9: 1,2-1,4 ve Kaspaz-3: 1,5-2,0 kat baskılama) alkaloit ekstraktları ile yapılan uygulamalarda da benzer şekilde H₂O₂'nin indüklediği pro-apoptotik genlerin seviyesindeki artışın doza bağlı olarak baskılandığı tespit edilmiştir. Özellikle her üç alkaloit ekstraktının 500 µg/mL konsantrasyon uygulamaları, kontrol grubu düzeyine kadar ekspresyonu baskılayarak oluşan nöral apoptoza karşı neredeyse %100'e yakın bir koruma göstermiştir. Çalışmada, alkaloit ekstraktı ve H₂O₂ uygulamalarının anti-apoptotik Bcl-2 genindeki (kloroform: 2,1-3,0; metanol: 2,0-3,0 ve su: 1,7-2,4 kat artma) baskılamayı ise genel olarak artan alkaloit ekstrakt konsantrasyonuyla doğru orantılı bir şekilde geriye döndürdüğü ve anti-apoptotik gen üzerinden de nöral apoptozu koruduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup ($#p<0,05$), istatistiksel analiz deney sonuçlarını doğrulamıştır (Şekil 4.13-4.15). Alkaloit ekstraktları apoptoz yolağındaki Bax, Kaspaz-9, Kaspaz-3 ve Bcl-2 genlerinin ifadesine farklı etki göstermiştir. Özellikle kloroform alkaloit ekstraktı Bax, Kaspaz-9, Kaspaz-3 ve Bcl-2 genlerinin ekspresyon sonuçları üzerinde diğer alkaloit ekstraktlarına göre dikkate değer düzeyde öne çıkmıştır. Dolayısıyla, bu alkaloit ekstraktının içeriğindeki yüksek allokrriptopin miktarı ile ilişkili olarak apoptotik genlerin regülasyonunda diğer alkaloit ekstraktlarına göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. Ek olarak, gen ekspresyon sonuçları flow sitometrik apoptoz ve hücre döngüsü analizinin sonuçlarını doğrulamaktadır.



Şekil 4.13. H₂O₂ ile nöral apoptoza indüklenen fPC12 hücrelerinde kloroform alkaloid ekstraktının Bax (A), Bcl-2 (B), Kaspaz-9 (C) ve Kaspaz-3 (D) geninin ifade düzeylerine etkisi. Ortalama değer $\pm$ SD, n:3. # $p < 0,05$ kontrole göre H₂O₂ uygulanmış grupta mRNA ekspresyon seviyesi; * $p < 0,05$ H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında mRNA ekspresyon seviyesi.



Şekil 4.14. H₂O₂ ile nöral apoptoza indüklenen fPC12 hücrelerinde metanol alkaloid ekstraktının Bax (A), Bcl-2 (B), Kaspaz-9 (C) ve Kaspaz-3 (D) geninin ifade düzeylerine etkisi. Ortalama değer $\pm$ SD, n:3. # $p < 0,05$ kontrole göre H₂O₂ uygulanmış grupta mRNA ekspresyon seviyesi; * $p < 0,05$ H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında mRNA ekspresyon seviyesi.



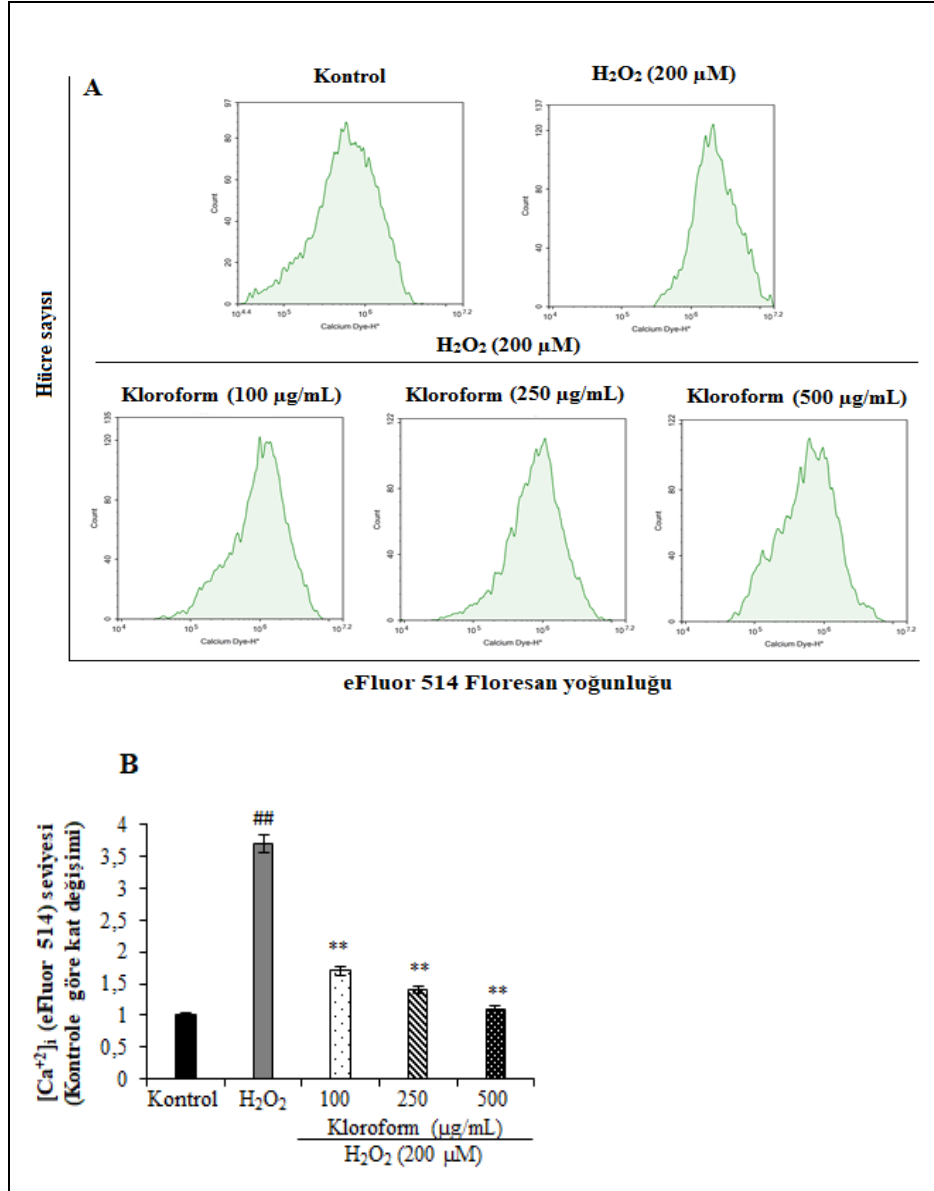
Şekil 4.15. H₂O₂ ile nöral apoptoza indüklenen fPC12 hücrelerinde su alkaloit ekstraktının Bax (A), Bcl-2 (B), Kaspaz-9 (C) ve Kaspaz-3 (D) geninin ifade düzeylerine etkisi. Ortalama değer $\pm$ SD, n:3. # $p < 0,05$ kontrole göre H₂O₂ uygulanmış grupta mRNA ekspresyon seviyesi; * $p < 0,05$ H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında mRNA ekspresyon seviyesi.

Bu tez çalışmasında kloroform, metanol ve su olmak üzere üç farklı çözücü ile alkaloit ekstraktları hazırlanmıştır. Bu alkaloit ekstraktları ile yapılan içerik analizi çalışmalarında, her üç alkaloit ekstraktında da bileşenler benzerlik göstermiştir. Kloroform alkaloit ekstraktında allokriptopin alkaloiti diğer iki alkaloit ekstraktına göre daha yüksek bulunmuş ve genel olarak yapılan moleküler çalışmalarda kloroform alkaloit ekstraktı daha iyi sonuç göstermiştir. Bu nedenle, hücre içi Ca^{+2} homeostazı, MAPK sinyal yolları ve Akt/GSK-3 β /Tau nöral ölüm sinyal yolları ile ilgili moleküler çalışmalarda sadece kloroform alkaloit ekstraktı kullanılmıştır.

4.9. Kloroform Alkaloit Ekstraktının Hücre İçi Kalsiyum Seviyesi Üzerine Baskılayıcı Etkisi

Bu çalışmada, *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform alkaloit ekstraktının fPC12 hücrelerinde H₂O₂ ile artan hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu ($[Ca^{+2}]_i$)'yi baskılayıcı, dolayısıyla Ca^{+2} homeostazını regüle edici etkisi flow sitometri ile ortaya konulmuştur. Çalışmada H₂O₂ ile muamele edilen fPC12 hücrelerindeki Ca^{+2} floresan yoğunluğu, hiçbir uygulama yapılmamış kontrol grubu hücrelerine kıyasla 3,7 kat artış göstermiştir.

İstatistiksel analizler, bu artışın 0,01 düzeyinde anlamlı olduğunu kanıtlamıştır ($^{##}p<0,01$) (Şekil 4.16). Dolayısıyla, H₂O₂ uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla oksidatif strese bağlı hücre içi Ca⁺² homestazının bozulduğu görülmüştür. Diğer taraftan, belirlenen konsantrasyonlarda kloroform alkaloit ekstraktı ve H₂O₂'nin uygulandığı fPC12 hücrelerinde, sadece H₂O₂ uygulanmış fPC12 hücrelerine göre Ca⁺² floresan yoğunlukları 2,2-3,4 kat baskılanmıştır. Bu sonuçlar, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup ($^{**}p<0,01$), istatistiksel analiz deney sonuçlarını doğrulamıştır (Şekil 4.16). Dolayısıyla, sonuçlarımız oksidatif stres ile artan Ca⁺²]_i'nin kloroform alkaloit ekstraktı ön muamelesi ile doz bağımlı olarak baskılandığını göstermiştir.

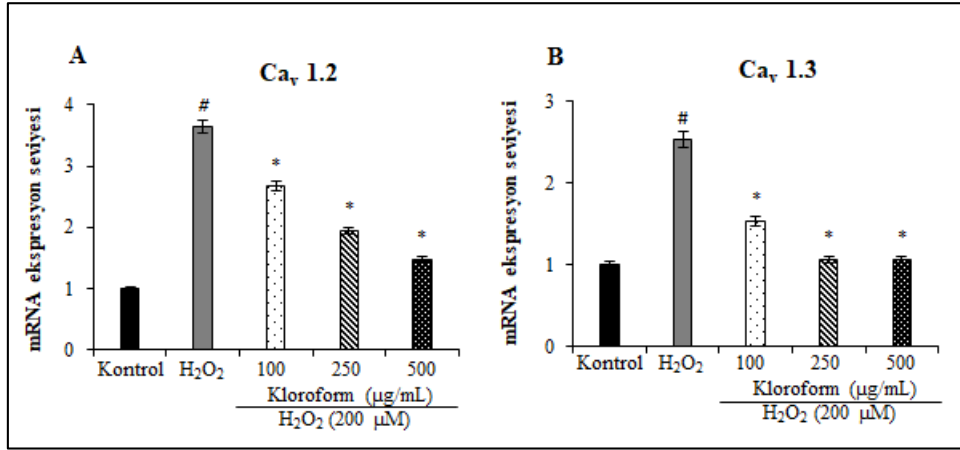


Şekil 4.16. H₂O₂ ile indüklenen hücre içi Ca²⁺ seviyesi üzerine kloroform alkalot ekstraktının baskılayıcı etkisinin flow sitometri analizi ile belirlenmesi A: Flow sitometri histogram grafiği. B: Sütun grafiği (Kontrol grubuna göre kat değişimi olarak ifade edilen eFluor 514 floresan yoğunluklarına dayalı [Ca²⁺]_i'nin kantitatif analizi). Ortalama değer ± SD, n:3. ^{##}p<0,01 kontrole göre H₂O₂ uygulanmış [Ca²⁺]_i; ^{**}p<0,01 H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında [Ca²⁺]_i.

4.10. Kloroform Alkalot Ekstraktının L-tipi Voltaj-Kapılı Kalsiyum Kanalı Alt Tipleri Üzerine Gen Ekspresyonu Düzeyinde Baskılayıcı Etkisi

Bu çalışmada, *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform alkalot ekstraktının fPC12 hücrelerinde H₂O₂ ile aktive edilen L-tipi VGCC alt tiplerinden olan Cav1.2 ve Cav1.3 mRNA ekspresyonunu baskılayıcı etkisi ve buna bağlı olarak L-tipi Ca²⁺ kanal blokeri olma potansiyeli qRT-PCR ile gösterilmiştir. Çalışmada qRT-PCR sonrası fPC12 hücrelerinde

H₂O₂ uygulamasının, kontrol grubuna kıyasla Ca_v1.2 ve Ca_v1.3 mRNA ekspresyon seviyelerini sırasıyla 3,6 ve 2,5 kat yükselttiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup ([#]*p*<0,05), istatistiksel analiz deney sonuçlarını doğrulamıştır. Her iki gen birbirine yakın sonuç vermiş olup, Ca_v1.2 geni Ca_v1.3 genine göre biraz daha öne çıkmıştır. Diğer taraftan, kloroform alkaloit ekstraktının H₂O₂'nin indüklediği Ca_v1.2 ve Ca_v1.3 genlerinin mRNA ekspresyon seviyesindeki artışı, sırasıyla 1,4-2,5 ve 1,7-2,4 kat baskıladığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup (^{*}*p*<0,05), istatistiksel analiz deney sonuçlarını doğrulamıştır (Şekil 4.17). Dolayısıyla, sonuçlarımız kloroform alkaloit ekstraktının fPC12 hücrelerinde H₂O₂ ajanının oluşturduğu L-tipi Ca²⁺ kanal genlerinin mRNA ekspresyon seviyesindeki artışı baskıladığını, böylece fPC12 hücrelerini nöral apoptoza karşı korumada etkin olduğunu göstermiştir.

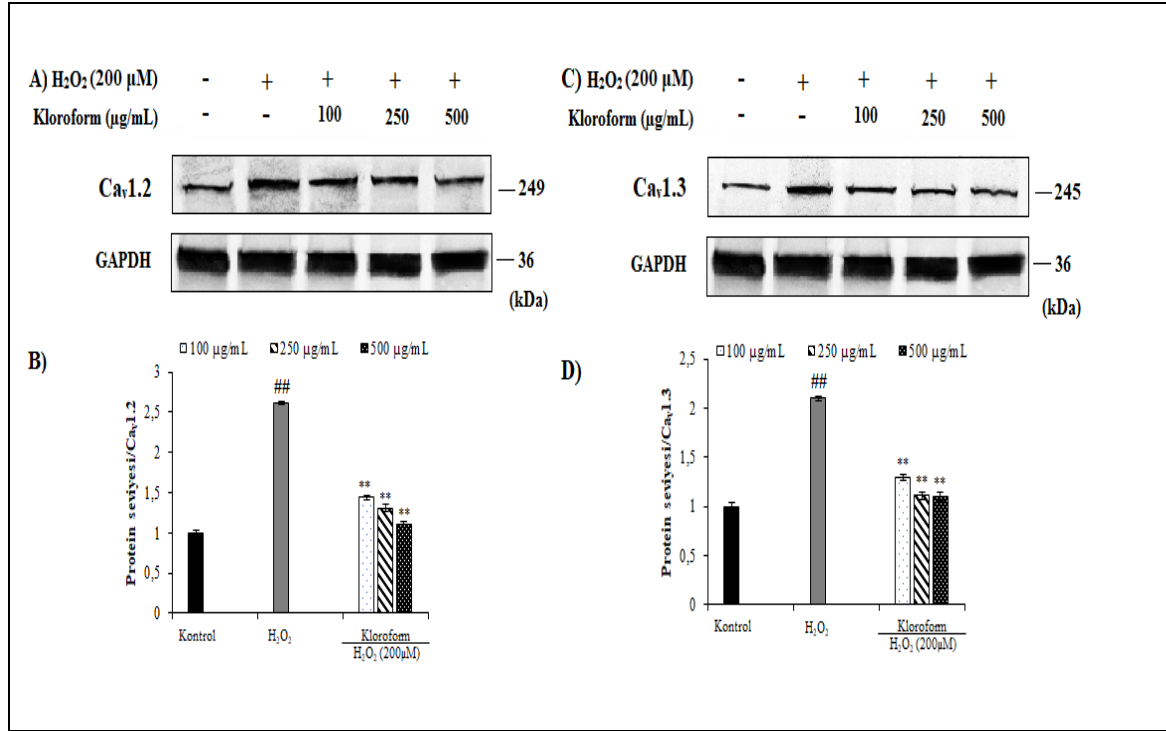


Şekil 4.17. H₂O₂ ile L-tipi VGCC alt tiplerinin aktive edildiği fPC12 hücrelerinde kloroform alkaloit ekstraktının Ca_v1.2 (A) ve Ca_v1.3 (B) geninin ifade düzeylerine etkisi. Ortalama değer ± SD, n:3. [#]*p*<0,05 kontrole göre H₂O₂ uygulanmış grupta mRNA ekspresyon seviyesi; ^{*}*p*<0,05 H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında mRNA ekspresyon seviyesi.

4.11. Kloroform Alkaloit Ekstraktının L-tipi Voltaj-Kapılı Kalsiyum Kanalı Alt Tipleri Üzerine Protein Ekspresyonu Düzeyinde Baskılayıcı Etkisi

Bu çalışmada, fPC12 hücrelerinde H₂O₂ ile aktive edilen L-tipi VGCC alt tiplerinden olan Ca_v1.2 ve Ca_v1.3 proteinlerinin ekspresyonu üzerinde, *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform alkaloit ekstraktının baskılayıcı etkisi ve bununla ilişkili olarak L-tipi Ca²⁺ kanal blokleri olma potansiyeli Western blot ile ortaya konulmuştur. Çalışmada H₂O₂ ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde Ca_v1.2 protein seviyesi kontrolün 2,61 katı, Ca_v1.3 protein seviyesi ise 2,10 katı olarak belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde, H₂O₂'nin

indüklediği $\text{Ca}_v1.2$ ve $\text{Ca}_v1.3$ proteinlerinin seviyesindeki artışın, kontrole göre anlamlı olduğu kanıtlanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık 0,01 düzeyinde belirlenmiştir ($^{##}p<0,01$). Diğer taraftan, belirlenen konsantrasyonlarda kloroform alkaloit ekstraktı ile H_2O_2 'nin uygulandığı gruplarda, sadece H_2O_2 uygulanmış gruba göre $\text{Ca}_v1.2$ protein seviyesinde 1,8-2,4 kat azalış belirlenirken, $\text{Ca}_v1.3$ protein seviyesinde 1,6-1,9 kat azalış belirlenmiştir. Bu sonuçlar, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup ($^{**}p<0,01$), istatistiksel analiz deney sonuçlarını doğrulamıştır (Şekil 4.18). Dolayısıyla sonuçlarımız, gen ekspresyon çalışmalarından elde edilen sonuçlarla uyumlu bir şekilde (bkz. 4.10), kloroform alkaloit ekstraktının fPC12 hücrelerinde H_2O_2 ajanının oluşturduğu L-tipi Ca^{+2} kanal proteinlerinin seviyesindeki artışı baskıladığını, böylece fPC12 hücrelerini nöral apoptoza karşı korumada etkin olduğunu göstermiştir.



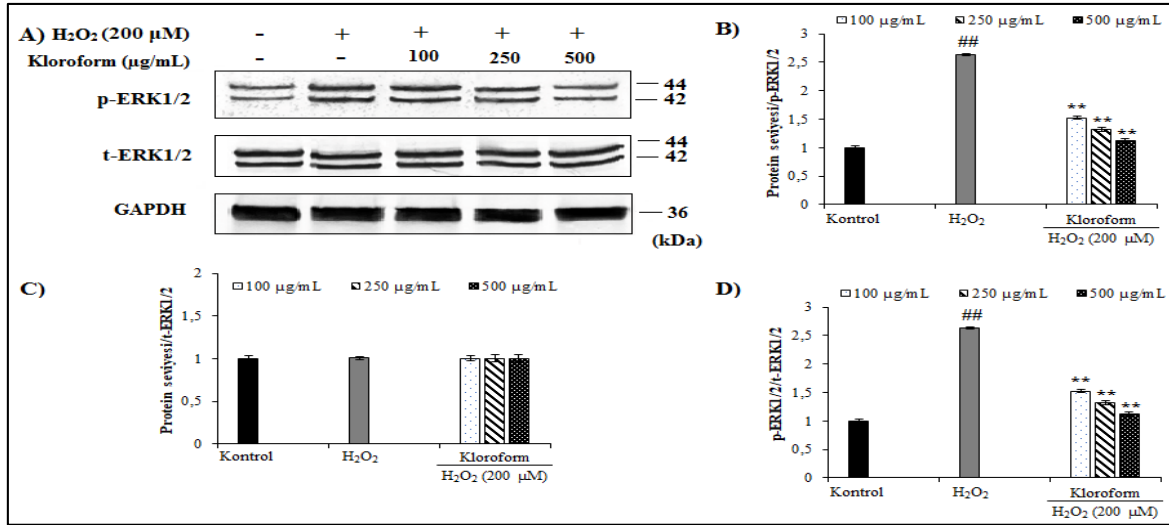
Şekil 4.18. H_2O_2 ile L-tipi VGCC alt tiplerinin aktive edildiği fPC12 hücrelerinde kloroform alkaloit ekstraktının $\text{Ca}_v1.2$ (A ve B) ve $\text{Ca}_v1.3$ (C ve D) proteininin ifade düzeylerine etkisi. Ortalama değer $\pm$ SD, n:2. $^{##}p<0,01$ kontrole göre H_2O_2 uygulanmış grupta $\text{Ca}_v1.2$ ve $\text{Ca}_v1.3$ protein seviyesi; $^{**}p<0,01$ H_2O_2 uygulanmış gruba göre deney gruplarında $\text{Ca}_v1.2$ ve $\text{Ca}_v1.3$ protein seviyesi.

4.12. Kloroform Alkaloit Ekstraktının Mitojenle Aktifleştirilen Protein Kinaz Sinyal Yolakları Aktivasyonu Üzerine Protein Ekspresyonu Düzeyinde Baskılayıcı Etkisi

Bu çalışmada, H₂O₂ ile nöral hasara indüklenen fPC12 hücrelerinde, MAPK sinyal yolaklarının alt gruplarından fosforile edilmiş (p)-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204), p-JNK (Thr 183/Tyr 185) ve p-p38 (Thr 180/Tyr 182) protein seviyeleri üzerinde *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform alkaloit ekstraktının inhibe edici dolayısıyla, nöral ölüm yolakları üzerindeki baskılayıcı etkisi Western blot ile ortaya konulmuştur.

4.12.1. Kloroform alkaloit ekstraktının p-ERK1/2 ve t-ERK1/2 protein seviyeleri üzerine etkisi

Bu çalışmada, H₂O₂ ile nöral hasara indüklenen fPC12 hücrelerinde, kloroform alkaloit ekstraktının artmış p-ERK1/2/t-ERK1/2 protein oranını azaltıcı ve buna bağlı olarak MAPK sinyal yolağını inhibe edici etkisi Western blot ile belirlenmiştir. Çalışmada H₂O₂ ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-ERK1/2 protein seviyesi kontrolün 2,64 katı olarak tespit edilmiştir. Bu durum, oksidatif hasarın p-ERK protein seviyesini arttırdığını ve nörodejeneratif hücre modelinin başarı ile oluştuğunu göstermiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde, H₂O₂'nin indüklediği p-ERK1/2 proteinlerinin seviyesindeki artışın, kontrole göre anlamlı olduğu kanıtlanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık 0,01 düzeyinde belirlenmiştir (^{##}*p*<0,01). Diğer taraftan, belirlenen konsantrasyonlarda kloroform alkaloit ekstraktı ile H₂O₂'nin uygulandığı gruplarda, sadece H₂O₂ uygulanmış gruba göre p-ERK1/2 protein seviyesinde 1,7-2,4 kat azalış belirlenmiştir (Şekil 4.19). Sonuçlar, H₂O₂'nin indüklediği p-ERK1/2 proteinindeki artışın, ekstrakt konsantrasyonu ve dolayısıyla ekstrakttaki alkaloit konsantrasyonunun artışına bağlı olarak azaldığını göstermiştir. Sadece, H₂O₂ uygulanmış grup ile deney grupları arasında fosforile proteinin seviyesi açısından bir fark belirlenmiştir. İstatistiksel analizler, bu farkın 0,01 düzeyinde anlamlı olduğunu kanıtlamıştır (^{**}*p*<0,01). Ayrıca, H₂O₂'nin ve tüm deney gruplarının t-ERK1/2 protein seviyesinde kontrole göre anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir (*p*>0,05). Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, kloroform alkaloit ekstraktının fPC12 hücrelerinde H₂O₂ ajanının oluşturduğu p-ERK1/2 proteininin fosforilasyon seviyesindeki artışı tersine çevirerek, azalttığı böylece fPC12 hücrelerini nöral apoptoza karşı korumada etkin olduğu görülmüştür.

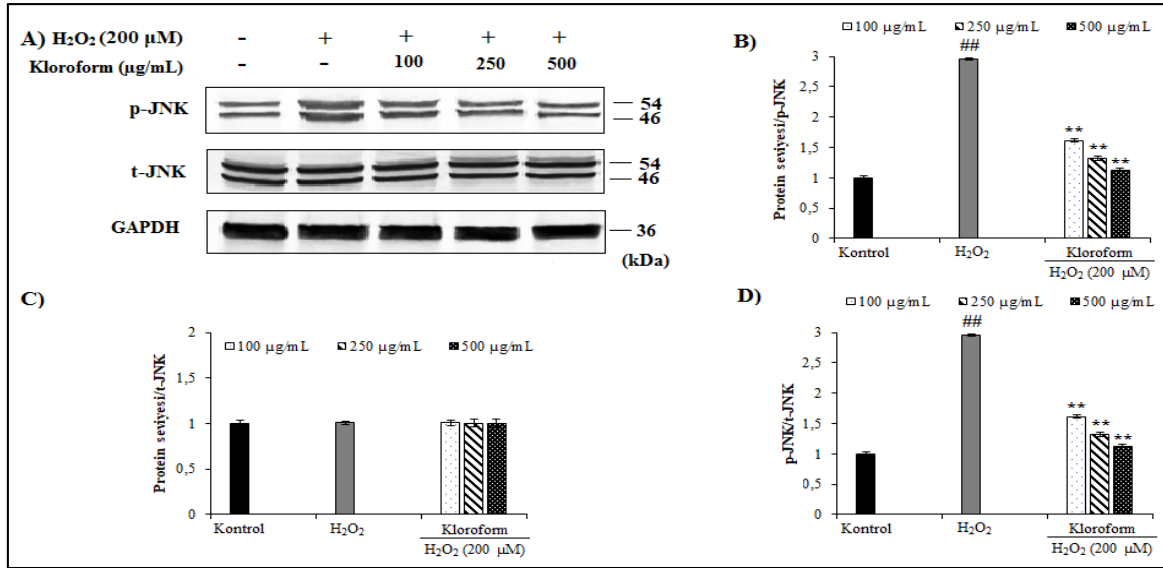


Şekil 4.19. H₂O₂ ile indüklenen p-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204) protein seviyesi üzerine kloroform alkaloit ekstraktının baskılayıcı etkisinin Western blot analizi ile belirlenmesi. A: p-ERK1/2, t-ERK1/2 ve GAPDH Western blot görüntüsü. B: Kontrole göre p-ERK1/2 protein seviyesindeki değişiklikleri gösteren densitometre değerlerinin grafiği. C: Kontrole göre t-ERK1/2 protein seviyesindeki değişiklikleri gösteren densitometre değerlerinin grafiği. D: Kontrole göre p-ERK1/2/t-ERK1/2 oranındaki değişiklikleri gösteren densitometre değerlerinin grafiği. Ortalama değer $\pm$ SD, n:2. ^{##} $p < 0,01$ kontrole göre H₂O₂ uygulanmış grupta p-ERK1/2 protein seviyesi. ^{**} $p < 0,01$ H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında p-ERK1/2 protein seviyesi.

4.12.2. Kloroform alkaloit ekstraktının p-JNK ve t-JNK protein seviyeleri üzerine etkisi

Bu çalışmada, H₂O₂ ile nöral hasara indüklenen fPC12 hücrelerinde, kloroform alkaloit ekstraktının artmış p-JNK/t-JNK protein oranını azaltıcı ve buna bağlı olarak MAPK sinyal yolağını inhibe edici etkisi Western blot ile belirlenmiştir. Çalışmada H₂O₂ ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-JNK protein seviyesi kontrolün 2,96 katı olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde, H₂O₂'nin indüklediği p-JNK proteinlerinin seviyesindeki artışın, kontrole göre anlamlı olduğu kanıtlanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık 0,01 düzeyinde belirlenmiştir (^{##} $p < 0,01$). Diğer taraftan, belirlenen konsantrasyonlarda kloroform alkaloit ekstraktı ile H₂O₂'nin uygulandığı gruplarda, sadece H₂O₂ uygulanmış gruba göre p-JNK protein seviyesinde 1,8-2,7 kat azalış belirlenmiştir (Şekil 4.20). Sonuçlar, H₂O₂'nin indüklediği p-JNK proteinindeki artışın, ekstrakt konsantrasyonu ve dolayısıyla ekstrakttaki alkaloit konsantrasyonunun artışına bağlı olarak azaldığını göstermiştir. Sadece H₂O₂ uygulanmış grup ile deney grupları arasında fosforile proteinin seviyesi açısından bir fark belirlenmiştir. İstatistiksel analizler, bu farkın 0,01

düzeyinde anlamlı olduğunu kanıtlamıştır ($p < 0,01$). Ayrıca H_2O_2 'nin ve tüm deney gruplarının t-JNK protein seviyesinde kontrole göre anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$). Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, kloroform alkaloid ekstraktının fPC12 hücrelerinde H_2O_2 'nin oksidatif hasara bağlı oluşturduğu p-JNK proteininin fosforilasyon seviyesindeki artışı tersine çevirerek, kontrol grubuna kadar azalttığı böylece fPC12 hücrelerini nöral apoptoza karşı korumada etkin olduğu görülmüştür.

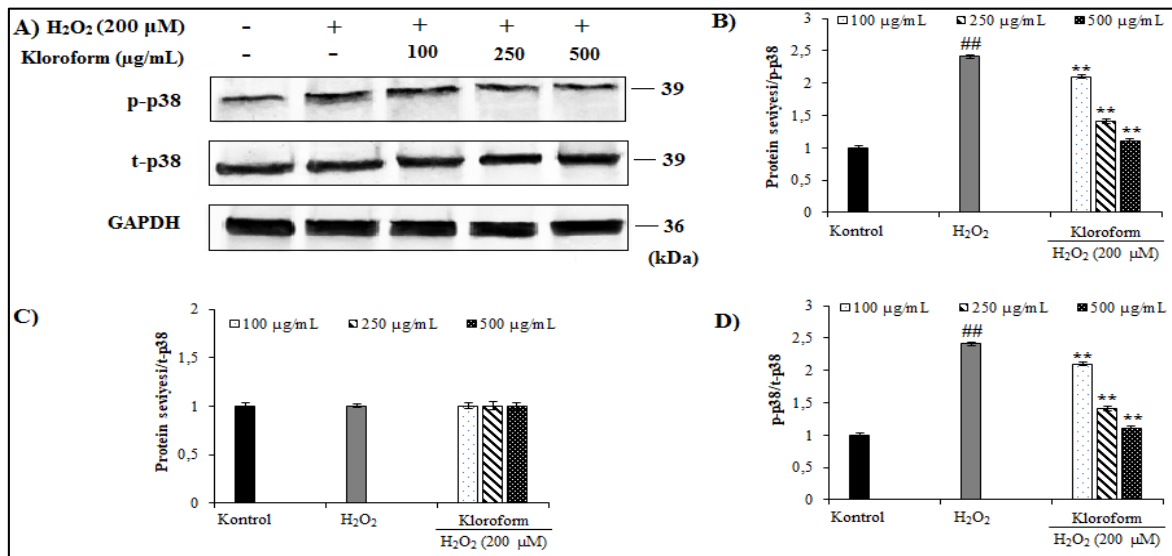


Şekil 4.20. H_2O_2 ile indüklenen p-JNK (Thr 183/Tyr 185) protein seviyesi üzerine kloroform alkaloid ekstraktının baskılayıcı etkisinin Western blot analizi ile belirlenmesi. A: p-JNK, t-JNK ve GAPDH Western blot görüntüsü. B: Kontrole göre p-JNK protein seviyesindeki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. C: Kontrole göre t-JNK protein seviyesindeki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. D: Kontrole göre p-JNK/t-JNK oranındaki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. Ortalama değer $\pm$ SD, n:2. ^{##} $p < 0,01$ kontrole göre H_2O_2 uygulanmış grupta p-JNK protein seviyesi. ^{**} $p < 0,01$ H_2O_2 uygulanmış gruba göre deney gruplarında p-JNK protein seviyesi.

4.12.3. Kloroform alkaloid ekstraktının p-p38 ve t-p38 protein seviyeleri üzerine etkisi

Bu çalışmada, H_2O_2 ile nöral hasara indüklenen fPC12 hücrelerinde, kloroform alkaloid ekstraktının artmış p-p38/t-p38 protein oranını azaltıcı ve buna bağlı olarak MAPK sinyal yolağını inhibe edici etkisi Western blot ile belirlenmiştir. Çalışmada H_2O_2 ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-p38 protein ekspresyon seviyesi kontrolün 2,41 katı artış tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde, H_2O_2 'nin indüklediği p-p38 proteinlerinin seviyesindeki artışın, kontrole göre anlamlı olduğu kanıtlanmıştır. İstatistiksel olarak

anlamlılık 0,01 düzeyinde belirlenmiştir ($^{##}p<0,01$). Diğer taraftan, belirlenen konsantrasyonlarda kloroform alkaloit ekstraktı ile H_2O_2 'nin uygulandığı gruplarda, sadece H_2O_2 uygulanmış gruba göre p-p38 protein seviyesinde 1,2-2,2 kat azalış belirlenmiştir (Şekil 4.21). Sonuçlar, H_2O_2 'nin indüklediği p-p38 proteinindeki artışın, alkaloit ekstraktının konsantrasyonunun artışına bağlı olarak azaldığını göstermiştir. Sadece H_2O_2 uygulanmış grup ile deney grupları arasında fosforile proteinin seviyesi açısından bir fark belirlenmiştir. İstatistiksel analizler, bu farkın 0,01 düzeyinde anlamlı olduğunu kanıtlamıştır ($^{**}p<0,01$). Ayrıca H_2O_2 'nin ve tüm deney gruplarının t-p38 protein seviyesinde kontrole göre anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, kloroform alkaloit ekstraktının fPC12 hücrelerinde H_2O_2 ajanının oluşturduğu p-p38 proteininin fosforilasyon seviyesindeki artışı tersine çevirerek, azalttığı böylece fPC12 hücrelerini nöral apoptoza karşı korumada etkin olduğu görülmüştür.



Şekil 4.21. H_2O_2 ile indüklenen p-p38 (Thr 180/Tyr 182) protein seviyesi üzerine kloroform alkaloit ekstraktının baskılayıcı etkisinin Western blot analizi ile belirlenmesi. A: p-p38, t-p38 ve GAPDH Western blot görüntüsü. B: Kontrole göre p-p38 protein seviyesindeki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. C: Kontrole göre t-p38 protein seviyesindeki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. D: Kontrole göre p-p38/t-p38 oranındaki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. Ortalama değer $\pm$ SD, n:2. $^{##}p<0,01$ kontrole göre H_2O_2 uygulanmış grupta p-p38 protein seviyesi. $^{**}p<0,01$ H_2O_2 uygulanmış gruba göre deney gruplarında p-p38 protein seviyesi.

MAPK sinyal yollarında yer alan proteinler ile yapılan tüm Western blot sonuçları değerlendirildiğinde, *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform alkaloit ekstraktının nöral

hücrelerde apoptozun indüksiyonunda etkin olan ve oksidatif hasara bağlı artan p-ERK1/2, p-JNK ve p-p38 protein seviyelerinin azalışını sağlayarak, MAPK sinyal yollarının aktivasyonunu inhibe ettiği ve buna bağlı nöral ölüm yollarında baskılayıcı etki gösterdiği belirlenmiştir. Dolayısıyla, bu sonuçlar Akt/GSK-3 β /Tau nöral ölüm sinyal yolağı çalışması için önemli veriler sağlamıştır.

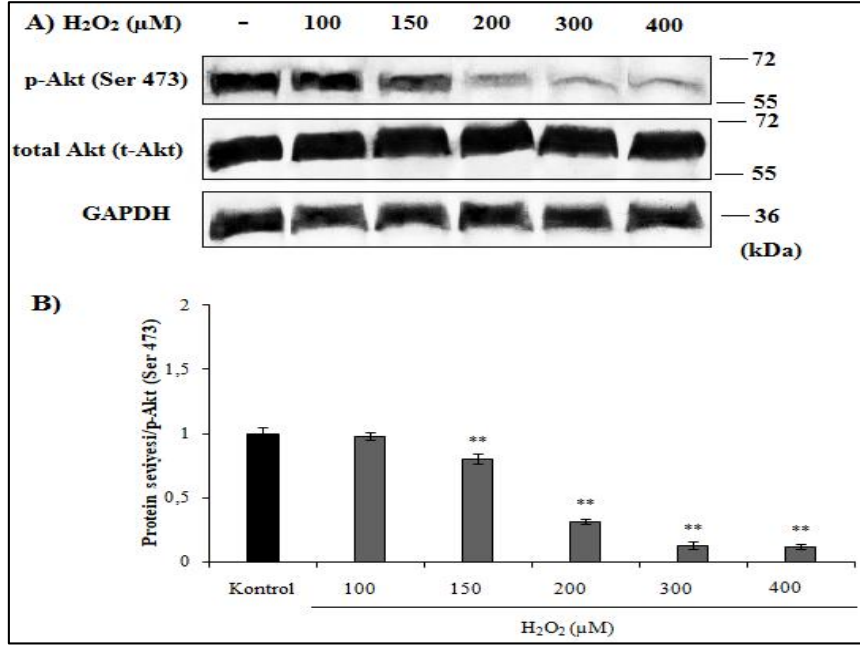
4.13. Kloroform Alkaloit Ekstraktının Akt/GSK-3 β /Tau Nöral Ölüm Sinyal Yolağı Disregülasyonu Üzerine Protein Ekspresyonu Düzeyinde Baskılayıcı Etkisi

Çalışmada, H₂O₂ ile nöral hasara indüklenen fPC12 hücrelerinde, *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform alkaloit ekstraktının p-Akt (Ser 473) ve p-GSK-3 β (Ser 9) proteinlerinin artışı sağlayarak, Akt/GSK-3 β sinyal yolağını regüle edici ve buna bağlı Tau proteinlerinin (Ser 396 ve Thr 212) hiperfosforilasyonunu inhibe edici dolayısıyla nöral ölüm yolları üzerindeki baskılayıcı etkisi Western blot ile ortaya konulmuştur.

4.13.1. H₂O₂ ve kloroform alkaloit ekstraktının p-Akt ve t-Akt protein seviyeleri üzerine etkileri

Bu çalışmada, fPC12 hücreleri üzerinde sitotoksik etkinin en az olduğu, yüksek oranda apoptotik süreçlerin indüklendiği ve aynı zamanda p-Akt (Ser 473) protein seviyesinin etkin bir şekilde azaltıldığı H₂O₂ konsantrasyonu Western blot ile belirlenmiştir. Çalışmada 100-400 μ M H₂O₂ ile p-Akt protein seviyesinin, uygulama yapılmamış fPC12 hücrelerinin (kontrol) protein seviyesinden, 0,11-0,98'e düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. 24 saat uygulanan H₂O₂'in artan konsantrasyonlarında, fPC12 hücrelerinin p-Akt protein seviyesinin azalışı sağlanmıştır. Bu sonuçlar, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup (** $p < 0,01$), istatistiksel analiz deney sonuçlarını doğrulamıştır. t-Akt protein seviyesinde ise, H₂O₂'nin tüm konsantrasyonlarının kontrole göre anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.22). Daha önce MTT analizinde hücre canlılığını %50'nin üzerinde bulduğumuz 200 μ M H₂O₂ konsantrasyon ve 24 saat uygulama süresi kabul edilebilir düzeyde değerlendirilmiştir (bkz. 4.3). 300 ve 400 μ M H₂O₂ konsantrasyonlarının ağır sitotoksik etki göstererek, apoptozdan çok nekroz oluşturma ihtimali üzerinde durulmuştur. MTT analizi sonuçlarına göre bu konsantrasyonlarda hücre canlılığının %50'nin altına düşmesi de bu öngörümüzü desteklemiştir. Bu sebepten bu iki yüksek konsantrasyon değerlendirme dışı bırakılmıştır. Ayrıca, "H₂O₂ ve kloroform alkaloit ekstraktının p-GSK-3 β ve t-GSK-3 β protein seviyeleri üzerine etkileri" (bkz. 4.13.3) ve

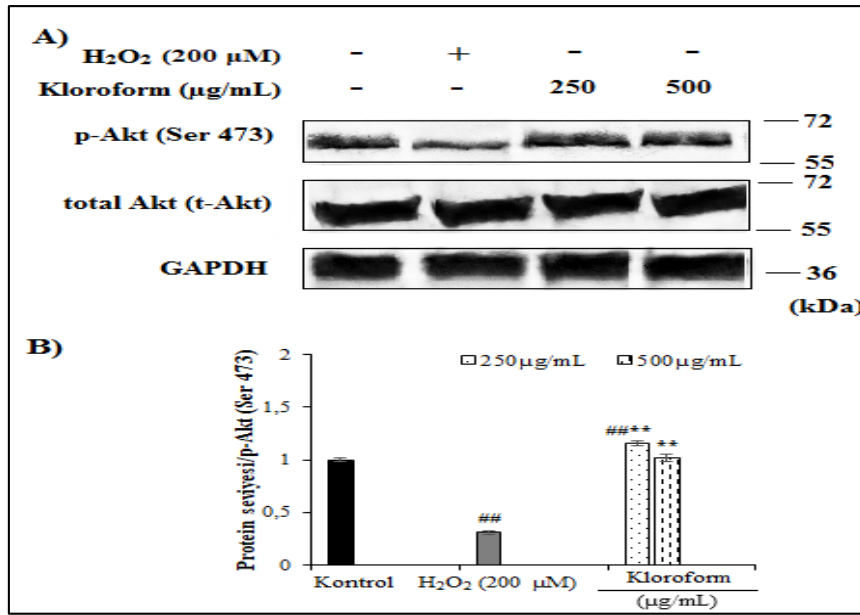
“H₂O₂ ve kloroform alkaloit ekstraktının p-Tau ve t-Tau protein seviyeleri üzerine etkileri” çalışmalarından elde edilen sonuçlar da bu durumu desteklemektedir (bkz. 4.13.5).



Şekil 4.22. Farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-Akt (Ser 473) protein seviyesinin Western blot analizi ile belirlenmesi. A: p-Akt, t-Akt ve GAPDH Western blot görüntüsü. B: Kontrole göre p-Akt protein seviyesindeki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. Ortalama değer $\pm$ SD, n:2. ** $p < 0,01$ kontrole göre H₂O₂ uygulanmış gruplarda p-Akt protein seviyesi.

Normal koşullarda kloroform alkaloit ekstraktının p-Akt protein seviyesini düşürmemesi beklenmektedir. Bu nedenle, kloroform alkaloit ekstraktının model içinde güvenilirliğini ortaya koymak için, bu denemede sadece yüksek konsantrasyonları temsil eden 250 ve 500 μ g/mL denenmiştir. Çalışmada H₂O₂ ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-Akt protein seviyesi kontrolden 0,31'e düşüş göstermiştir. Bu sonuç, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup ($^{##}p < 0,01$), istatistiksel analiz deney sonucunu doğrulamıştır (Şekil 4.23). Diğer taraftan, 250 μ g/mL kloroform alkaloit ekstraktının uygulandığı fPC12 hücrelerinde p-Akt protein seviyesinde istatistiksel olarak kontrole göre anlamlı bir artış olduğu ($^{##}p < 0,01$), 500 μ g/mL kloroform alkaloit ekstraktının uygulandığı grupta ise anlamlı bir değişikliğin olmadığı tespit edilmiş olup ($p > 0,05$), istatistiksel analiz deney sonuçlarını doğrulamıştır. Ek olarak, kloroform alkaloit ekstraktının tüm konsantrasyonlarında t-Akt protein seviyesinde kontrole göre anlamlı bir değişikliğin olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.23). Kloroform alkaloit ekstraktının en yüksek (250 ve 500 μ g/mL)

konsantrasyonlarda kontrole göre p-Akt protein seviyesinde düşüş göstermemesi, deney modeli içinde test edilen bu alkaloit ekstraktı ve konsantrasyonlarının güvenli olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Bulgular genel olarak değerlendirildiğinde, kloroform alkaloit ekstraktının belirlenen konsantrasyonlarının Akt proteininin defosforilasyonunu ve inaktivasyonunu indüklediği buna bağlı nöral hücre ölümüne neden olmadığı belirlenmiştir.

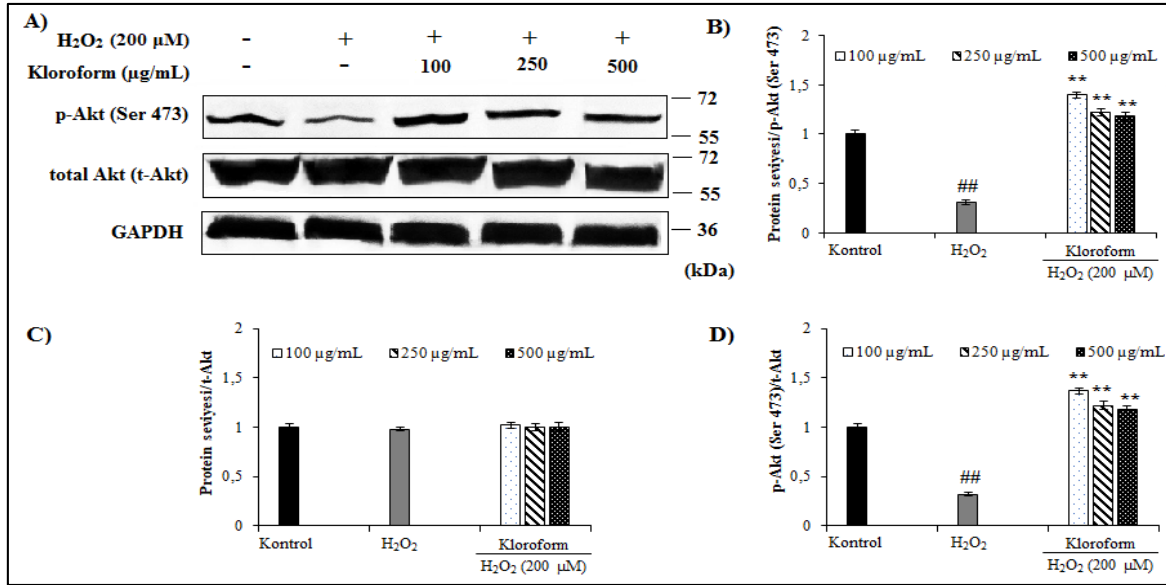


Şekil 4.23. 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda kloroform alkaloit ekstraktı ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-Akt (Ser 473) protein seviyesinin Western blot analizi ile belirlenmesi. A: p-Akt, t-Akt ve GAPDH Western blot görüntüsü. B: Kontrole göre p-Akt protein seviyesindeki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. Ortalama değer $\pm$ SD, n:2. ### $p < 0,01$ kontrole göre H₂O₂ uygulanmış grupta ve deney gruplarında p-Akt protein seviyesi. ** $p < 0,01$ H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında p-Akt protein seviyesi.

4.13.2. Nörodejeneratif hücre modelinde kloroform alkaloit ekstraktının p-Akt ve t-Akt protein seviyeleri üzerine etkisi

Bu çalışmada, H₂O₂ ile nöral hasara indüklenen fPC12 hücrelerinde, azalmış p-Akt/t-Akt protein oranını kloroform alkaloit ekstraktının arttırıcı ve buna bağlı olarak nöral ölüm yolları üzerindeki baskılayıcı etkisi Western blot ile belirlenmiştir. Çalışmada, H₂O₂ ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-Akt protein seviyesinin kontrolden 0,31'e düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde, H₂O₂'nin indüklediği p-Akt proteininin seviyesindeki azalışın, kontrole göre anlamlı olduğu kanıtlanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık 0,01 düzeyinde belirlenmiştir (### $p < 0,01$). Diğer taraftan belirlenen

konsantrasyonlarda kloroform alkaloit ekstraktı ile H₂O₂ uygulanan gruplarda, sadece H₂O₂ uygulanmış gruba göre 3,8-4,5 kat artış belirlenmiştir (Şekil 4.24). H₂O₂'nin neden olduğu p-Akt proteinindeki azalışın, tersine dönerek uygulanan kloroform alkaloit ekstraktı ile arttığı belirlenmiştir. Sadece H₂O₂ uygulanmış grup ile deney grupları arasında p-Akt proteini seviyesi açısından bir fark belirlenmiştir. İstatistiksel analizler, bu farkın 0,01 düzeyinde anlamlı olduğunu kanıtlamıştır (** $p<0,01$). Ek olarak, H₂O₂'nin ve tüm deney gruplarının t-Akt protein seviyesinde kontrole göre anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.24). Akt proteini ve kloroform alkaloit ekstraktı ile yapılan tüm Western blot analiz sonuçları değerlendirildiğinde, oluşturulan modelde her üç konsantrasyon da etkili olurken (en etkili konsantrasyon 100 ve 250 µg/mL), tek başına alkaloit ekstraktı uygulamalarında en etkili 250 µg/mL konsantrasyon grubudur (bkz. 4.13.1). Buna göre, kloroform alkaloit ekstraktının 100 ve 250 µg/mL konsantrasyonlarının, H₂O₂ ajanının oluşturduğu Akt proteinin fosforilasyon seviyesindeki azalmayı tersine çevirerek p-Akt/t-Akt oranını arttırdığı, böylece fPC12 hücrelerinde nöral apoptoza karşı nöroprotektif etki gösterdiği belirlenmiştir.

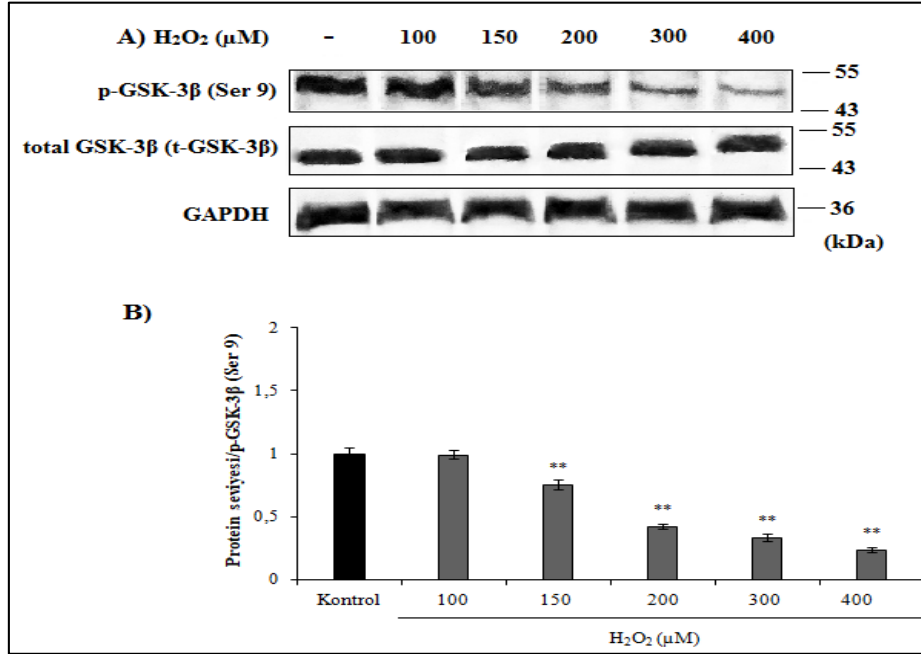


Şekil 4.24. H₂O₂ ile indüklenen p-Akt (Ser 473) protein seviyesi üzerine kloroform alkaloid ekstraktının aktive edici etkisinin Western blot analizi ile belirlenmesi. A: p-Akt, t-Akt ve GAPDH Western blot görüntüsü. B: Kontrole göre p-Akt protein seviyesindeki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. C: Kontrole göre t-Akt protein seviyesindeki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. D: Kontrole göre p-Akt/t-Akt oranındaki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. Ortalama değer $\pm$ SD, n:2. ## $p<0,01$ kontrole göre H₂O₂ uygulanmış grupta p-Akt protein seviyesi. ** $p<0,01$ H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında p-Akt protein seviyesi.

4.13.3. H₂O₂ ve kloroform alkaloid ekstraktının p-GSK-3 β ve t-GSK-3 β protein seviyeleri üzerine etkileri

Bu çalışmada, fPC12 hücreleri üzerinde sitotoksik etkinin en az olduğu, yüksek oranda apoptotik süreçlerin indüklendiği ve aynı zamanda p-GSK-3 β protein seviyesinin etkin bir şekilde azaltıldığı H₂O₂ konsantrasyonu Western blot ile belirlenmiştir. Çalışmada 100-400 μ M H₂O₂ ile p-GSK-3 β protein seviyesinin, uygulama yapılmamış fPC12 hücrelerinin (kontrol) protein seviyesinden, 0,23-0,99'a düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. 24 saat uygulanan H₂O₂'in artan konsantrasyonlarında, fPC12 hücrelerinin p-GSK-3 β protein seviyesinin azalışı sağlanmıştır. Bu sonuçlar, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup (** $p<0,01$), istatistiksel analiz deney sonuçlarını doğrulamıştır. H₂O₂'nin tüm konsantrasyonlarında t-GSK-3 β protein seviyesinde ise kontrole göre anlamlı bir değişikliğin olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.25). Bu çalışmada, hücre modelinin oluşturulmasında, 200 μ M H₂O₂ konsantrasyonunun kullanılması kararlaştırılmıştır. Fosforile protein seviyesinin oldukça düşük tespit edildiği 300 ve 400 μ M'lık deney grupları ise, H₂O₂'nin ağır sitotoksik etki göstererek, yüksek konsantrasyonlarda apoptozdan çok

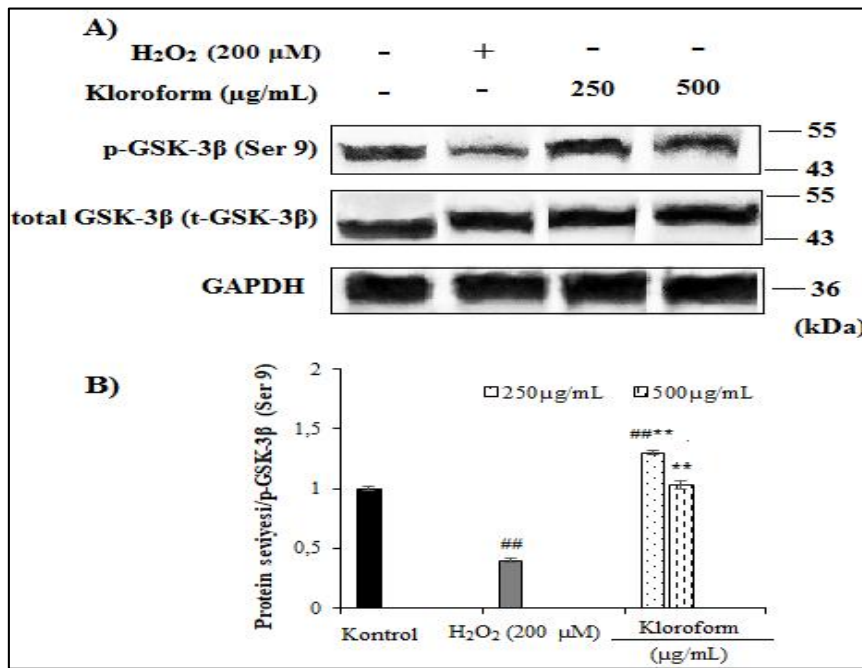
nekroz oluşturma ihtimaline bağlı tercih edilmemiştir. Ayrıca, “H₂O₂ ve kloroform alkaloit ekstraktının p-Akt ve t-Akt protein seviyeleri üzerine etkileri” (bkz. 4.13.1) ve “H₂O₂ ve kloroform alkaloit ekstraktının p-Tau ve t-Tau protein seviyeleri üzerine etkileri” çalışmalardan elde edilen sonuçlar da bu durumu desteklemektedir (bkz. 4.13.5).



Şekil 4.25. Farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-GSK-3β (Ser 9) protein seviyesinin Western blot analizi ile belirlenmesi. A: p-GSK-3β, t-GSK-3β ve GAPDH Western blot görüntüsü. B: Kontrole göre p-GSK-3β protein seviyesindeki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. Ortalama değer $\pm$ SD, n:2. ** $p < 0,01$ kontrole göre H₂O₂ uygulanmış gruplarda p-GSK-3β protein seviyesi.

Normal koşullarda kloroform alkaloit ekstraktının p-GSK-3β protein seviyesini düşürmemesi beklenmektedir. Bu nedenle, kloroform alkaloit ekstraktının model içinde güvenilirliğini ortaya koymak için, bu denemede sadece yüksek konsantrasyonları temsil eden 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ denenmiştir. Çalışmada H₂O₂ ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-GSK-3β protein seviyesi kontrolden 0,42'e düşüş göstermiştir. Bu sonuç, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup ($^{##}p < 0,01$), istatistiksel analiz deney sonucunu doğrulamıştır (Şekil 4.26). Diğer taraftan, 500 $\mu\text{g/mL}$ kloroform alkaloit ekstraktının uygulandığı fPC12 hücrelerinde p-GSK-3β protein seviyesinde istatistiksel olarak kontrole göre anlamlı bir değişikliğin olmadığı ($p > 0,05$), 250 $\mu\text{g/mL}$ kloroform alkaloit ekstraktının uygulandığı grupta ise, p-GSK-3β protein seviyesinde kontrole göre anlamlı bir artış olduğu belirlenmiş olup ($^{##}p < 0,01$), istatistiksel analiz deney sonuçlarını doğrulamıştır. Ek olarak,

kloroform alkaloit ekstraktının tüm konsantrasyonlarında, t-GSK-3 β protein seviyesinde kontrole göre anlamlı bir değişikliğin olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.26). Kloroform alkaloit ekstraktının en yüksek (250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$) konsantrasyonlarda kontrole göre p-GSK-3 β protein seviyesinde düşüş göstermemesi, deney modeli içinde test edilen bu alkaloit ekstraktı ve konsantrasyonlarının güvenli olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Bulgular genel olarak değerlendirildiğinde, kloroform alkaloit ekstraktının belirlenen konsantrasyonlarının GSK-3 β proteininin defosforilasyonunu ve aktivasyonunu indüklediği buna bağlı nöral hücre ölümüne neden olmadığı tespit edilmiştir.

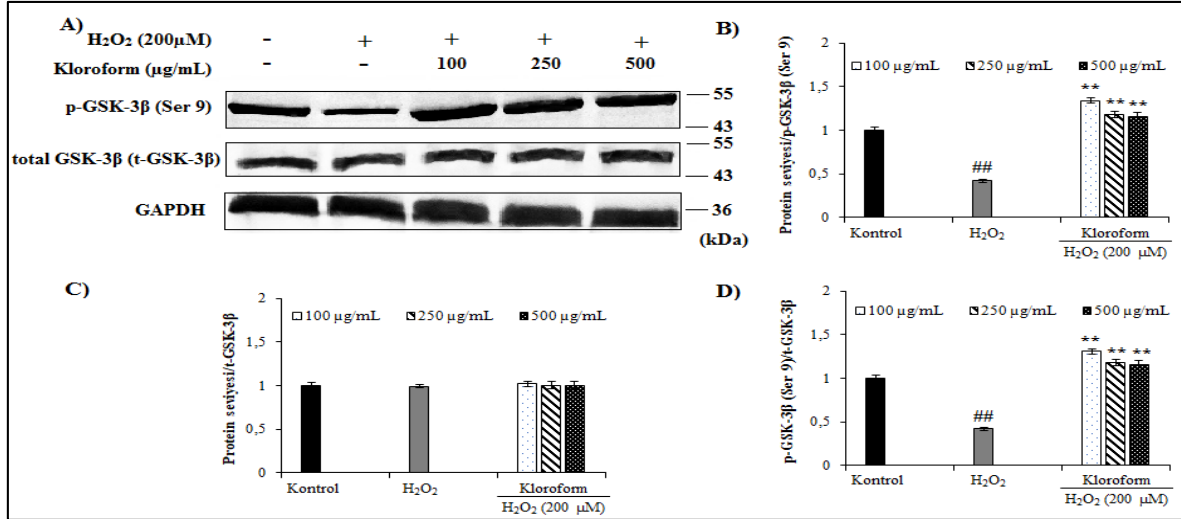


Şekil 4.26. 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda kloroform alkaloit ekstraktı ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-GSK-3 β (Ser 9) protein seviyesinin Western blot analizi ile belirlenmesi. A: p-GSK-3 β , t-GSK-3 β ve GAPDH Western blot görüntüsü. B: Kontrole göre p-GSK-3 β protein seviyesindeki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. Ortalama değer $\pm$ SD, n:2. ## $p<0,01$ kontrole göre H₂O₂ uygulanmış grupta ve deney gruplarında p-GSK-3 β protein seviyesi. ** $p<0,01$ H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında p-GSK-3 β protein seviyesi.

4.13.4. Nörodejeneratif hücre modelinde kloroform alkaloit ekstraktının p-GSK-3 β ve t-GSK-3 β protein seviyeleri üzerine etkisi

Bu çalışmada, H₂O₂ ile nöral hasara indüklenen fPC12 hücrelerinde, azalmış p-GSK-3 β /t-GSK-3 β protein oranını kloroform alkaloit ekstraktının artırıcı ve buna bağlı olarak nöral ölüm yolları üzerindeki baskılayıcı etkisi Western blot ile belirlenmiştir. Çalışmada H₂O₂

ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-GSK-3 β protein seviyesinin kontrolden 0,42'e düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde, H₂O₂'nin indüklediği p-GSK-3 β proteininin seviyesindeki azalışın, kontrole göre anlamlı olduğu kanıtlanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık 0,01 düzeyinde belirlenmiştir (^{##} $p<0,01$). Diğer taraftan, belirlenen konsantrasyonlarda kloroform alkaloit ekstraktı ile H₂O₂ uygulanan gruplarda 2,8-3,2 kat artış belirlenmiştir (Şekil 4.27). Sonuçlar, H₂O₂'nin indüklediği p-GSK-3 β proteinindeki azalışın, uygulanan kloroform alkaloit ekstraktı ile tersine dönerek arttığını göstermiştir. Sadece H₂O₂ uygulanmış grup ile deney grupları arasında p-GSK-3 β proteini seviyesi açısından bir fark belirlenmiştir. İstatistiksel analizler, bu farkın 0,01 düzeyinde anlamlı olduğunu kanıtlamıştır (^{**} $p<0,01$). Ayrıca H₂O₂'nin ve tüm deney gruplarının t-GSK-3 β protein seviyesinde kontrole göre anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.27). GSK-3 β proteini ve kloroform alkaloit ekstraktı ile yapılan Western blot analiz sonuçları değerlendirildiğinde, oluşturulan modelde bu alkaloit ekstraktının her üç konsantrasyonda da etkili olduğu (en etkili konsantrasyon 100 ve 250 $\mu\text{g/mL}$), tek başına kloroform alkaloit ekstraktı uygulamalarında ise en etkili konsantrasyonun 250 $\mu\text{g/mL}$ olduğu belirlenmiştir (bkz. 4.13.3). Böylece, kloroform alkaloit ekstraktının H₂O₂ ajanının oluşturduğu GSK-3 β proteinin fosforilasyon seviyesindeki azalmayı tersine çevirerek, p-GSK-3 β /t-GSK-3 β oranını arttırdığı dolayısıyla nöral apoptoza karşı nöroprotektif etkisinin olduğu belirlenmiştir.

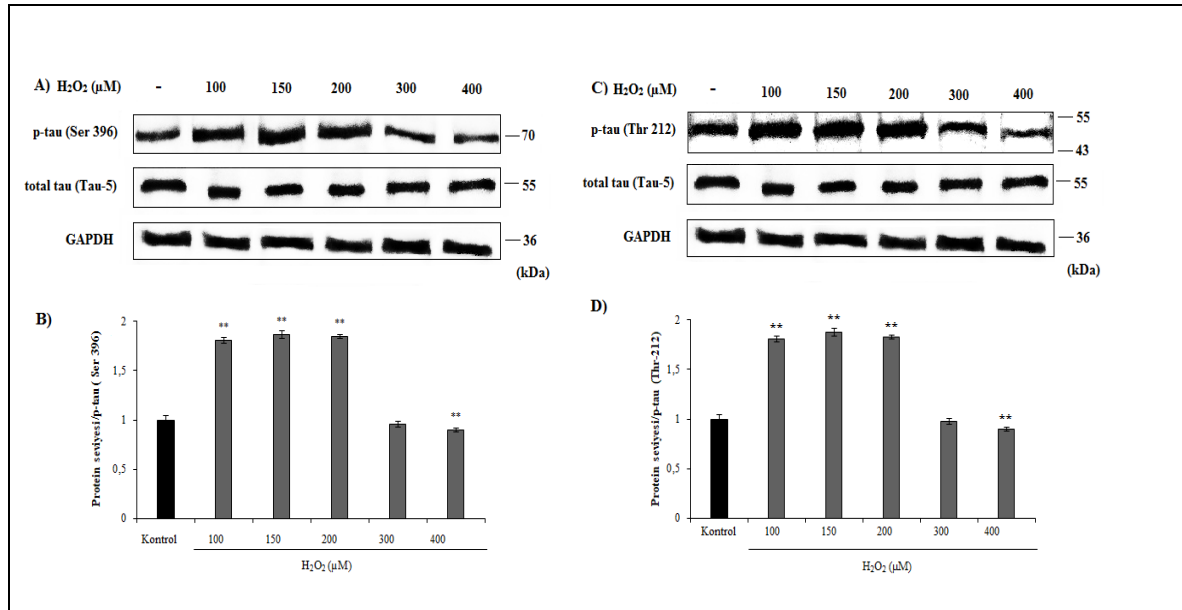


Şekil 4.27. H₂O₂ ile indüklenen p-GSK-3β (Ser 9) protein seviyesi üzerine kloroform alkaloid ekstraktının aktive edici etkisinin Western blot analizi ile belirlenmesi. A: p-GSK-3β, t-GSK-3β ve GAPDH Western blot görüntüsü. B: Kontrole göre p-GSK-3β protein seviyesindeki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. C: Kontrole göre t-GSK-3β protein seviyesindeki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. D: Kontrole göre p-GSK-3β/t-GSK-3β oranındaki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. Ortalama değer ± SD, n:2. ^{##}*p*<0,01 kontrole göre H₂O₂ uygulanmış grupta p-GSK-3β protein seviyesi. ^{**}*p*<0,01 H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında p-GSK-3β protein seviyesi.

4.13.5. H₂O₂ ve kloroform alkaloid ekstraktının p-Tau ve t-Tau protein seviyeleri üzerine etkileri

Bu çalışmada, fPC12 hücreleri üzerinde sitotoksik etkinin en az olduğu, yüksek oranda apoptotik süreçlerin indüklendiği ve aynı zamanda p-Tau proteinlerinin (Ser 396 ve Thr 212) seviyesinin etkin bir şekilde arttırıldığı H₂O₂ konsantrasyonu Western blot ile belirlenmiştir. Çalışmada, 100-200 μM H₂O₂ ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-Tau (Ser 396) protein seviyesi uygulama yapılmamış fPC12 hücrelerinin (kontrol) 1,81-1,87 katı olarak tespit edilmiştir. 100-200 μM H₂O₂ ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-Tau (Thr 212) protein seviyesi ise kontrolün 1,81-1,88 katı olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup (^{**}*p*<0,01), istatistiksel analiz deney sonuçlarını doğrulamıştır. Ayrıca H₂O₂'nin tüm konsantrasyonlarında Tau-5 protein seviyesinde kontrole göre anlamlı bir değişikliğin olmadığı tespit edilmiştir (*p*>0,05) (Şekil 4.28). Çalışmamızda, H₂O₂'nin ağır sitotoksik etki gösterebileceği yüksek konsantrasyonlarda apoptozdan çok nekroz oluşturma ihtimaline bağlı fosforile protein seviyesinin azalmasından dolayı 24 saat 300 ve 400 μM tercih edilmemiştir. H₂O₂'nin düşük konsantrasyonları da (100 ve 150 μM) fPC12 hücre modelimizde apoptozun

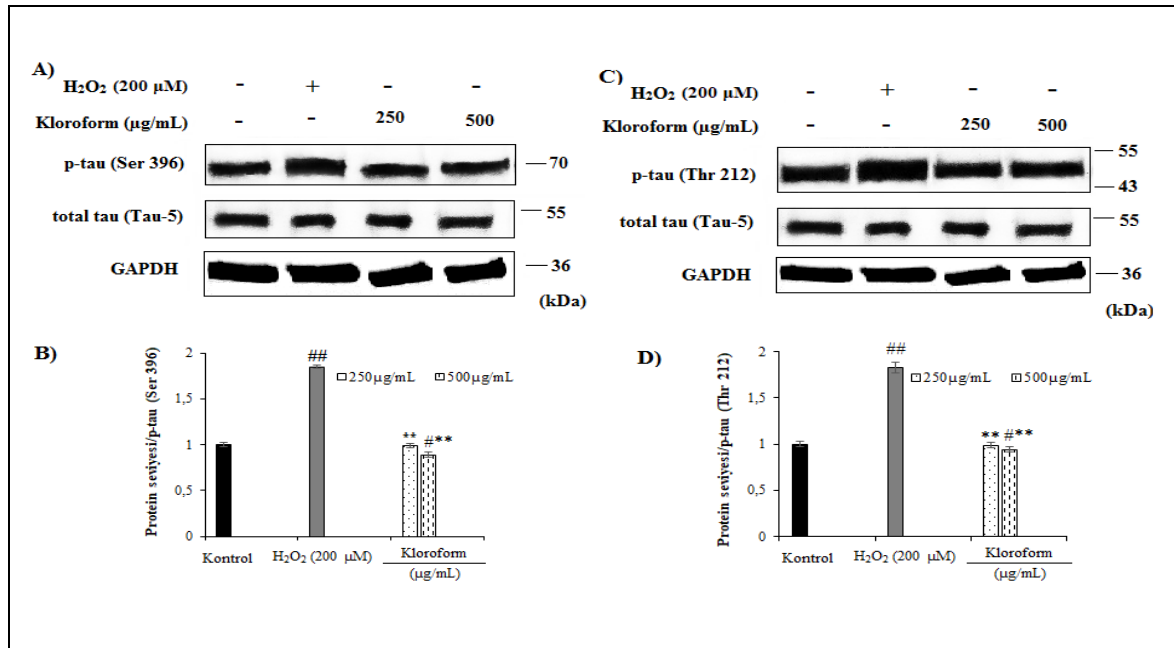
belirlenememesi veya düşük seviyelerde belirlenmesinden dolayı tercih edilmemiştir (Datar, 1001 TÜBİTAK 116S299 No'lu proje kapsamında olup, bu tez çalışmasında verilmemiştir). Bu nedenle çalışmalarda fPC12 hücrelerinde 200 μM H_2O_2 konsantrasyonunun 24 saatlik uygulaması kullanılmıştır. Ayrıca, “ H_2O_2 ve kloroform alkaloit ekstraktının p-Akt ve t-Akt protein seviyeleri üzerine etkileri” (bkz. 4.13.1) ve “ H_2O_2 ve kloroform alkaloit ekstraktının p-GSK-3 β ve t-GSK-3 β protein seviyeleri üzerine etkileri” çalışmalardan elde edilen sonuçlar da bu durumu desteklemektedir (bkz. 4.13.3).



Şekil 4.28. Farklı konsantrasyonlarda H_2O_2 ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-Tau (Ser 396 ve Thr 212) protein seviyesinin Western blot analizi ile belirlenmesi. A: p-Tau (Ser 396), t-Tau ve GAPDH Western blot görüntüsü. B: Kontrole göre p-Tau protein seviyesindeki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. C: p-Tau (Thr 212), t-Tau ve GAPDH Western blot görüntüsü. D: Kontrole göre p-Tau protein seviyesindeki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. Ortalama değer $\pm$ SD, n:2. ** $p < 0,01$ kontrole göre H_2O_2 uygulanmış gruplarda p-Tau protein seviyesi.

Normal koşullarda kloroform alkaloit ekstraktının p-Tau protein seviyesini arttırmaması beklenmektedir. Bu nedenle, p-Akt ve p-GSK-3 β proteinleri ile yaptığımız çalışmalarda olduğu gibi (bkz. 4.13.1 ve 4.13.3) kloroform alkaloit ekstraktının model içinde güvenilirliğini ortaya koymak için, bu denemede sadece yüksek konsantrasyonları temsil eden 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ denenmiştir. Çalışmada, H_2O_2 ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-Tau (Ser 396) ve p-Tau (Thr 212) protein seviyeleri sırasıyla kontrolün 1,85 ve 1,83 katı olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup ($^{##}p < 0,01$), istatistiksel analiz deney sonuçlarını doğrulamıştır (Şekil 4.29). Diğer taraftan,

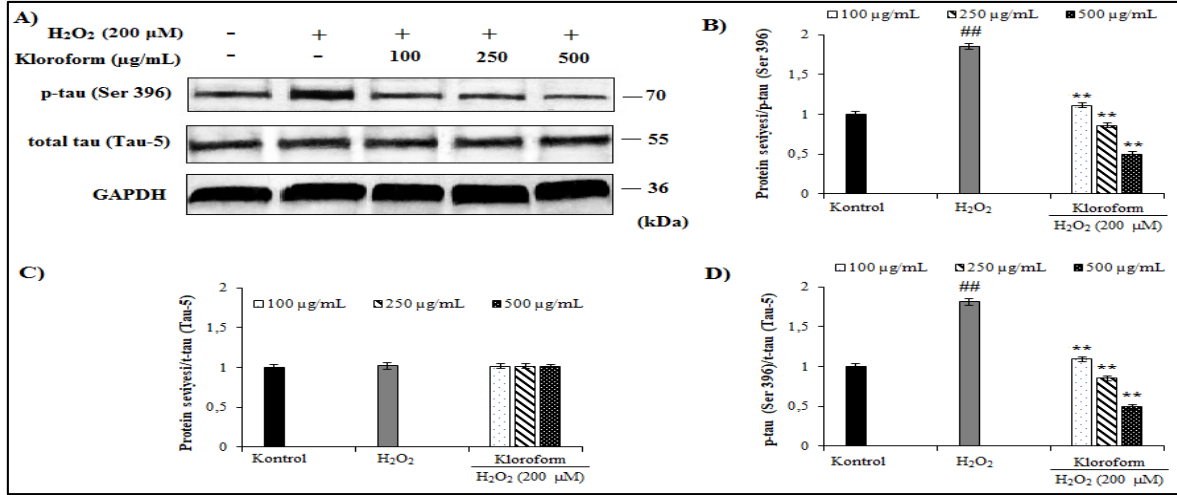
250 µg/mL kloroform alkaloit ekstraktının uygulandığı fPC12 hücrelerinde p-Tau (Ser 396) ve p-Tau (Thr 212) protein seviyelerinde istatistiksel olarak kontrole göre anlamlı bir değişikliğin olmadığı ($p>0,05$), 500 µg/mL alkaloit kloroform alkaloit ekstraktının uygulandığı grupta ise kontrole göre anlamlı bir azalmanın olduğu belirlenmiş olup ($p<0,05$), istatistiksel analiz deney sonuçlarını doğrulamıştır. Ek olarak, kloroform alkaloit ekstraktının tüm konsantrasyonlarında t-Tau protein seviyesinde kontrole göre anlamlı bir değişikliğin olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.29). Kloroform alkaloit ekstraktının 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda kontrole göre p-Tau protein seviyesinde artış göstermemesi, deney modeli içinde test edilen bu alkaloit ekstraktı ve konsantrasyonlarının güvenli olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, kloroform alkaloit ekstraktının belirlenen konsantrasyonlarının Tau proteinlerinin fosforilasyonunu indüklediği buna bağlı nöral hücre ölümüne neden olmadığı tespit edilmiştir.



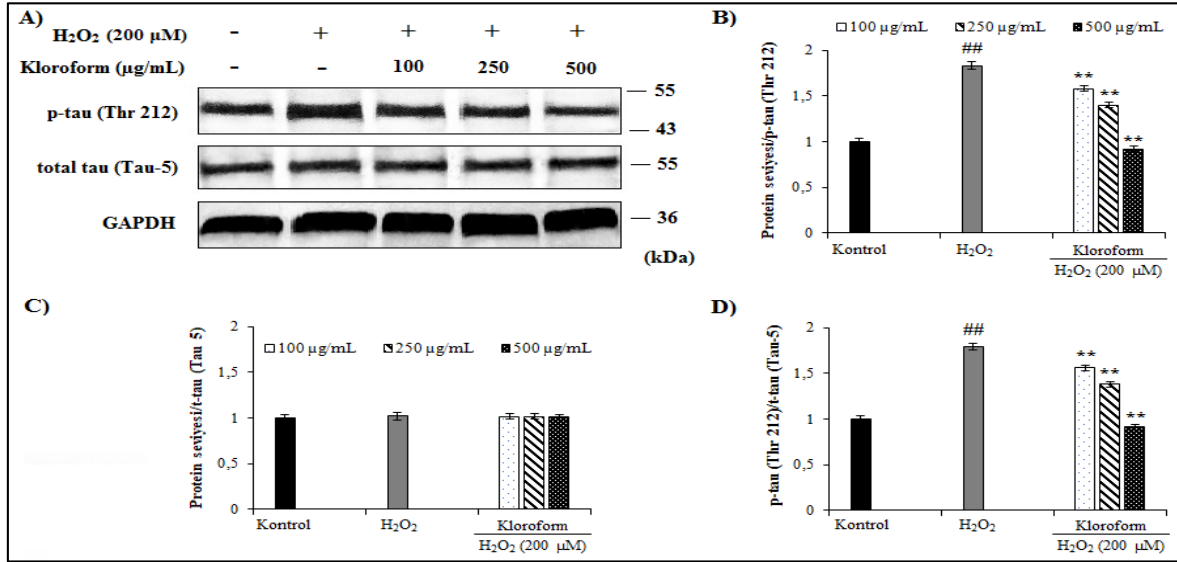
Şekil 4.29. 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda kloroform alkaloit ekstraktı ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-Tau (Ser 396 ve Thr 212) protein seviyesinin Western blot analizi ile belirlenmesi. A: p-Tau (Ser 396), t-Tau ve GAPDH Western blot görüntüsü. B: Kontrole göre p-Tau protein seviyesindeki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. C: A: p-Tau (Thr 212), t-Tau ve GAPDH Western blot görüntüsü. D: Kontrole göre p-Tau protein seviyesindeki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. Ortalama değer $\pm$ SD, n:2. # $p<0,05$, ## $p<0,01$ kontrole göre H₂O₂ uygulanmış gruplarda ve deney gruplarında p-Tau protein seviyesi. ** $p<0,01$ H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında p-Tau protein seviyesi.

4.13.6. Nörodejeneratif hücre modelinde kloroform alkaloit ekstraktının p-Tau ve t-Tau protein seviyeleri üzerine etkisi

Bu çalışmada, H₂O₂ ile nöral hasara indüklenen fPC12 hücrelerinde, artmış p-Tau (Ser 396)/Tau-5 ve p-Tau (Thr 212)/Tau-5 protein oranını kloroform alkaloit ekstraktının azaltıcı dolayısıyla nöral ölüm yolları üzerindeki baskılayıcı etkisi Western blot ile belirlenmiştir. Çalışmada H₂O₂ ile muamele edilen fPC12 hücrelerinde p-Tau (Ser 396) protein seviyesi kontrolün 1,85 katı, p-Tau (Thr 212) protein seviyesi ise 1,83 katı olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde H₂O₂'nin indüklediği p-Tau proteinlerinin seviyesindeki artışın, kontrole göre anlamlı olduğu kanıtlanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık 0,01 düzeyinde belirlenmiştir (^{##} $p < 0,01$). Diğer taraftan, belirlenen konsantrasyonlarda kloroform alkaloit ekstraktı ile H₂O₂'nin uygulandığı gruplarda, sadece H₂O₂ uygulanmış gruba göre p-Tau (Ser 396) protein seviyesinde 1,7-3,7 kat azalış belirlenirken, p-Tau (Thr 212) protein seviyesinde 1,2-2,0 kat azalış belirlenmiştir (Şekil 4.30 ve 4.31). Sonuçlar, H₂O₂'nin indüklediği p-Tau proteinlerindeki artışın, alkaloit ekstraktının konsantrasyonunun artışına bağlı olarak azaldığını göstermiştir. Sadece H₂O₂ uygulanmış grup ile deney grupları arasında fosforile proteinlerin seviyesi açısından bir fark belirlenmiştir. İstatistiksel analizler, bu farkın 0,01 düzeyinde anlamlı olduğunu kanıtlamıştır (^{**} $p < 0,01$). Ayrıca H₂O₂'nin ve tüm deney gruplarının t-Tau protein seviyesinde kontrole göre anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$). (Şekil 4.30 ve 4.31). Tau proteini ve kloroform alkaloit ekstraktı ile yapılan Western blot analiz sonuçları değerlendirildiğinde, oluşturulan modelde bu alkaloit ekstraktının her üç konsantrasyonda da etkili olduğu (en etkili konsantrasyon 250 ve 500 µg/mL), tek başına kloroform alkaloit ekstraktı uygulamalarında ise en etkili konsantrasyonun 500 µg/mL olduğu belirlenmiştir (bkz. 4.13.5). Böylece, kloroform alkaloit ekstraktının fPC12 hücrelerinde H₂O₂ ajanının oluşturduğu p-Tau proteinlerinin fosforilasyon seviyesindeki artışı tersine çevirerek, azalttığı böylece fPC12 hücrelerini nöral apoptoza karşı korumada etkin olduğu görülmüştür.



Şekil 4.30. H₂O₂ ile indüklenen p-Tau (Ser 396) protein seviyesi üzerine kloroform alkaloid ekstraktının baskılayıcı etkisinin Western blot analizi ile belirlenmesi. A: p-Tau, t-Tau ve GAPDH Western blot görüntüsü. B: Kontrole göre p-Tau protein seviyesindeki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. C: Kontrole göre t-Tau protein seviyesindeki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. D: Kontrole göre p-Tau (Ser 396)/t-Tau (Tau-5) oranındaki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. Ortalama değer $\pm$ SD, n:2. ## $p < 0,01$ kontrole göre H₂O₂ uygulanmış grupta p-Tau protein seviyesi. ** $p < 0,01$ H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında p-Tau protein seviyesi.



Şekil 4.31. H₂O₂ ile indüklenen p-Tau (Thr 212) protein seviyesi üzerine kloroform alkaloid ekstraktının baskılayıcı etkisinin Western blot analizi ile belirlenmesi. A: p-Tau, t-Tau ve GAPDH Western blot görüntüsü. B: Kontrole göre p-Tau protein seviyesindeki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. C: Kontrole göre t-Tau protein seviyesindeki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. D: Kontrole göre p-Tau (Thr 212)/t-Tau (Tau-5) oranındaki değişiklikleri gösteren dansitometre değerlerinin grafiği. Ortalama değer $\pm$ SD, n:2. ## $p < 0,01$ kontrole göre H₂O₂ uygulanmış grupta p-Tau protein seviyesi. ** $p < 0,01$ H₂O₂ uygulanmış gruba göre deney gruplarında p-Tau protein seviyesi.

Nöral ölüm yolaklarında etkili proteinler ile yapılan tüm Western blot sonuçları dikkate alındığında, *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform alkaloit ekstraktının nöral hücrelerde apoptozun inhibe edilmesinde etkin p-Akt ve p-GSK-3 β proteinlerinin artışı sağlayarak Akt/GSK-3 β sinyal yolağını düzenlendiği ve buna bağlı Tau hiperfosforilasyonu baskıladığı belirlenmiştir. Ayrıca, bu sonuçlarla ilişkili olarak kloroform alkaloit ekstraktının MAPK sinyal yolaklarının aktivasyonunu inhibe ederek de (bkz. 4.12), Tau proteinin hiperfosforilasyonunu baskıladığı tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Nörodejeneratif hastalıklar (NH'ler), MSS veya PSS'nin yapısını ve işlevini ilerleyici olarak dejenere eden ve beyin bileşenlerini etkileyen nöronal hastalıklardır (Ayeni ve diğerleri, 2022). En yaygın NH'ler Alzheimer hastalığı (AH), Parkinson hastalığı (PH), Huntington hastalığı (HH) ve Amyotrofik lateral skleroz (ALS)'dir (Rekatsina ve diğerleri, 2020). Bu hastalıklar, önde gelen bir ölüm nedenidir ve dünya çapında çok sayıda insanı etkiler (Ayeni ve diğerleri, 2022). Günümüzde, NH'leri tedavi için onaylanmış birkaç ilaç olmasına rağmen, bunların büyük bir çoğunluğu yalnızca ilişkili semptomlara yardımcı olur (Lamprey ve diğerleri, 2022). Çoğu NH'nin çok faktörlü bir yapıya sahip olduğu bilinmektedir. Patofizyolojik olarak, artan sayıda ROS, hücre döngüsüne yeniden giriş, hücre içi Ca^{+2} homeostazının disregülasyonu, mitokondriyal disfonksiyon, MAPK ailesi üyelerinden ERK1/2, JNK ve p38 MAPK'nin aktivasyonu, inflamasyon, spesifik proteinlerdeki (Akt/GSK-3 β /Tau) değişiklikler ve nöral apoptoz nörodejenerasyon mekanizmasındaki ortak özelliklerdendir (Abramov ve Bachurin, 2021; Chen ve diğerleri, 2009; Huang ve diğerleri, 2017; Morén ve diğerleri, 2022b; Nimmrich ve Eckert, 2013). Bu bilgilere göre, NH'lerin patogeneğinde yer alan tüm biyohedefler grubu ve süreçle aynı anda etkileşime giren doğal kaynaklı çok hedefli ilaçların keşfi ve/veya geliştirilmesi oldukça umut verici görünmektedir (Abramov ve Bachurin, 2021; Rekatsina ve diğerleri, 2020).

Bitkilerden elde edilen fitokimyasallar, NH'lerin tedavisi için “bitkisel ilaç” olarak önerilmektedir (Ayeni ve diğerleri, 2022; Naoi ve diğerleri, 2019). Fitokimyasallar, nörodejenerasyonun oksidatif stres, nöroinflamasyon, mitokondriyal disfonksiyon, nörotrofik faktör (NTF) eksikliği ve anormal modifiye protein birikimi gibi patojenik faktörlerine nöroprotektif etki gösterir. Buna göre fitokimyasallar, mitokondriyal apoptoz kaskadını doğrudan inhibe eder, beyin ve glial hücre hattı kaynaklı NTF gibi anti-apoptotik Bcl-2 ve NTF'lerin ekspresyonuna bağlanan hücresel sinyal yollarını modüle eder ve beyinde NTF benzeri aktiviteler gösterir. Ayrıca, hastalığa özgü anormal protein kümelerinin birikmesini, toksik oligomer ve fibril üretimini önlemek için nörondaki ana proteoliz yollarını, UPS'yi ve otofaji-lizozom yolu (ALP)'yi aktive eder (Naoi ve diğerleri, 2019; Rekatsina ve diğerleri, 2020). Fitokimyasallardan alkaloidler ise, AChE, monoamin oksidaz, A β agregasyon ve GSK-3 β inhibitörü, kolinerjik nikotinik nörotransmisyonu güçlendirici, monoaminerjik nörotransmisyon modülatörü, muskarinik bağlanma aktivitesi, NMDAR ve Ca^{+2} antagonisti, anormal Tau fosforilasyonunu önleyici,

anti-inflamatuar, anti-oksidan ve anti-apoptotik etki gibi özelliklere bağlı NH'lerde nöroprotektif ve/veya terapötik potansiyellere sahiptir (Kumar ve diğerleri, 2015; Libro ve diğerleri, 2016; Ng ve diğerleri, 2015; Xiao ve diğerleri, 2008). Fitokimyasalların özellikle de alkaloidlerin, çoklu nöroprotektif aktiviteleri ile ilişkili olarak, izole edilmiş anti-oksidan bileşikler yerine, karmaşık çeşitli aktif moleküller içeren fitofarmasötik ekstraktlar, NH'ler için çok hedefli bir terapötik etki potansiyeli sunar (Khan ve diğerleri, 2020; Lima ve Hamerski, 2019; Marino, Battaglini, Moles ve Ciofani, 2022; Sharifi-Rad ve diğerleri, 2022).

Papaveraceae familyası, önemli biyoaktivitelere sahip zengin alkaloid üretimleriyle doğrudan ilişkili olan tıbbi kullanımları ile çok iyi bilinmektedir. Bu familyanın 165 türünün alkaloidleri hakkında literatürler mevcuttur (Preininger, 1985: 23-37; Yu ve diğerleri, 2014; Zhang, Guo, Kennelly, Long ve Chai, 2020). *Glaucium* cinsi, *Papaveraceae* familyasına ait olup, izokinolin alkaloidleri açısından zengin bir kaynaktır (Doncheva ve diğerleri, 2014). Türkiye'de 4'ü endemik olmak üzere 9 türü bulunan *Glaucium* cinsi ile yapılan ilk çalışma bu bitkiden elde edilen alkaloidlerin anti-bakteriyel etkileri üzerinedir (Coşar ve diğerleri, 1981; URL-19). Diğer çalışmalar, *G. grandiflorum*, *G. grandiflorum* var. *grandiflorum*, *G. grandiflorum* var. *torquatum*, *G. corniculatum*, *G. corniculatum* subsp. *corniculatum*, *G. corniculatum* subsp. *refractum*, *G. leiocarpum*, *G. flavum*, *G. acudidentatum* ve *G. hausknehti* taksonlarının alkaloid profillerinin araştırılması ve biyolojik aktivite (anti-inflamatuar, anti-oksidan, DNA hasarını önleyici, AChE, BChE ve prolil oligopeptidaz ve siklooksijenaz-2 inhibitör aktivite) potansiyellerinin belirlenmesi şeklindedir (Bozkurt ve diğerleri, 2017b; Bozkurt ve diğerleri, 2018; Demir ve diğerleri, 2017; Orhan ve diğerleri, 2004; Özsoy ve diğerleri, 2018). *Glaucium* türleri Türkiye'de yaygın olarak yetişen, alkaloid içeriğince zengin ve çeşitli geleneksel tıp sistemlerinde bilişsel güçlendirici olarak kullanılan bitkiler olmasına rağmen (Ahmed ve diğerleri, 2013; Amtul ve Rahman, 2016: 373-397; Özsoy ve diğerleri, 2018; URL-19), bu alanda sınırlı sayıda çalışma bulunmakta olup, *G. corniculatum* (L.) RUD. subsp. *refractum* (Nábělek) Cullen (*G. grandiflorum* Boiss. & A. Huet subsp. *refractum* (Nábělek) Mory)'nin NH'lerde etkili çeşitli moleküler mekanizmalar üzerinde etkisinin araştırıldığı kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu durum, çalışmamızı ilgili alanda önemli kılmaktadır.

Bu doktora tez çalışmasında, NH'lerin ortak mekanizmaları üzerinde nöroprotektif etkiye sahip bitki kaynaklı alkaloidlerin keşfine yönelik deneysel çalışmalar yapılmıştır. Bu

deneysel çalışmalarda, *G. grandiflorum*'un kloroform, metanol ve su çözücülerini ile elde edilen alkaloid ekstraktlarının, H₂O₂ ile nöral hasara indüklenmiş ve fPC12 hücrelerinde oksidatif stres, nöral hücre döngüsünün disregülasyonu ve nöral apoptoz üzerindeki etkileri, bunlara ek olarak kloroform alkaloid ekstraktının hücre içi Ca⁺² homeostazının disregülasyonu, MAPK (ERK1/2, JNK ve p38) sinyal yollarının aktivasyonu ve Akt/GSK-3 β /Tau nöral ölüm sinyal yolağının disregülasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Literatürde, ekstrakte edilerek elde edilen alkaloidlerin çoğunun karışım olduğu ve bu karışımın ayırımında, alkaloid sınıfı, bazikliği, özel fonksiyonel grupların varlığı ve çözünürlük farklılıklarının kullanıldığı bildirilmektedir (Dey ve diğerleri, 2020; Petruczynik, 2012; Yubin, Miao, Bing ve Yao, 2014). Bununla birlikte, alkaloidlerin kimyasal yapısındaki farklılıklar, çözünürlüklerinde değişiklikler oluşturmakta ve farklı (kimyasal yapısına uygun) çözücülerde çözünmelerinin nedenini açıklamaktadır. Dolayısıyla, farklı çözücülerin kullanıldığı ekstraksiyonlarda farklı alkaloid profilleri ortaya çıkmaktadır (Srinivasan ve Kumaravel, 2015). Bu nedenle, bu tez çalışmasında *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloid ekstraktlarının hazırlanmasında kloroform, metanol ve su olmak üzere üç farklı çözücü kullanılmıştır.

Yeni ilaçların geliştirilmesi ve terapötik ajanların hazırlanması için ilaç endüstrisinde fitokimyasallar hayati öneme sahiptir (Nisha, Darshana, Madhu ve Bhupendra, 2011). Bu yeni ilaçların geliştirilmesi ise, doğal kaynaklardan aktif maddelerin tanımlanmasıyla başlar. Bitki ekstraktlarının taranması, çeşitli bitki türlerinde terapötik olarak aktif bileşikleri bulmak için yeni bir yaklaşımdır (Gopalakrishnan ve Udayakumar, 2014; Starlin, Prabha, Thayakumar ve Gopalakrishnan, 2019). Ayrıca, bitkilerdeki etken bileşenlerin analizinde, ekstraktlardaki bileşen profili kadar bu bileşenlerin miktarı da önemlidir. GC-MS, bir bitki örneğinde bulunan bileşikleri belirlemek ve tanımlamak için kullanılan birleşik bir analitik tekniktir (Konappa ve diğerleri, 2020; Uma ve Balasubramaniam, 2012). Bu nedenle, çalışmamızda *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloid ekstraktlarının bileşenleri GC-MS ile kalitatif ve kantitatif olarak analiz edilmiştir. Yapılan GC-MS analizlerinde, her üç çözücüde de aynı alkaloid bileşenler (allokriptopin, tetrahidropalmitin ve tetrahidroberberin N-oksit (trans-kanadin-N-oksit)) elde edilmiş, ancak bileşenlerin oranları çözücülere göre farklılık göstermiştir. Alkaloid oranları metanol > su > kloroform şeklinde olup, toplam alkaloid oranı her üç çözücünün ekstraksiyonunda da birbirine yakın bulunmuştur. Bu sonuçlar,

ekstraksiyon metodumuz ile yüksek miktarda ve saflıkta alkaloit elde ettiğimiz kanıtı olmuştur. Kromatogramlarda yer alan pikler değerlendirildiğinde de, bu sonucumuz desteklenmektedir. Yapılan bir çalışmada, Ankara civarından toplanan *G. grandiflorum* Boiss. et Huet var. *torquatum* Cullen türünde soxhlet yöntemi kullanılarak elde edilen izokinolin alkaloitleri (glausin, izokoridin, protopin, kriptopin, allokriptopin, trans-kanadin metoklorür ve koridin) kalitatif olarak ince tabaka kromatografisi (TLC) ile tespit edilmiştir (Gözler, 1982). *G. grandiflorum* Boiss. et Huet, *G. corniculatum* (L.) Rud. subsp. *corniculatum* ve *G. corniculatum* (L.) Rud. subsp. *refractum* (Nab.) Cullen ile kolon kromatografisi ve TLC kullanılarak yapılan fitokimyasal araştırmalarda ise, bu bitkilerin allokriptopin, protopin, koridin, izokoridin, berberin, norkelidonin, dihidrokeletrin, 8-asetonildihidrokeletrin, tetrahidrojarrorizin (koripalmin), tetrahidropalmatin alkaloitlerini içerdiği gösterilmiştir (El-Afifi, al-Eisawi, al-Khalil ve Schiff Jr, 1986; Phillipson, Gray, Askari, ve Khalil, 1981). İki *G. corniculatum* türünün (Cezayir ve Bulgar kökenli) alkaloit profillerinin GC-MS ile karşılaştırmalı olarak belirlendiği bir çalışmada, allokriptopinin her iki bitkide de bulunduğu rapor edilmiştir. Bunun yanı sıra, benzofenatridin alkaloitlerinden olan keletrin ve sanguinarin sadece Bulgaristan'a özgü bitkilerden elde edilmiştir (Doncheva ve diğerleri, 2014). Bu alkaloitler ayrıca karasal iklime sahip olan Çek Cumhuriyeti türlerinde de bulunmaktadır (Novak, Dolejš ve Slavík, 1972). Bu durum, bu bitkinin coğrafi konumunun ve diğer çeşitli faktörlerin (bitkilerin genetiği, gelişim aşaması ve çevre) *G. corniculatum* türlerinden kaynaklanan bu tip izokinolin alkaloitlerinin biyosentezini belirleyebileceğini düşündürmektedir (Doncheva ve diğerleri, 2014). Çalışmamızda, üç çözücünün ekstraksiyonun GC-MS analizi sonucunda dikkat çeken bir diğer bulgu, majör alkaloitin kloroform (%91,5), metanol (%46,4) ve su (%84,0) çözücüsü için de allokriptopin olarak tespit edilmesidir. Literatürde, *G. grandiflorum* Boiss. & Huet var. *grandiflorum*'da majör alkaloitlerin allokriptopin ve protopin, minör alkaloitlerin ise (-)- α -N-metilkanadin, (-)- β -N-metilkanadin, (+)-retikülin ve berbitin olduğu rapor edilmiştir (Özsoy ve diğerleri, 2018). *G. corniculatum*'da da majör alkaloit, genellikle protopin ve koridinin de eşlik ettiği allokriptopindir (Doncheva ve diğerleri, 2014). Yapılan bir çalışmada, metanol çözücüsü ile hazırlanan *G. corniculatum* CURT. ekstraktlarında yine allokriptopin majör alkaloit olarak tespit edilmiştir (Novak ve diğerleri, 1972). Sonuçlarımız ve literatür bilgileri, alkaloit ekstraksiyon metodumuz ile yüksek oranda ve saflıkta allokriptopin alkaloiti elde edebildiğimizi göstermiştir. Kloroform, metanol ve su alkaloit ekstraktlarında majör olarak bulunan allokriptopinin miktarı ise standart eğri denklemine göre belirlenmiştir. Alkaloit ekstraktlarındaki allokriptopin miktarı 236-497 $\mu\text{g}/\text{mg}$ arasında değişmekte olup, en yüksek

allokriptopin miktarı yukarıdaki bulgularımızla paralel olarak kloroform alkaloit ekstraktında bulunmuştur. Kloroform alkaloit ekstraktında her iki alkaloit ekstraktına göre iki kat yüksek miktarda allokriptopinin belirlenmiş olması oldukça dikkat çekicidir. Literatürde, çözücülerin kimyasal yapısal farklılıklarının, bir maddeyi çözme yeteneklerini belirlediği bildirilmiştir. Serbest alkaloitlerin çoğu lipofiliktir, bu nedenle organik bir çözücü olan kloroform serbest alkaloitleri çıkarmak için kullanılabilir (Joshi ve Adhikari, 2019; Yubin ve diğerleri, 2014). Ek olarak, kloroform diğer çözücülere kıyasla daha düşük bir polarite indeksine sahiptir, bu da alkaloitlerin bu çözücü içinde daha iyi çözünmesi için başka bir faktördür (Kukula-Koch ve Widelski, 2017: 1-738; Nawaz, Shad, Rehman, Andaleeb ve Ullah, 2020; Svendsen ve Verpoorte, 1983: 51-58). *G. corniculatum* (L.) J. Rudolf ile yapılan bir çalışmada, sanguinarin, izokoridin, koridin, protopin, predisentrin, dehidrokoridin ve allokriptopin alkaloitleri kloroform ve etanol çözücülere ile hazırlanan ekstraksiyonlardan elde edilmiştir. Kloroform çözücüsü ile etanol çözücüsünden farklı olarak ise retikulin, glaufidin, talikidin ve glausin alkaloitleri de elde edilmiştir (Israilov ve diğerleri, 1983). Buna göre kloroformun diğer çözücülere kıyasla allokriptopin ve bazı izokinolin alkaloitleri için daha iyi bir çözücü olduğunu söylemek mümkündür (URL-20). Bu nedenle, çalışmamızda farklı yolların analizi için yapılan tüm *in vitro* moleküler çalışmalarda kloroform çözücüsü ile hazırlanan alkaloit ekstraktının öne çıkmasının, bu ekstraktta bulunan yüksek miktarda allokriptopin ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ek olarak, kantitatif GC-MS analiziyle alkaloit ekstraktlarının 100, 250 ve 500 µg/mL dozlarına karşılık gelen allokriptopin miktarları belirlenerek, moleküler çalışmalarda hücrelere uygulanan allokriptopin nicelleştirilmiştir.

Alkaloit ekstraktlarımızdaki majör alkaloit allokriptopin olup, diğer alkaloitler tetrahidropalmin ve tetrahydroberberin N-oksittir. Bu alkaloitlerin tümü izokinolin alkaloitleridir. Bu durum, *G. corniculatum*'un 20'den fazla izokinolin alkaloiti içerdiğini bildirilen çalışmalarla paralellik göstermektedir (Doncheva ve diğerleri, 2014). Alkaloit ekstraktlarımızdaki alkaloitler ile bugüne kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde, tetrahidropalminin öğrenme ve hafıza bozukluğuna karşı anti-oksidan, anti-inflamatuar ve anti-apoptotik mekanizmalar yoluyla koruyucu özelliklerinin olduğu gösterilmiştir (Zhang ve diğerleri, 2018). Tetrahydroberberinin ise, anti-oksidan, anti-inflamatuar, K⁺ iyon kanallarını bloke edici, vasküler kas gevşemesini indükleyici, anti-hipertansiyon ve anti-aritmik özellikleri ile ilişkili Ca⁺² kanallarını bloke edici gibi çeşitli biyolojik etkinlikleri bildirilmiştir (Mari ve diğerleri, 2018; Pingali ve diğerleri, 2015). Alkaloit

ekstraktlarımızdaki allokriptopinin ise başlıca anti-bakteriyel, anti-viral, anti-fungal, anti-parazitik, anti-kanser, ileum rahatlatıcı ve kontraktil etkilerinin olduğu görülmüştür (Abu-Ghalyun, Masalmeh ve Al-Khalil, 1997; Kosina ve diğerleri, 2010; Orhan, Özçelik, Karaoğlu ve Şener, 2007a; Orhan, Özçelik, ve Şener, 2007b; Mandal, Sahoo, Saha ve Chowdhury, 2018; Satou ve diğerleri, 2002). Ayrıca, yapılan farklı çalışmalarda Na^+ , K^+ ve Ca^{+2} iyon kanallarının modülasyonu ve/veya inhibisyonu gibi farklı mekanizmalarla anti-aritmik aktivite dolayısıyla, kardiyovasküler sistem üzerinde koruyucu özelliklerinin olduğu gösterilmiştir (Li ve diğerleri, 2019; Lin ve diğerleri, 2013; Xu ve diğerleri, 2015; Zhang ve diğerleri, 2015). Allokriptopin ile yapılan bazı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda ise, bu alkaloidin AH'nin belirteçlerinden biri olan AChE enzimi üzerinde yüksek düzeyde inhibitör etkiye sahip olduğu, GABA reseptör agonistlerinin bağlanmasının bir uyarıcısı olarak hareket ettiği, insan serotonin ve nöradrenalin taşıyıcılarını bloke ettiği ve hayvan modellerinde anti-depresan benzeri etkilere sahip olduğu buna bağlı olarak nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir (Fedurco ve diğerler, 2015; Şener ve Orhan, 2005; Orhan ve Şener, 2006). *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloid ekstraktlarının, daha önceki çalışmalarda bildirilen önemli etkilere sahip üç izokinolin alkaloidini içermesi, bu sayede çoklu patolojik mekanizmaları hedef alma potansiyeline sahip olması, bitkinin diğer fitokimyasal bileşenlerini hiç içermemesi veya eser miktarda içermesi çalışmamızı önemli ve özgün kılmaktadır. Bununla birlikte, alkaloid ekstraktlarının nöroprotektif etkisinde tetrahidropalmin ve tetrahidroberberin N-oksit alkaloidlerinin etkinliğinin allokriptopinin etkinliğinin üzerinde olmadığı, bu iki alkaloidin elde edilen nöroprotektif etkiye sinerjistik olarak katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Ayrıca, allokriptopinin yukarıda belirtilen özelliklerine rağmen, hiçbir çalışmada NH'ler üzerindeki olası etkinliği; oksidatif stres, nöral hücre döngüsünün disregülasyonu, nöral apoptoz, MAPK sinyal yollarının aktivasyonu, hücre içi Ca^{+2} homeostazı ve Akt/GSK-3 β /Tau nöral ölüm sinyal yollarının disregülasyonu üzerindeki etki mekanizması ortaya konulmamıştır. Bu nedenle, bu çalışma, NH'lerin tedavisinde umut verici potansiyele sahip olan izokinolin alkaloidleri özellikle de allokriptopini gündeme getirmektedir. Buna göre bu çalışmanın olumlu sonuçlarının ilgili literatüre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızda, *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloid ekstraktlarının oksidatif stres ve oksidatif stres ile ilişkili nöral hücre döngüsünün disregülasyonu, nöral apoptoz, MAPK sinyal yollarının aktivasyonu, hücre içi Ca^{+2} homeostazı ve Akt/GSK-3 β /Tau nöral ölüm sinyal yollarının disregülasyonuna etkileri fPC12 hücreleri üzerinde araştırılmıştır. PC12

hücreleri, nöral farklılaşma ve fonksiyonun araştırılması için iyi kurulmuş bir model sistemi temsil eder; NGF ile muamele, PC12 hücrelerini nöron benzeri hücelere farklılaşmaya indükler. NGF, sempatik ve duyuşal nöronların hayatta kalması ve gelişimi için kritik bir NTF'dir ve NGF'ye maruz kaldıktan sonra farklılaşan PC12 hücreleri, çoğalmayı durdurur, artan AChE aktivitesi gösterir ve elektriksel olarak uyarılabilir hale gelir. Ayrıca, hücelere uygulanan NGF, NGF reseptörü tropomiyosin ile ilişkili kinaz A (TrkA)'nın aktivasyonu yoluyla, PI3K/Akt/GSK-3 β sinyal yolağı ve MAPK ailesi üyelerinden ERK1/2 ve p38 MAPK'nin aktivasyonunu indükler (Kudo ve diğeri, 2015; Sierra-Fonseca ve diğeri, 2014). Bu hücre hattı, H₂O₂ gibi oksidanlara karşı hassasiyet gösterir, oksidatif stres ve apoptoz mekanizmalarına ek olarak, oksidatif stres ile ilişkili MAPK sinyal yollarının aktivasyonu, nöral Ca⁺² homeostazının disregülasyonu (PC12 hücrelerinin L-, N- ve P/Q tipi VGCC'leri ifade ettiğı bilinmektedir. Bu VGCC'ler, hücelere Ca⁺² akışı için önemli mekanizmalardan biri olarak hizmet ederek hücre içi Ca⁺² seviyesinin düzenlenmesini sağlar.) çeşitli anti-oksidanların anti-oksidatif ve sitoprotektif özelliklerinin incelenmesinde dolayısıyla, NH'ler ve tedavilerinin araştırılmasında kullanılan nöral hücrel bir modeldir (Bustamante, Acosta, Karadayian ve Lores-Arnaiz, 2019; Jiang ve diğeri, 2016a; Lenkiewicz ve diğeri, 2016; Liu ve diğeri, 2017a; Saminathan ve diğeri, 2009; Xiao ve diğeri, 2008, 2011; Zhang ve diğeri, 2010). Bu nedenle, çalışmamızda oksidatif stres indükli nöral hasar ve oluşan nöral hasara karşı nöroprotektif etki mekanizmalarının incelenmesinde 100 ng/mL NGF ile 4 gün farklılaştırılmış PC12 hücre hattı kullanılmıştır.

Çalışmamızda PC12 hücreleri H₂O₂ ile muamele edilerek, oksidatif stres ile nöral hasara indüklenmiş *in vitro* NH hücre modelinin oluşturulması amaçlanmıştır. Canlı dokular tarafından üretilen ROS ailesinin önemli bir üyesi olan ve genellikle oksidatif hasarın bir indükleyicisi olarak kullanılan H₂O₂ ajanı ve PC12 hücreleri ile oluşturulan oksidatif strese dayalı hücre modelinin AH başta olmak üzere NH modeli olarak kullanıldığını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Fujita ve diğeri, 2006; López ve Calvo, 2011; Yan, Yang, Luo ve Wu, 2011; Xiao ve diğeri, 2008; Khoramian Tusi, Babaei Abraki, Amini ve Khodagholi, 2012; Chen ve diğeri, 2016; Jiang ve diğeri, 2016a). H₂O₂'nin hücre içi ROS miktarını arttırdığı, çeşitli moleküllerin oksidatif modifikasyonlarına yol açarak apoptoz veya nekroz yoluyla hücre ölümünü başlattığı ve hücrel hasara yol açtığı bildirilmiştir (Zhao ve diğeri, 2013). Bu nedenle, çalışmamızda H₂O₂'nin, yüksek oranda hücre ölümünü indüklemeyen ve özellikle nöral apoptoz indüksiyonunda etkin olabilecek doz ve süresinin belirlenmesi için hücre canlılık testleri yapılmıştır. Sonuçlarımızda,

H₂O₂'nin artan konsantrasyonlarında PC12 hücrelerine sitotoksik etkisinin arttığı, bununla ilişkili olarak da hücre canlılığının azaldığı belirlenmiş olup, 200 µM H₂O₂'nin 24 saatlik uygulaması sonrası %55±5 hücre canlılığı tespit edilmiştir. ISO 10993-5 standartında, ağır derecede sitotoksik etkiye sahip maddelerin toplam hücre sayısının %50'sinin üzerinde hücre ölümüne neden olduğu; orta derecede sitotoksik etkiye sahip maddelerin %50 ile %79 arasında; hafif sitotoksik etkiye sahip maddelerin %80 ile %89; sitotoksik olmayan maddelerin ise %90'a eşit veya daha fazla hücre canlılığına neden olduğu raporlanmıştır (ISO, 2009). Bu standarta göre çalışmamızda hücre canlılığı %50'sinin üzerinde olan H₂O₂ konsantrasyon ve uygulama süreleri kabul edilebilir düzeydedir. Dolayısıyla, bundan sonraki çalışmalarda PC12 hücrelerinde orta derecede sitotoksik etkiye neden olan en yüksek konsantrasyon ve süre olan 200 µM H₂O₂'nin 24 saatlik uygulaması kullanılmıştır. Düşük H₂O₂ konsantrasyonları tercihen kaspaza bağlı apoptotik yolağı aktive ederken, yüksek H₂O₂ konsantrasyonları kaspazdan bağımsız bir şekilde apoptotik ve nekrotik hücre ölümüne neden olmaktadır (Tochigi ve diğerleri, 2013). Dolayısıyla, çalışmamızda ağır sitotoksik etki gösterebileceği konsantrasyonlarda apoptozdan çok nekroz oluşturma ihtimali nedeniyle 24 saat 300 µM ile 48 saat 200 ve 300 µM H₂O₂ uygulamaları tercih edilmemiştir. H₂O₂'nin düşük konsantrasyon ve inkübasyonları ise PC12 hücre modelimizde apoptozun belirlenememesi ihtimalinden dolayı kullanılmamıştır. Literatürde, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları destekler nitelikte araştırmalar yer almaktadır. Yapılan birçok çalışmada 200 µM konsantrasyonda H₂O₂ ile 24 saat muamele edilen PC12 hücrelerinde yaklaşık olarak %50 hücre sağkalımının tespit edildiği bildirilmiştir (Kumar, Seal, Howes, Kite ve Okello, 2010; Li ve diğerleri, 2017; Liu, Zeng, Gaur, Fang ve Little, 2017b; Pera ve diğerleri, 2013).

Toksisite çalışmaları sonuçlarımız ve literatürdeki çalışmalara göre belirlenen H₂O₂ konsantrasyon ve inkübasyon süresinin kullanıldığı (200 µM, 24 saat) flow sitometrik ROS analizi çalışmamızda, H₂O₂ ile oksidatif strese indüklenmiş fPC12 hücrelerinde kontrole göre, hücre içi ROS seviyesinde 18,6 kat bir artış belirlenmiştir. Çeşitli çalışmalarda, farklı süreler ve H₂O₂ konsantrasyonları ile muamele edilen PC12 hücrelerindeki hücre içi ROS seviyelerinin, kontrolün ~2 ile 22 katı arasında değiştiği raporlanmış olup, H₂O₂'nin ROS üretimini arttırarak, oksidatif strese ve dolayısıyla hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (Fujita ve diğerleri, 2006; Gao ve diğerleri, 2018; Konno, Melo, Chambers ve Avezov, 2021; Lee, Choi, Hwang, Shim ve Kang, 2020; Li ve Li, 2015; Lin ve diğerleri, 2015; Lv ve diğerleri, 2017; Shou, Cheung, Gao, Shi ve Shaw, 2019; Wang ve diğerleri, 2016).

Çalışmamızda, flow sitometrik apoptoz analizlerinde H_2O_2 'nin bu konsantrasyon ve inkübasyon süresinde fPC12 hücrelerinde %72,2 oranında toplam apoptotik hücre (TAH) ve %3,0 oranında nekrotik hücre (NH) belirlenmiştir. Ayrıca, apoptozu temsil eden Sub G1 fazındaki hücre oranında da artış (%21,2; Sub G1 fazındaki hücre) tespit edilmiştir. Bulgularımızda, NH yüzdesinin apoptotik hücre yüzdesine göre oldukça düşük kaldığı tespit edilmiştir. Bu durum, hücre ölümünün temel sorumlusunun apoptotik hücre ölümü olduğunu göstermiştir. Farklı araştırmacılar tarafından flow sitometri kullanılarak yapılan bazı çalışmalarda 12-24 saat 100-200 μM H_2O_2 ile muamele edilen PC12 hücrelerinde belirlenen apoptoz oranları %20,1 ile %55,6 arasında değişmekte olup, H_2O_2 ajanının PC12 hücrelerinin ölümünü apoptoz ile indüklediği gösterilmiştir (Fujita ve diğerleri, 2006; Jiang ve diğerleri, 2016a; Qi, Qi, Gui, Shen ve Feng, 2016; Xiao ve diğerleri, 2008; Zhang ve diğerleri, 2019). Ayrıca, bazı *in vitro* hücresel çalışmalarda H_2O_2 , hücre içi ROS seviyesine ek olarak Bcl-2 ilişkili-X (Bax) ve Kaspaz-9/-3 düzeyini arttırmış, mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\Psi_m$)'ni, Bcl-2 ve mitokondriyal sitokrom-c düzeyini azaltmıştır (Chen ve diğerleri, 2018; Cheng ve diğerleri, 2021; Redza-Dutordoir ve Averill-Bates, 2016). Bu veriler, hücre içi ROS seviyesi artışı ile apoptozun ilişkili olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, çalışma sonuçlarımız seçilen H_2O_2 konsantrasyon ve uygulama süresi ile oksidatif strese bağlı nöral apoptozun indüklendiğini ve NH hücre modelinin başarılı bir şekilde oluşturulduğunu kanıtlamıştır. Literatür bilgileri ile de desteklenen çalışma sonuçlarımız, birden fazla analizle doğru bir şekilde oluştuğunu ortaya koyduğumuz *in vitro* NH hücre modelinden elde edilecek sonuçların güvenirliliği ve ilaç denemeleri açısından önemlidir.

Bitkisel ilaçlar çeşitli hastalıkların tedavisinde doğal oldukları için kullanılmakta ve bu nedenle allopatik ilaçlardan daha güvenli oldukları varsayılmaktadır. Bununla birlikte, bitkisel ilaçlarla ilgili toksisite çalışmaları, şifalı bitkilerin yararlı kullanımları dolayısıyla güvenilirliklerinin ortaya konulması açısından önemlidir (Mensah ve diğerleri, 2019). Bu kapsamda çalışmamızda, *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform, metanol ve su alkaloit ekstraktlarının PC12 hücreleri üzerinde toksik olmayan en yüksek dozu ve uygulama süresi belirlenmeye çalışılmıştır. Sonuçlarımıza göre, uygulanan tüm alkaloit ekstraktlarının doz ve süre ile doğru orantılı bir şekilde hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. Uygulamalarda en yüksek konsantrasyon olan 1000 $\mu g/mL$ 'lik konsantrasyonun %50'nin üzerinde ölüme neden olduğu, bu nedenle deneysel çalışmalar için uygun olmadığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla, bundan sonraki çalışmalarda her üç çözücü ekstraktı için 100, 250

ve 500 µg/mL konsantrasyonlarının 18 saat uygulaması kullanılmış olup; uygulamalarda hücre canlılığındaki azalmanın %27'nin üzerinde olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca, kloroform ve metanol alkaloit ekstraktından birbirine yakın sonuç elde edilmekle birlikte, en az toksisite su alkaloit ekstraktından elde edilmiştir. Literatürde, PC12 hücrelerinin canlılığı üzerinde *Codonopsis pilosula* (Franch) Nannf (Dangshen) bitkisinin total alkaloitleri (3-100 µg/mL) ve *Huperzia selago* (L.) Bernh. ex Schrank et Mart.'dan elde edilen alkaloit ekstraktlarının (0,25-6,25 µg/mL) etkilerinin incelendiği çalışmalarda, hücre canlılığının düşük dozlarda değişikliğe uğramadığı, yüksek dozlarda ise doza bağlı hücre canlılığında azalmanın olduğu gösterilmiştir (Lenkiewicz ve diğerleri, 2016; Liu, Bao, Song ve An, 2003). Bu çalışmalarda olduğu gibi bizim çalışmamızda da yüksek dozlarda hücre canlılığında azalma gözlenmiştir. Ayrıca, çalışmamıza göre oldukça düşük dozların kullanıldığı bu çalışmalarda canlılıklardaki azalmaların daha fazla olduğu söylenebilir. ISO 10993-5 standartında ağır derecede sitotoksik etkiye sahip maddelerin toplam hücre sayısının %50'sinin üzerinde hücre ölümüne neden olduğu belirtilmiştir (ISO, 2009). Bu standartta göre, elde ettiğimiz sonuçlar alkaloit ekstraktlarının ilgili alanda güvenli kullanımının mümkün olabileceğini göstermiştir.

Çalışmamız kapsamında H₂O₂'in PC12 hücrelerine uygulaması ile oluşturulan *in vitro* NH modelinde *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform, metanol ve su alkaloit ekstraktlarının H₂O₂'ye karşı nöroprotektif etkileri araştırılmıştır. Oluşturulan bu modelde çalışmalarımızda araştırılan tüm moleküler yollar üzerinde etkin ve aynı zamanda sitotoksik olmayan alkaloit ekstraktının dozlar ve süresinin belirlenmesi hedeflenmiş ve bunun için PC12 hücrelerine alkaloit ekstraktlarının ön muamelesi sonrası H₂O₂ uygulanmıştır. H₂O₂, kontrol grubuna göre %45 oranında hücre ölümüne neden olmuştur. Diğer taraftan, üç farklı çözücü ile elde edilen alkaloit ekstraktlarının, H₂O₂ uygulaması sonucu oluşan hücre ölümüne karşı koruyuculuk gösterdiği belirlenmiştir (%3-39 oranında hücre ölümü azalmıştır). Ancak, bu koruyuculuğun oranının ekstraktların çözücüler ve uygulanan konsantrasyonlara göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir. En iyi koruyuculuğu su alkaloit ekstraktının gösterdiği, kloroform ve metanol alkaloit ekstraktlarının da birbirine yakın olmakla birlikte suya göre daha düşük bir koruyuculuğunun olduğu bulunmuştur. Özellikle, kloroform alkaloit ekstraktının yapılan moleküler çalışmalarda en etkin alkaloit ekstraktı olmasına rağmen hücre canlılığı üzerindeki koruyuculuğunun düşük olması dikkat çekicidir. Literatürde, anti-oksidan özelliğe sahip sekonder metabolitlerin oksidatif stresi baskılayarak hücre ölümünü engellediği ancak bu metabolitlerin yüksek dozlarının tersine bir etki gösterdiği bildirilmiştir

(Morales-Gonzalez, 2013). Buna göre, kloroform alkaloit ekstraktının özellikle 500 µg/mL’de bir sekonder metabolit olan allokriptopinin yüksek miktarda bulunmasına bağlı hücre canlılığı üzerinde düşük bir koruyuculuğunun olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, çalışmamızda olduğu gibi düşük konsantrasyonlarda daha etkin sonucun alınması ilaç etken maddelerinin dozaj ayarlamalarında tercih edilen bir durumdur. Ek olarak, bu sonuçlar *in vitro* hücresel çalışmalardan elde edilmiş olup, akredite bir deney hayvanları laboratuvarında tez kapsamı dışında yaptığımız *in vivo* çalışmalarda hem kloroform alkaloit ekstraktının hem de ticari alloriptopinin akut toksisite testine göre fareler üzerinde toksik olmadığı belirlenmiştir (Sonuçlar verilmemiştir). Ayrıca, ekibimizce yapılan *in siliko* çalışmalarda, ticari allokriptopin için, bileşiklerde yapısal toksisite belirteci olan #rtvFG (reaktif fonksiyonel grupların sayısı) hesaplanmıştır. Bileşikteki #rtvFG sayısının 1’den fazla olmaması önerilmekte olup, allokriptopin için #rtvFG değerinin kabul edilen aralıktaki sınır içerisinde olduğu tespit edilmiştir. Toksisite için bir diğer belirteç olan QPlogHERG (hERG K⁺ kanal bloklayıcı toksik potansiyelin IC50 değeri), değeri incelendiğinde de allokriptopinin hERG K⁺ iyon kanallarını bloke etmede sorun oluşturmayacağı ve ciddi bir toksisiteye neden olmayacağı öngörülmüştür (Baran, 2022). *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. alkaloit ekstraktının PC12 hücrelerinde H₂O₂ toksisitesine karşı nöroprotektif etkisinin olup-olmadığının araştırıldığı bir çalışmada, H₂O₂ ile hasara uğratılmış PC12 hücrelerinin alkaloit ekstraktı ile muamele edilmesinin ardından hücre canlılığının arttığı gösterilmiştir. Alkaloit ekstraktında majör alkaloitler olarak bikukulin, egenin, kikemanin, protopin, tetrahidropalmatin ve palmatin tespit edilmiştir (Yan ve diğerleri, 2011). Bu çalışmada bulunan tetrahidropalmatine ek olarak tetrahidroberberin N-oksit ve allokriptopin içeren *G. grandiflorum*’dan elde edilen alkaloit ekstraktlarımızın, PC12 hücrelerinde H₂O₂ ajanına karşı protektif etkileri ile ilgili bir çalışmanın yapılmamış olmasına bağlı, elde edilen sonuçların ilgili alanda yapılacak olan bilimsel çalışmalara önemli veri oluşturacağını düşünmekteyiz. Bu durum çalışmamızı özgün kılmaktadır.

Oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyonun, değişmiş proteostazın, fizyolojik nörotransmitter metabolizmasının, inflamasyonun veya anti-oksidan yolların düzensizliğinin bir sonucu olarak doğrudan veya dolaylı olarak nöronları ölüme yatkın hale getirebilir. Bu süreçlerle ilişkili olarak oksidatif stres; AH, PH, HH ve ALS gibi yaşa bağlı NH’lerin patogenezi ve patofizyolojisinde merkezi bir rol oynamaktadır (Domanskyi ve Parlato, 2022; Yadav ve Shukla, 2021: 1-8). Ek olarak, en önemli ROS’den biri olarak kabul edilen H₂O₂ ile oksidatif stresin indüklendiği ve indüklenen bu oksidatif stresin NH’lerin

nöral ölümle sonuçlanan çeşitli patolojilerine neden olan sinyal yollarını etkinleştirdiği bilinmektedir (Altamura ve Muckenthaler, 2009; Hadipour, Tayarani-Najaran ve Fereidoni, 2020). Oksidatif stresin NH'lerdeki önemli rolleri göz önüne alındığında, ROS seviyelerinin anti-oksidan özelliklere sahip farmakoterapötik ajanlarla baskılanması, nörodejenerasyonu yavaşlatmak ve ilişkili semptomları hafifletmek için umut verici bir tedavi seçeneğini temsil edebilir (Liu ve diğerleri, 2017a; Niedzielska ve diğerleri, 2016). Bu nedenle, çalışmamızda *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform, metanol ve su alkaloit ekstraktlarının fPC12 hücrelerinde H₂O₂ ile indüklenen ROS oluşumu üzerindeki inhibitör etkileri araştırılmıştır. Buna göre, H₂O₂'nin indüklediği ROS seviyesini (kontrole göre 18,6 kat artma) baskılamada alkaloit ekstraktları ve uygulanan konsantrasyonlara göre farklı sonuçlar alınmış olmakla birlikte (H₂O₂ uygulanmış gruba göre 2,3-5,7 kat baskılama), kloroform alkaloit ekstraktının metanol ve su alkaloit ekstraktına göre öne çıktığı ve 500 µg/mL'de en yüksek baskılamanın olduğu belirlenmiştir. Fitokimyasalların anti-oksidan mekanizmalarının ROS'un gideriminin indüklenmesi ve hücre içi ROS birikimin baskılanmasına bağlı anti-oksidan savunma sisteminin güçlendirilmesine dayalı olduğu bildirilmektedir (Limanaqi ve diğerleri, 2020). Çalışmamızda, allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının yüksek oranda ROS'u baskılaması, bu ekstraktın ve özellikle allokriptopinin anti-oksidan savunma sistemi üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir. Çeşitli çalışmalarda, anti-oksidatif özellikte olan alkaloitlerin serbest radikalleri temizlediği, lipid ve protein oksidasyonunu önlediği ve ROS kaynaklı hücre hasarına karşı sitoprotektif aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Lenkiewicz ve diğerleri, 2016; Libro ve diğerleri, 2016). Yapılan bir çalışmada, flow sitometrik ROS analizinde, PC12 hücrelerinde oluşan hücre içi ROS seviyesinin (kontrole göre ~2,3 kat), izerinkofilin (*Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil. (Rubiaceae) bitkisinden izole edilen bir oksindol alkaloitin ticari preparatı) ile ön muamele sonucu kontrol grubunun ~1,3-1,8 katına baskılandığı gösterilmiştir (Xian ve diğerleri, 2012a). Farklı hücre hatları ve nörodejeneratif ajanlar ile flow sitometrik veya floresan mikroskobu kullanılarak yapılan çalışmalarda ise, hücre içi ROS seviyesini *Coptis chinensis*'den izole edilen berberinin ~1,5 kat (2,2'-Azobis(2-amidinopropan) dihidroklorür (AAPH) indüklü gruba göre) (Shou ve diğerleri 2019), *Nelumbinis plumula*'dan izole edilen neferin alkaloitinin ~1,3 kat (tert-bütill hidroperoksit ile muamele edilen gruba göre) (Xie ve diğerleri, 2013), *Fusarium lateritium* SSF2'den izole edilen trisiklik piridin alkaloitlerinin ~2,6 kat (glutamat ile muamele edilen gruba göre) baskıladığı raporlanmıştır (Lee ve diğerleri, 2020). Yapılan bu çalışmalara göre, çalışmamızdaki allokriptopin, tetrahidropalmatin ve tetrahidroberberin N-oksit alkaloitlerini içeren alkaloit ekstraktlarının, berberin, izerinkofilin, neferin ve trisiklik piridin

alkaloitlerine göre daha yüksek anti-oksidan etkiye sahip olduğu söylenebilir. Buna ek olarak, alkaloit ekstraktlarımızdaki allokriptopin, tetrahidropalmatin ve tetrahidroberberin N-oksit alkaloitlerinin farklı çalışmalarda da anti-oksidan özelliğe sahip oldukları bildirilmiştir (Ding ve diğerleri, 2021; Lu ve diğerleri, 2019; Pingali ve diğerleri, 2015). Bu bilgiler, alkaloit ekstraktlarının H_2O_2 'nin indüklediği hücreölüm üzerindeki protektif etkilerinin, hücre içi ROS artışını baskılamalarının bir sonucu olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızda dikkat çekici bir durum ise, daha önce belirttiğimiz gibi kloroform alkaloit ekstraktının anti-oksidan aktivitede öne çıkmasıdır ki, bunun yüksek allokriptopin içeriği ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamız, *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloit bileşenlerinin, özellikle de allokriptopinin ROS inaktivasyonu aracılığıyla nöroprotektif etkilerinin ortaya konulduğu ilk çalışmadır.

Nöral apoptoz, sinir sisteminin gelişiminde bütünleyici bir rol oynayan yüksek düzeyde korunmuş bir hücreölüm mekanizmasıdır ve aynı zamanda NH'lerde nörodejeneratif disaptotik sürecin patogeneğinde yer almaktadır (Erekat, 2018: 65-82; Langley, 2007: 165-182). Bununla birlikte, oksidatif stresin hücreölüm zararları bileşimini, hücreölüm Ca^{+2} homeostazını ve mitokondri fonksiyonunu etkileyerek kaspazları aktive ettiği buna bağlı olarak da nöral apoptozu indüklediği rapor edilmiştir (Coxon ve diğerleri, 2017: 62-72; Xiao ve diğerleri, 2008; Wilkaniec ve diğerleri, 2013). Dolayısıyla, oksidatif stresin neden olduğu apoptozu bloke etmeyi amaçlayan doğal türevli anti-oksidan bileşikler içeren terapötik stratejilerin NH'lerden korunma veya NH'lerin ilerleme sürecini uzatma gibi etkileri olabilir (Liu ve diğerleri, 2014; Marino ve diğerleri, 2022). Bu nedenle, çalışmamızda *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform, metanol ve su alkaloit ekstraktlarının fPC12 hücrelerinde oksidatif stresle indüklenen nöral apoptozu karşı nöroprotektif etkileri araştırılmıştır. Buna göre, H_2O_2 'nin indüklediği nöral apoptozu (%72,2 apoptotik hücre) baskılamada, alkaloit ekstraktları ve uygulanan konsantrasyonlara göre farklı sonuçlar alınmış olmakla birlikte (%23,2-40,7 TAH), kloroform alkaloit ekstraktının metanol ve su alkaloit ekstraktına göre öne çıktığı ve 500 $\mu g/mL$ 'de en yüksek baskılamanın olduğu belirlenmiştir. Allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının yüksek oranda nöral apoptozu baskılaması, bu ekstraktın ve özellikle de allokriptopinin anti-apoptotik bir ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda, alkaloit ekstraktlarının gösterdiği anti-apoptotik etki, hem erken hem de geç apoptoz fazında gözlenmiş olmakla birlikte, genel olarak erken apoptoz fazında daha belirgindir. Xiao ve diğerleri (2008) protopin (bir izokinolin alkaloit) ile yaptıkları bir çalışmada, bu alkaloitin Ca^{+2} ve Na^{+} iyon kanallarını

bloke ederek Ca^{+2} akışını ($\Delta\Psi\text{m}$ 'nin azalmasını indükler) baskıladığını dolayısıyla Ca^{+2} antagonizması aracılığıyla hücrelerin apoptozunu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Ek olarak, protopinin oksidatif hasara indüklenmiş hücrelerde apoptozun erken fazını (başlangıç fazı) $\Delta\Psi\text{m}$ 'ni arttırarak, apoptozun daha sonraki fazını (efektör fazı) ise Kaspaz-3 ekspresyonunu baskılayarak inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Buna bağlı olarak, izokinolin alkaloidlerinden oluşan alkaloid ekstraktlarımız muhtemelen yüksek bir Bcl-2/Bax oranı ve $[\text{Ca}^{+2}]_i$ 'nin azaltılması aracılı yüksek bir $\Delta\Psi\text{m}$ ile apoptozun erken fazını inhibe etmiştir. Ek olarak, alkaloid ekstraktlarının Kaspaz-9/-3 genlerinin ekspresyonunu baskılayarak da apoptozun sonraki fazını inhibe ettiği söylenebilir. Literatürde, nörona özgü mikrotübüle bağlı bir protein olan Tau proteininin hiperfosforilasyonun apoptozun erken bir fazında meydana geldiği bildirilmiştir (Lorío ve diğerleri, 2001). Dolayısıyla, alkaloid ekstraktlarımız yukarıda bildirdiğimiz diğer mekanizmalara ek olarak, Tau proteininin hiperfosforilasyonunu baskılayarak da apoptozun erken fazını inhibe etmede etkili olmuştur. Literatürde, nörodejeneratif bozukluklar için yeni terapötik strateji olarak çok işlevli fitokimyasalların nöroproteksiyonunda, bu fitokimyasalların sahip olduğu anti-apoptotik aktivitelerin etkili olduğu bildirilmiştir (Naoi ve diğerleri, 2019). Özellikle alkaloidlerin, nöronal apoptoza karşı nöroprotektif etkileri bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Sadeghnia, Kolangikhah, Asadpour, Forouzanfar ve Hosseinzadeh, 2017; Yan ve diğerleri, 2011). Liu, Pi, Yang ve Shi (2021c) tarafından *Dendrobium nobile* Lindl.'in alkaloidleri ile yapılan flow sitometrik apoptoz analizinde, PC12 hücrelerinde %18,4 olarak belirlenen apoptotik hücre oranının, alkaloidlerin farklı konsantrasyonları ile %12,2-17,9'a düştüğü gösterilmiştir. Yapılan farklı bir çalışmada ise, Papaveraceae familyasındaki *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers.'in alkaloid ekstraktının PC12 hücrelerinde flow sitometrik olarak belirlenen apoptoz oranını (%78,8) %42,0-68,5'e düşürdüğü raporlanmıştır (Yan ve diğerleri, 2011). Bu çalışmalara göre, çalışmamızda kullanılan alkaloid ekstraktlarının uygulanan konsantrasyonlarının, *D. nobile* Lindl.'in alkaloidleri ve *C. decumbens*'in alkaloid ekstraktı için bildirilenden daha yüksek bir anti-apoptotik etkiye sahip olduğu söylenebilir. Çalışmamızda, flow sitometrik ROS ve apoptoz sonuçlarımıza göre, üç farklı çözücü ile hazırlanan alkaloid ekstraktlarının hücre içi ROS artışı üzerindeki baskılayıcı etkilerinin, apoptozu baskılayıcı etkileri ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca, allokrriptopince zengin kloroform alkaloid ekstraktının hem anti-oksidan aktivite hem de nöral apoptozun baskılanmasında diğer alkaloid ekstraktlarından daha iyi sonuç vermesinde, içerdiği yüksek miktardaki allokrriptopinin etkili olduğunu öngörmekteyiz. Çalışmamız, *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloid bileşenlerinin, özellikle de allokrriptopinin, oksidatif stres indüklü nöral apoptozu inhibe

ederek NH'ler için faydalı bir sitoprotektif ajan olarak kullanılabileceğinin ortaya konulduğu ilk çalışmadır.

Nöral öncü hücreler fizyolojik koşullarda, hücre döngüsünün G1, S, G2 ve M fazlarından geçerek, olgun nöronlara farklılaşır ve nöronlar bir kez terminal olarak farklılaştıklarında, hareketsiz bir G0 durumunda tutulurlar ve artık döngü yapmazlar (Joseph ve diğerleri, 2020; Klein ve Ackerman, 2003). Buna rağmen, nöronların sağlıklı beyinde bile hücre döngüsüne yeniden girebileceği, hücre döngüsündeki G1/S geçişini engelleyen düzenleyici mekanizmalar ile G1 fazının ötesine geçemediği bilinmektedir (Nagy, 2000). Ancak, AH başta olmak üzere NH'li hastalarda G1/S düzenleyici mekanizma işlevsizdir (G1'den S fazına geçişini önleyen G1/S hücre döngüsü kontrol noktasında defektler vardır) ve nöral hücre döngüsünün G2 fazına kadar ilerlemesine izin verilmektedir. Bu aşamadaki nöronlar mitoz (M) geçirme ve hücre döngüsünü tamamlama yeteneğine sahip olmadığından, apoptoz yoluyla ölebilir veya dejenere hale gelebilirler (Song ve diğerleri, 2012; Wang ve diğerleri, 2009). Bununla birlikte, savunmasız nöral popülasyonlarda, hem oksidatif stres hem de hücre döngüsü yeniden girişi bağımsız olarak başlayabilir, ancak her ikisi de NH'lerin patogenezi ve ilerlemesinde etkilidir. Dolayısıyla, NH'lerin patogenezinin net bir şekilde anlaşılması ve terapötik ajanların geliştirilmesi, oksidatif stres ile anormal hücre döngüsü reaktivasyonu patojenik mekanizmaları arasındaki bağlantıların incelenmesini gerektirir (Klein ve Ackerman, 2003; Lee ve diğerleri, 2009b). Bu nedenle, çalışmamızda *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform, metanol ve su alkaloit ekstraktlarının H₂O₂ indüklü apoptotik fPC12 hücrelerinde hücre döngüsünü regüle edici etkileri ve dolayısıyla nöral apoptozu baskılayıcı aracılı nöroprotektif etkileri araştırılmıştır. Sonuçlarımız, H₂O₂ ile oluşan oksidatif stresin fPC12 hücrelerinde G1 fazındaki hücre oranında azalmaya (%46,3; G1 fazındaki hücre), apoptozu temsil eden Sub G1 fazındaki hücre oranında ise artışa (%21,2; Sub G1 fazındaki hücre) neden olduğunu göstermiştir. H₂O₂'nin, programlanmış hücre ölümünü temsil eden Sub G1 DNA içeriğine sahip hücrelerin oranında artışa neden olduğu bildirilmiştir. Yapılan farklı çalışmalarda, H₂O₂'nin 400 ve 500 µM konsantrasyonlarının uygulandığı PC12 hücrelerinde Sub G1 oranları sırasıyla %11,3 ve %13,5 olarak belirlenmiştir (Guan, Bao, Jiang ve An, 2006; Lee, Yoon ve Park, 2008). Bu çalışmalara göre, çalışmamızda kullanılan 24 saat 200 µM H₂O₂ uygulamasının fPC12 hücrelerinde Sub G1 fazındaki hücre oranını daha etkin şekilde arttırdığı söylenebilir. Diğer taraftan, çalışmamızda alkaloit ekstraktları uygulamasının, apoptozu temsil eden Sub G1 fazındaki hücre oranını baskılayarak fPC12 hücrelerini H₂O₂ indüklü apoptoza karşı

koruduğu belirlenmiştir (%3,1-14,0; Sub G1 fazındaki hücre). Ayrıca, alkaloit ekstraktlarının G1 fazındaki hücre oranını attırdığı (%51,1-68,1; G1 fazındaki hücre), bunun da S fazındaki hücre oranının azalmasıyla uyumlu olduğu belirlenmiştir. Buna göre; hem G1 hem de Sub G1 fazındaki değişikliklerde alkaloit ekstraktları ve uygulanan konsantrasyonlara göre farklı sonuçlar alınmış olmakla birlikte, kloroform alkaloit ekstraktının metanol ve su alkaloit ekstraktına göre hücre döngüsü disregülasyonunu baskılamada öne çıktığı ve 500 µg/mL’de en iyi sonucun elde edildiği tespit edilmiştir. Literatürde, hücre döngüsü regülasyonunda G1 fazındaki hücrelerin tutuklanmasının, hücreleri onarım mekanizmalarına yönlendirebileceği ve böylece nöral apoptozu baskılayabileceği bildirilmektedir (Choi ve diğerleri, 2004; Fielder, Von Zglinicki ve Jurk, 2017). Bu bilgilere göre, çalışmamızdaki tüm alkaloit ekstraktları özellikle de allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının, G1/S hücre döngüsünün ilerlemesini düzenleyerek hücrelerin G1 fazında tutuklanmasını sağladığı, buna bağlı olarak da nöral apoptozu baskıladığı söylenebilir. Çalışmalarda, NH’lerde oksidatif stres ilişkili hücre döngüsü sapmalarına karşı anti-oksidan özelliklere sahip fitokimyasalların etkili olduğu bildirilmiştir (Giampieri ve diğerleri, 2015; Wong, Law, Liu ve Wang, 2017). Yapılan bir çalışmada, H₂O₂ ile apoptoza indüklenen PC12 hücrelerinin *Alpinia* (A.) *oxyphylla* MIQUEL (Zingiberaceae)’den elde edilen protokateşik asit ile ön muamelesi, Sub G1 fazındaki apoptotik hücrelerin oranını %8,3’e baskılamıştır (Guan ve diğerleri, 2006). Çalışmamızda kullanılan alkaloit ekstraktlarının fenolik bir bileşik olan protokateşik asit için bildirilene göre Sub G1 fazındaki apoptotik hücreleri baskılamada daha etkili olduğu gözlenmiştir. Bu alanda alkaloitler ile yapılan çalışmalar sınırlı olup, araştırmalar genellikle kanserde alkaloitlerin hücre döngüsünün G1 veya G2/M blokeri özelliğiyle anti-mitotik ilaçlar olarak kullanılması üzerinedir. Bununla birlikte, kullanılan bu alkaloitlerden G1 inhibitörlerinin Tau’yu hiperfosforillemediği, ancak G2/M blokerlerinin özellikle yüksek dozlarda Tau’nun hiperfosforilasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Conejero-Goldberg, Townsend ve Davies; 2008). Bu bilgilere göre, çalışmamızda kullandığımız alkaloit ekstraktlarının hücre döngüsü regülasyonunu özellikle G1 aşamasında yapması, Tau proteininin hiperfosforilasyonuna neden olmayacağının ispatı olup, nörobiyolojik ve nörokimyasal alanlarda güvenli bir şekilde kullanılabilirliğini göstermektedir. Literatürde, Bcl-2’nin anti-oksidan ve anti-apoptotik özelliği aracılığıyla hücre içi ROS’u düşürerek G1/S hücre döngüsü ilerlemesini düzenlediği, diğer taraftan yüksek düzeyde Bax ifadesinin G2 tutuklaması aracılı apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Deng, Gao ve May Jr, 2003; Nagy, 2000). Buna göre, sonuçlarımız flow sitometrik ROS analizi ve apoptozla ilişkili

genlerin ekspresyonlarını incelediğimiz çalışmalarımızdan elde ettiğimiz sonuçlarla tutarlıdır; bu, alkaloit ekstraktlarının, hücre içi ROS seviyesini baskılayarak ve Bcl-2/Bax oranını artırarak hücre döngüsünü regüle edebileceğini gösterir. Çalışmalarda, Tau proteininin agrega olduğu nöronlarda hücre döngüsü belirteçlerinin yeniden oluştuğu, buna bağlı olarak nöronların ölmeden önce anormal bir hücre döngüsünün meydana geldiği bildirilmiştir (Andorfer ve diğerleri, 2005; Nagy, 2000). Çalışmamızda, Tau proteini ile yaptığımız analizlerde alkaloit ekstraktlarının bu proteinin hiperfosforilasyonunu baskıladığı belirlenmiştir. Dolayısıyla, alkaloit ekstraktlarının Tau proteininin hiperfosforilasyonunu baskılayarak da hücre döngüsü regülasyonunu sağladığı söylenebilir. Ayrıca, Tau proteininin hiperfosforilasyonunun altında yatan mekanizmaları hücre döngüsü düzenleyici bileşikleri kullanarak anlamak, hücre döngüsü proteinlerinin yeniden oluşmasının hasarlı nöronlarda neden bu kadar önemli olduğunu anlamaya katkı sağlayabilir. Tüm bu bilgilere göre, alkaloit ekstraktlarının anti-oksidan, hücre döngüsü düzenleyici, anti-Tau ve anti-apoptotik etkilerinin (mitokondriyal yolakla ilişkili) birbiriyle ilişkili olduğu savunulabilir. Ayrıca, diğer çalışmalarımızda olduğu gibi allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının uygulamalarda öne çıkması, kloroform alkaloit ekstraktında yüksek miktarda allokriptopin bulunması ile ilişkilidir. Buna göre, çalışmamız *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloit bileşenlerin, özellikle de allokriptopinin, anti-oksidan, anti-apoptotik ve anti-Tau özelliklere sahip G1/S geçiş inhibitörü dolayısıyla, hücre döngüsü regülasyonunu sağlayıcı aktif maddelerin sentezinde kullanılabileceğini gösteren ilk çalışmadır.

Apoptoz, AH ve PH dahil olmak üzere birçok NH'de baskın nöral ölüm şeklidir ve genler tarafından düzenlenen bir mekanizmadır (Qian ve diğerleri, 2008; Rohn, 2010; Maruyama ve diğerleri, 2002). Nöral ölümün baskın mekanizmasının intrinsik apoptotik yolak olduğu düşünülmektedir; nöronlarda, apoptotik süreci başlatmak için en belirleyici bölge mitokondridir (Erekat, 2018: 65-82; Maruyama ve diğerleri, 2002). Apoptozun başlangıç fazı sırasında ölüm sinyali, oksiradikaller ve Ca^{+2} seviyelerinde artışları, pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin mitokondriyal membrana translokasyonunu içerebilen bir hücre içi olaylar dizisini aktive eder (Mattson, 2000). İntrinsik apoptotik yolda yer alan Bcl-2, hücre sağkalımının sürdürülmesinde etkili iken, Bax apoptozu hızlandırmada etkilidir. Bununla birlikte, Bcl-2 ve Bax'ın, H_2O_2 gibi ROS üreten ajanlar tarafından indüklenen apoptozda rol oynadığı bilinmektedir (Hollville, Romero ve Deshmukh, 2019; Lin ve diğerleri, 2015; Mattson, 2000). Benzer şekilde sistein proteaz ailesi üyelerinden Kaspaz-9 (Mitokondri aracılı yolağa katılan başlatıcı kaspazdır) ve Kaspaz-3 de (Kaspazla aktive olan DNazı aktive

ederek apoptotik DNA parçalanmasına neden olan efektör kaspazdır) H_2O_2 ile aktive olarak apoptotik hücre ölümünde yer alır (Lv ve diğerleri, 2017; Qian ve diğerleri, 2008). Dolayısıyla, serbest radikalleri temizlenmesi, nöronlara Ca^{+2} akışının bloke edilmesi gibi pre-mitokondriyal değişikliklerin hedeflenmesi ve apoptozla ilişkili genlerin modülasyonu nöral apoptoza karşı en etkili terapötik stratejilerden biridir (Ghavami ve diğerleri, 2014; Mattson, 2000; Morén ve diğerleri, 2022a). Bu nedenle, çalışmamızda *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform, metanol ve su alkaloit ekstraktlarının mitokondri aracılı nöral apoptoza karşı nöroprotektif etkileri, alkaloit ekstraktlarının H_2O_2 ile indüklenen fPC12 hücrelerinde apoptozla ilişkili genleri modüle edici etkileri aracılığıyla araştırılmıştır. Sonuçlarımız, H_2O_2 ile muamele edilen hücrelerde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Bax (2,4 kat) ve Kaspaz-9/-3 mRNA ekspresyonunun arttığını (3,5/3,4 kat), Bcl-2 (2,4 kat) mRNA ekspresyonunun ise azaldığını göstermiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarda, H_2O_2 indüklü PC12 hücre apoptozunda sitokrom-c'nin salınmasından önce Bcl-2'nin aşağı, Bax'ın ise yukarı regülasyonunun meydana geldiği ve bunun sonucunda Kaspaz-9/-3'ün aktive edildiği gösterilmiştir (Li ve Li, 2015; Lin ve diğerleri, 2015; Lv ve diğerleri, 2017; Qian ve diğerleri, 2008). Bu çalışmalarla uyumlu olarak, sonuçlarımız, Bcl-2'nin aşağı regülasyonunun veya Bax'ın yukarı regülasyonunun Kaspaz-9/-3'ü aktive ettiğini ve muhtemelen mitokondri aracılı yolak ile fPC12 hücrelerinin apoptozunu indüklediğini göstermektedir. Yapılan bazı çalışmalarda, H_2O_2 'in farklı doz ve süreleri ile muamele edilmiş PC12 hücrelerinde kontrol grubuna göre Bax, Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 mRNA ekspresyonunun 1,4-4,5 kat arttığı, Bcl-2 mRNA ekspresyonunun ise 1,4-1,7 kat azaldığı gösterilmiştir (Feng ve diğerleri, 2021; La ve diğerleri, 2020; Liu ve diğerleri, 2014; Wu ve diğerleri, 2014). Dolayısıyla, sonuçlarımız literatürle uyumludur ve bu çalışmalar fPC12 hücrelerine uyguladığımız H_2O_2 doz ve süresinin, apoptozun indüklenmesinde etkili olduğunun kanıtıdır. Diğer taraftan, çalışmamızda H_2O_2 'nin indüklediği nöral apoptozu baskılamada alkaloit ekstraktları ve uygulanan konsantrasyonlara göre farklı sonuçlar alınmış olmakla birlikte (Bax: 1,2-2,4; Kaspaz-9: 1,2-3,5; Kaspaz-3: 1,4-2,6 kat baskılama, Bcl-2: 1,7-3,0 kat artma), Bcl-2/Bax oranında artışı ve Kaspaz-9/-3 aktivasyonunda ise azalmayı sağlamada kloroform alkaloit ekstraktının metanol ve su alkaloit ekstraktına göre öne çıktığı belirlenmiştir. Alkaloit ekstraktlarının, bu dört genin ekspresyonu üzerinde farklı etkilere sahip olması, çözücülerin farklı polarite özelliklerinden dolayı ekstraktlardaki alkaloit miktarının değişkenliğinden kaynaklanmış olabilir (URL-20). Buna göre çalışmamızda, metanol ve su alkaloit ekstraktlarının apoptozla ilişkili genleri doza bağımlı bir şekilde modüle ettiği, kloroform alkaloit ekstraktının 500 $\mu\text{g/mL}$ dozunun Bcl-2/Bax

oranında artış ve Kaspaz-3 seviyesinde azalmada etkili olduğu, ancak bu etkinin 250 µg/mL doza kıyasla artmadığı tespit edilmiştir. Bu durum, optimal dozun kloroform alkaloid ekstraktı için 250 µg/mL, metanol ve su alkaloid ekstraktı için 500 µg/mL olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde, alkaloidlerin nöronal apoptoza karşı nöroprotektif etkisinin, pro-apoptotik genlerin/proteinlerin ekspresyonunun baskılanması ve anti-apoptotik genlerin/proteinlerin ekspresyonunun arttırılmasıyla gerçekleştirildiği rapor edilmiştir (Sadeghnia ve diğerleri, 2017; Yan ve diğerleri, 2011). Xiao ve diğerleri (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, alkaloidlerin H₂O₂ ile indüklenen Kaspaz-3 ekspresyonunu ve hücre apoptozunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Rad, Eidi, Minai-Tehrani, Bonakdar ve Shoeibi (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, SH-SY5Y hücreleri ve H₂O₂ kullanılarak oluşturulan *in vitro* AH modelinde *Berberis vulgaris* (barberry)'nin kök ekstraktı ve ekstrakttaki majör alkaloid olan berberin kullanılmış olup, hem ekstrakt hem de berberinin Bcl-2 aile üyelerinin ekspresyonlarını düzenleyerek mitokondri aracılı apoptozu baskılayabileceği gösterilmiştir. Benzer şekilde, sonuçlarımız alkaloid ekstraktlarının, mitokondriyal apoptotik yolağı bloke ederek fPC12 hücrelerini oksidatif hasardan koruyabildiğini göstermiştir. Sonuçlarımız, flow sitometrik apoptoz analizi sonuçlarımızla uyumlu olarak, apoptozun erken evresinde (başlangıç fazı) daha etkili olan alkaloid ekstraktlarının bu etkilerinin Bax ve Bcl-2 ekspresyonunun modülasyonu ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. Ayrıca, alkaloid ekstraktlarının Kaspaz-9/-3 genlerinin aşağı regülasyonu ile de apoptozun sonraki aşamasını (efektör fazı) engelleyebileceği düşünülmektedir (Feng ve diğerleri, 2013; Kim ve diğerleri, 2010b; Mattson, 2000; Yan ve diğerleri, 2011). Xiao ve diğerleri (2008) protopin ile yaptıkları bir çalışmada, bu alkaloidin Ca⁺² kanallarını bloke ederek Ca⁺² akışını ΔΨ_m'nin azalmasını indükler) baskıladığını dolayısıyla, Ca⁺² antagonizması aracılığıyla hücrelerin apoptozunu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Aşırı ROS, mitokondriyal disfonksiyonu indükleyerek Ca⁺² homeostazını bozar, apoptotik yolları aktive eder (Moh ve diğerleri, 2011). Bu bilgilere göre, flow sitometrik ROS analizi ve hücrel Ca⁺² homeostazı sonuçlarımızla tutarlı olarak alkaloid ekstraktlarının, hücrel ROS seviyelerini baskılayarak ve hücre içi Ca⁺² homeostazını sağlayarak hücredeki aşırı ROS ve Ca⁺² seviyelerinin neden olduğu apoptozla ilişkili genlerdeki değişiklikleri modüle ettiği söylenebilir. Çalışmamızda, diğer uygulamalarımızda olduğu gibi allokrriptopince zengin kloroform alkaloid ekstraktının apoptozu baskılamada daha etkin olmasında içerdiği yüksek miktardaki allokrriptopinin etkisi olabilir. Çalışmamız, *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloid bileşenlerinin, özellikle allokrriptopinin anti-apoptotik etkisinin, apoptozla ilişkili genlerin (mitokondriyal apoptotik yoldaki genlerin)

ekspresyonu üzerindeki regüle edici etkileri ile ilişkili olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Bu nedenle çalışmamız, allokrıptopinin mitokondriyal apoptozu bloke etme özelliğinden dolayı nöroprotektif ve/veya terapötik etkinliğinin, NH'ler için farmakolojik bir temel sağlayabileceğini göstermektedir.

Nöronlarda, hücre içi serbest Ca^{+2} konsantrasyonu, beyindeki karmaşık sinyal rollerini yerine getirir (Zündorf ve Reiser, 2011). Bununla birlikte, patolojik koşullar altında, proteazların, lipazların ve nükleazların aktivasyonuna yol açan artan sitoplazmik Ca^{+2} konsantrasyonları ile Ca^{+2} homeostazı değişir (Ureshino ve diğerleri, 2019). Nöronlar, Ca^{+2} konsantrasyonu seviyelerine son derece duyarlıdır ve Ca^{+2} homeostazındaki minimal değişiklikler bile yıkıcı sonuçlara yol açabilir ve normal nöral aktiviteyi değiştirebilir (Pchitskaya ve diğerleri, 2018). Buna göre, $[Ca^{+2}]_i$ 'deki düzensizlik, NH'lerde hücre ölümünden sorumlu mekanizmalar arasında yer almaktadır (Pchitskaya ve diğerleri, 2018; Zhivotovsky ve Orrenius, 2010). Bununla birlikte, AH hücrelerinde farklı türde Ca^{+2} bozulmaları bildirilmiş olsa da, hem amiloid hem de Tau hipotezleri, AH için ana nedensel faktörler olarak tanımlanmıştır. $A\beta$ 'yı hedef alan ilaçlar ise, çoğunlukla başarısız olmuştur ve Ca^{+2} dishomeostazı, plakların ve düğümlerin birikmesinden önce meydana gelebilir (Tong ve diğerleri, 2018). Dolayısıyla, Ca^{+2} homeostazının regüle edilmesi, AH başta olmak üzere NH'lerin önlenmesi ve/veya tedavisi için ilaç keşfinde ilgi çekici bir hedeftir (Pchitskaya ve diğerleri, 2018; Tong ve diğerleri, 2018). Bu nedenle, çalışmamızda *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform alkaloit ekstraktının fPC12 hücrelerinde H_2O_2 ile artan $[Ca^{+2}]_i$ 'yi baskılayıcı, dolayısıyla Ca^{+2} homeostazını regüle edici etkisi araştırılmıştır. Sonuçlarımız, H_2O_2 ile muamele edilen hücrelerde, $[Ca^{+2}]_i$ 'nin kontrol grubuna göre 3,7 kat arttığını göstermiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarda, H_2O_2 'nin hücrel membran depolarizasyonuna ve sonrasında çeşitli iyon kanallarından (Ca^{+2} ve Na^+ kanalları) $[Ca^{+2}]_i$ 'nunda artışa yol açtığı gösterilmiştir. Hücre içi Ca^{+2} 'nin belirgin şekilde yükselmesi ise, farklı bozunma süreçlerini (ROS oluşumu gibi) ve mitokondriyal zar potansiyelinin azalmasını tetikler. Bu durum, sırasıyla sitokrom-c'nin salınmasına, Kaspaz-9 ve ardından Kaspaz-3'ün aktive olmasına ve son olarak hücre apoptoz sürecine aracılık eden bir dizi proteinin proteolitik bölünmesine yol açar (Feng ve diğerleri, 2013; Xiao ve diğerleri, 2008). Bu görüşlerle uyumlu olarak, sonuçlarımız H_2O_2 'nin fPC12 hücrelerinde hücre içi Ca^{+2} seviyesinde artışa neden olarak mitokondriyal apoptozu indüklediğini göstermektedir. Yapılan bazı çalışmalarda, farklı hasar verici ajan ve süreler ile muamele edilmiş PC12 hücrelerinde kontrol grubuna göre, $[Ca^{+2}]_i$ 'nin ~1,3-4,4 kat arttığı gösterilmiştir (He ve

diğerleri, 2020; Xiao ve diğerleri, 2008). Dolayısıyla, sonuçlarımız literatürle uyumludur ve bu çalışmalar fPC12 hücrelerine uyguladığımız H_2O_2 ajanı ve süresinin, $[Ca^{+2}]_i$ 'nin artışında etkili olduğunun kanıtıdır. Diğer taraftan, çalışmamızda kloroform alkaloid ekstraktı uygulamasının, artan $[Ca^{+2}]_i$ 'nu baskılayarak fPC12 hücrelerinde Ca^{+2} homeostazını regüle ettiği belirlenmiş olup, en iyi sonuç 500 $\mu g/mL$ 'lik uygulamadan elde edilmiştir (H_2O_2 uygulanmış gruba göre 3,4 kat). Literatürde, alkaloidlerin oksidatif stres sonrası artan hücre içi Ca^{+2} miktarını azalttığı dolayısıyla hücreyi etkin bir şekilde koruduğu bildirilmiştir (Ansari ve Khodaghali, 2013; Xiao, Liu, Hu, Li ve Zhang, 2007; Xiao ve diğerleri, 2008). Xiao ve diğerleri (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, PC12 hücreleri ve H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif stres kaynaklı hasarın *in vitro* modelinde, bir izokinolin alkaloidi olan protopin kullanılmış olup, protopinin doğrudan Ca^{+2} ve Na^+ kanallarını bloke ederek Ca^{+2} akışını önlediği ve Ca^{+2} antagonizmi yoluyla PC12 hücre apoptozunu inhibe ettiği rapor edilmiştir. Benzer şekilde, sonuçlarımız kloroform alkaloid ekstraktının, artan $[Ca^{+2}]_i$ 'nin baskılayarak mitokondriyal apoptotik yolağı bloke ettiği, böylece fPC12 hücrelerini oksidatif hasardan koruyabildiğini göstermiştir. Literatürde, Ca^{+2} sinyal yollarının, ROS gibi diğer hücresel sinyal sistemleri ile etkileşime girdiği bildirilmektedir. Burada, ROS hücresel Ca^{+2} sinyalini düzenleyebilirken, Ca^{+2} sinyali ROS üretimi için gereklidir. Böylece artan Ca^{+2} seviyeleri, ROS üreten enzimleri ve serbest radikal oluşumunu aktive eder. Şimdiye kadar, bu etkileşim esas olarak, ROS ve Ca^{+2} sinyallerinin, kardiyak uyarım-kasılma bağlantısının yapısal ve işlevsel birimleri olan ikililerde birleştiği kardiyovasküler sistemde çalışılmıştır. Artan kanıtlar, bu karşılıklı etkileşimin, AH ve PH gibi NH'ler, inflamatuvar hastalıklar ve aynı zamanda kanser de dahil olmak üzere diğer sistemlerde de birçok patofizyolojik durumda önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Chaudhari, Talwar, Parimisetty, Lefebvre d'Hellencourt ve Ravanan, 2014; Chinopoulos ve Adam-Vizi, 2006; Gordeeva ve diğerleri, 2003; Raturi, Ortiz-Sandoval ve Simmen, 2014; Sharma ve Nehru, 2015; Zaidi, 2010). Buna göre, çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar, flow sitometrik ROS analizi sonuçlarımızı doğrulamakta olup, artan $[Ca^{+2}]_i$ 'nin artan hücre içi ROS seviyesi ile ilişkili olduğunu ve kloroform alkaloid ekstraktının hem artan $[Ca^{+2}]_i$ 'nu hem de hücre içi ROS seviyesini baskıladığını göstermiştir. Dolayısıyla, çalışmamız *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloid bileşenlerinin, özellikle allokriptopinin sadece NH'lerde değil, hücre içi Ca^{+2} homeostazının önemli olduğu diğer hastalıklarda da etkili olabileceğini göstermektedir. Ayrıca çalışmamız, bu bileşiklerin özellikle de allokriptopinin hücre içi Ca^{+2} homeostazını regüle edici özellikleriyle ilişkili olarak NH'lerde nöroproteksiyon ve/veya tedavide etkili

olabilecek yeni terapötik ajanların geliştirilmesinde kullanılabileceğini gösteren ilk çalışmadır.

Nöronlar, fonksiyonları için belirli bölmelerde Ca^{+2} konsantrasyonunun son derece hassas kontrolüne ihtiyaç duyar (Pchitskaya ve diğerleri, 2018). Hem plazma zarında hem de mitokondri ve ER zarlarında G proteinine bağlı reseptörler, iyon kanalları, Ca^{+2} bağlayıcı proteinler, transkripsiyonel ağlar ve iyon değiştiriciler gibi çok çeşitli kontrol noktaları Ca^{+2} 'yı kontrol eder (Zündorf ve Reiser, 2011). Diğer taraftan, oksidatif disfonksiyon, nöronal hücre potansiyelini düşürerek, Ca^{+2} kontrol noktalarından olan VGCC'lerin açılmasına neden olur. VGCC'lerin açılması, hücre içindeki ve dışındaki Ca^{+2} konsantrasyonundaki farklılık nedeniyle hücre içi Ca^{+2} 'da büyük bir artışa yol açar. Bu, mitokondri ve ER'deki hücre içi Ca^{+2} depolarını zorlayabilir. Yükselmiş mitokondriyal Ca^{+2} , mtPTP'nin açılmasına, ardından sitokrom-c'nin salınmasına ve apoptozun indüklenmesine yol açabilir (Baev ve diğerleri, 2022). Özellikle, L-tipi VGCC'lerde meydana gelen bu aktivasyon, yaşlanan nöronlar ve NH'lerdeki baskın değişiklikler arasındadır. Dolayısıyla, L-tipi Ca^{+2} kanal blokerlerinin, 'hastalığın başlamasını geciktiren' terapiler geliştirmek için, NH'lere özgü diğer terapötik yaklaşımlarla kombinasyon halinde kullanılması gündemdedir (Bezprozvanny, 2009). Bu nedenle, çalışmamızda *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform alkaloit ekstraktının, fPC12 hücrelerinde H_2O_2 ile aktive edilen L-tipi VGCC alt tiplerinden olan $Ca_v1.2$ ve $Ca_v1.3$ 'ü hem gen hem de protein düzeyinde baskılayıcı etkisi ve buna bağlı olarak L-tipi Ca^{+2} kanal blokeri olma potansiyeli araştırılmıştır. Sonuçlarımız, H_2O_2 ile muamele edilen hücrelerde, $Ca_v1.2$ ve $Ca_v1.3$ 'ün kontrol grubuna göre gen (sırasıyla 3,6 ve 2,5 kat) ve protein düzeyinde arttığını (sırasıyla 2,61 ve 2,10 kat) göstermiştir. Yapılan bir çalışmada, H_2O_2 'nin çoklu VGCC'ler yoluyla nükleus traktus solitarii (nTS) nöronlarındaki sitozolik Ca^{+2} seviyesini arttırdığı bildirilmiştir (Ostrowski, Dantzler, Polo-Parada ve Kline, 2017). $A\beta_{25-35}$ ile muamele edilen hipokampal nöronların kullanıldığı ve PC12 hücrelerinde hipoksi ortamının oluşturulduğu iki ayrı çalışmada, $Ca_v1.2$ ve $Ca_v1.3$ mRNA ekspresyon seviyesi kontrole göre sırasıyla 1,2-1,6 ve 1,1-2,0 kat artış gösterirken, protein ekspresyonu sırasıyla ~1,5-1,8 ve 1,2-2,7 kat artış göstermiştir (Kim ve Rhim, 2011; Li ve diğerleri, 2015b). Bu çalışmalar, çalışmamızda kullandığımız H_2O_2 'nin etkili bir şekilde L-tipi VGCC'lerin aktivasyonunu sağladığının ispatıdır. Diğer taraftan, çalışmamızda kloroform alkaloit ekstraktı uygulamasının $Ca_v1.2$ ve $Ca_v1.3$ 'ü gen (H_2O_2 uygulanmış gruba göre sırasıyla 2,5 ve 2,4 kat) ve protein düzeyinde (H_2O_2 uygulanmış gruba göre sırasıyla 2,4 ve 1,9 kat) baskılandığı gözlenmiş olup, en iyi sonuç $Ca_v1.2$ için 500

$\mu\text{g/mL}$ 'lik, $\text{Ca}_v1.3$ için ise $250 \mu\text{g/mL}$ 'lik uygulamadan elde edilmiştir. Literatürde, çeşitli alkaloidlerin (protopin ve berberin) içerisinde Ca^{+2} kanallarının da yer aldığı bazı iyon kanallarını doğrudan bloke ederek iyon akışını inhibe ettiği rapor edilmiştir (Sadeghnia ve diğerleri, 2017; Xiao ve diğerleri, 2008). Sadeghnia ve diğerleri (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, berberin alkaloidinin PC12 ve N2a nöronal hücrelerinde glutamat-indüklü oksidatif stres ve nöronal apoptoz üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir ve bu etki berberinin L-tipi Ca^{+2} kanal bloklayıcı etkisi ile ilişkilendirilmiştir. Frangieh ve diğerleri (2022) tarafından yapılan bir çalışmada ise, $\text{Ca}_v1.2$ ve $\text{Ca}_v1.3$ 'ü ifade eden sıçan hipofiz GH3b6 hücre hattı kullanılmış olup, farklı ajanlarla aktive edilen bu L-tipi VGCC izoformları 3 farklı izokinolin alkaloidi (okzotefanin, talmikulin ve talifilin) tarafından inhibe edilmiştir. Benzer şekilde çalışmamızda, *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform alkaloid ekstraktının (Üç farklı izokinolin alkaloid içermektedir.) L-tipi VGCC alt tiplerinden olan $\text{Ca}_v1.2$ ve $\text{Ca}_v1.3$ 'ü hem gen hem de protein düzeyinde baskıladığı belirlenmiştir. Çalışmamızda bu etkinin gen ve protein düzeyinde birbiri ile paralellik gösterdiği de dikkati çekmiştir. Kloroform alkaloid ekstraktımızda majör alkaloid olan allokriptopin ile yapılan çalışmalarda ise, bu alkaloidin özellikle kardiyolojik ve ileum araştırmalarında öne çıktığı ve Ca^{+2} konsantrasyonunu modüle edici etkiye sahip olduğu görülmüştür (Abu-Ghalyun ve diğerleri, 1997; Xu ve diğerleri, 2015). Fare kardiyomiyositleri ile yapılan bir çalışmada, allokriptopinin L-tipi Ca^{+2} kanal akımını azaltarak, indüklenmiş aritmiyi baskıladığı rapor edilmiştir (Xu ve diğerleri, 2015). Dolayısıyla, allokriptopinin farklı çalışmalarda L-tipi Ca^{+2} kanal blokeri olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, *in vitro* NH modeli ve bu modelde rol oynayan $\text{Ca}_v1.2$ ve $\text{Ca}_v1.3$ alt tiplerinin ekspresyonu üzerinde baskılayıcı etkisi daha önce çalışılmamıştır. Çalışmamız *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloid bileşenlerinin, özellikle allokriptopinin L-tipi Ca^{+2} kanal blokeri olma potansiyelinin ve dolayısıyla nöral Ca^{+2} homeostazının regülasyonu aracılı nöroprotektif etkisinin ortaya konulduğu ilk çalışmadır. Bu çalışma ile L-tipi Ca^{+2} kanal proteinleri üzerinde bloker etkisi olan etken bir maddenin, NH'lerin önlenmesi ve/veya tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir. Dolayısıyla, nörolojik ve kardiyovasküler hastalıklarda terapötik hedefler olan L-tipi VGCC'ler üzerinde, allokriptopinin nörolojik olarak etkinliğinin ortaya konulması çalışmamızı önemli ve özgün kılmaktadır. Literatürde, Ca^{+2} kanal blokerlerinin AH hastalarının hem erken hem de geç fazlarında faydalı olduğu, özellikle kapsamlı kanıtlara sahip L-tipi VGCC blokerlerinin, muhtemelen bilişsel güçlendiriciler olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Saravanaraman ve diğerleri, 2014). Bu bilgilere göre, birçok farklı mekanizmada etkili kloroform alkaloid ekstraktının, L-tipi Ca^{+2} kanal blokeri olarak

kullanımı önerilebilir. Ancak, bu bileşenleri nootropik olarak veya AH'de önleyici bir tedavi olarak uygulamak için bunun arkasındaki mekanizma ve/veya mekanizmalar araştırılmalıdır. Nimodipin ve diğer Ca^{+2} antagonistleri, demans için yapılan klinik deneylerde test edilmiştir ve bazıları bilişsel gerilemeyi azaltmada etkilidir. Ancak bu ilaçlarda, tatmin edici bir genel etkinin olmaması, fizyokimyasal özelliklerin iyileştirilmiş yeni ilaç adaylarına ihtiyacı gerektirmektedir. Mevcuttaki Ca^{+2} kanal blokerleri, öncelikli olarak demans dışındaki hastalıklar için tasarlanmış ve düz kas hücrelerinde fonksiyonel aktivite için seçilmiştir. Bu nedenle, pre-sinaptik Ca^{+2} kanalları için daha iyi bir seçicilik, sistemik yan etkileri önleyebilir ve daha yüksek doza izin verebilir. Ayrıca, tercihen kanalın inaktive edilmiş durumuna bağlanan ve böylece eksitotoksik süreçler sırasında patolojik olarak aşırı aktif sinapsları hedef alan iyon kanalı bloke edicileri geliştirmek de teknolojinin gündemindedir (Nimmrich ve Eckert, 2013). Bu anlamda da, elde ettiğimiz sonuçlara göre, alkaloit bileşenlerinin, özellikle allokriptopinin yeni Ca^{+2} kanal blokeri geliştirilmesinde kullanılmasını bu çalışma ile gündeme getirmekteyiz.

Bir Ser/Thr protein kinaz ailesi olan MAPK'ler; hücre büyümesi, farklılaşması, inflamasyonu ve hücre ölümü dahil olmak üzere birçok hücresel süreçte yer alır. MAPK'ler, sinyal iletim yollarındaki anahtar kinazlardır ve her bir ana MAPK alt ailesinin (ERK1/2, JNK ve p38) üyeleri, nöronal hasar ve hastalıkla ilişkilendirilmiştir. MAPK'lerin fosforile edilmemiş formları neredeyse inaktiftir ve fosforilasyon aktivitelerini uyarır. JNK, ERK1/2 ve/veya p38'in oksidatif stresle indüklenen ROS aktivasyonu, çeşitli hücre tiplerinde gösterilmiştir ve MAPK kaskadının ROS aktivasyonu, oksidatif stresin nöronal hücre ölümüne veya NH'lere neden olduğu ortak bir mekanizmadır (Qi, Feng, Li, Qi ve Zhang, 2018; Zhao ve diğerleri, 2013). Dolayısıyla, MAPK sinyal yollarının ROS'a bağımlı aktivasyonunu inhibe ederek apoptozu bloke etmeyi amaçlayan terapötik stratejiler, bu hastalıkların tedavisi için etkili olabilir (Lin ve diğerleri, 2016; Liu ve diğerleri, 2014). Bu nedenle, çalışmamızda *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform alkaloit ekstraktının, fPC12 hücrelerinde H_2O_2 ile artmış p-ERK1/2/t-ERK1/2, p-JNK/t-JNK ve p-p38/t-p38 protein oranını azaltıcı ve buna bağlı olarak MAPK sinyal yollarını inhibe edici etkisi araştırılmıştır. Sonuçlarımız, H_2O_2 ile muamele edilen hücrelerde, kontrol grubuna göre p-ERK1/2, p-JNK ve p-p38 MAPK aktivasyon seviyelerinin sırasıyla 2,64; 2,96 ve 2,41 kat arttığını göstermiştir. Literatürdeki birçok çalışma, H_2O_2 kaynaklı oksidatif stresin, MAPK yollarının aktivasyonu yoluyla apoptozu tetikleyebileceğini göstermiştir. PC12 ve SH-SY5Y hücreleri ile H_2O_2 'in farklı doz ve sürelerinin kullanıldığı çalışmalarda genel olarak,

p-ERK1/2, p-JNK ve p-p38 MAPK protein seviyesinde kontrole göre sırasıyla ~1,3-4,4; 1,2-13 ve 1,3-5 kat artış olduğu belirlenmiştir (Lee, Lee ve Choi, 2017; Liu ve diğerleri, 2014; Nakajima, Nishida, Nakamura ve Konishi, 2009; Qi ve diğerleri, 2018). Bu bulgulara dayanarak, çalışmamızda kullanılan 24 saat 200 μ M H₂O₂'nin, p-ERK ve p-JNK aktivasyonunu uyarmada Nakajima ve diğerleri (2009) ve Qi ve diğerleri (2018)'nin, p38 MAPK aktivasyonunu uyarmada ise Nakajima ve diğerleri (2009)'un yaptıkları çalışmalara göre daha etkili olduğu söylenebilir. Diğer taraftan, çalışmamızda kloroform alkaloid ekstraktı uygulamasının MAPK sinyal yolağının aktivasyonunu baskıladığı gösterilmiş olup, en iyi sonuç 500 μ g/mL'lik uygulamadan elde edilmiştir (H₂O₂ uygulanmış gruba göre sırasıyla 2,4; 2,7 ve 2,2 kat). Yapılan çalışmalarda bitkilerden elde edilen bazı alkaloidlerin mikrogliya hücrelerinde A β ile artan p38 ve ERK MAPK sinyal yollarını inhibe ettiği, lipopolisakkarit (LPS)'nin indüklediği mikrogliya hücrelerinde ise p38 MAPK ve ROS üretiminin aktivasyonunu inhibe ettiği, böylece nöroinflamasyonu baskıladığı bildirilmiştir (Dang ve diğerleri, 2023; Seo, Fischer ve Efferth, 2018). İçeriğinde flavonoid, sapogenin, saponin ve triterpenoid bulunan çeşitli bitki ekstraktları ile yapılan çalışmalarda, ERK, JNK ve p38 MAPK'nin fosforilasyon seviyesinin kontrole göre sırasıyla ~1,2-2,1 kat; 1,3-2,8; 1,3-3,9 kat baskılandığı gösterilmiştir (Lin ve diğerleri, 2016; Liu ve diğerleri, 2014; Lee ve diğerleri, 2017). Bu çalışmalara göre, çalışmamızda kullandığımız kloroform alkaloid ekstraktının hasar verici ajanla muamele sonucu aktive olmuş MAPK sinyal yolları proteinlerinden özellikle p-ERK ve p-JNK üzerinde daha etkili olduğu, p38 MAPK üzerinde de, Lee ve diğerleri (2017) tarafından *Melandryum firmum* Rohrbach (Caryophyllaceae) ekstraktı için belirtilenden daha yüksek baskılama gösterdiği söylenebilir. Literatürde, hücre proliferasyonu ve apoptozun düzenlenmesinin, ERK1/2 tarafından iletilen pro-apoptotik ve anti-apoptotik sinyallerin dengesine, kapsamına ve süresine bağlı olduğu bildirilmiştir. Buna göre; ERK1/2 genellikle hücre sağkalımı ile ilişkili olsa da, oksidatif stres tarafından indüklenen uzun süreli ERK aktivasyonu nöral hücre ölümüne neden olur (Song ve diğerleri, 2016). JNK yolağı hücre stres sinyallerine yanıtın yanı sıra, doku homeostazını korumak için kritik olan gelişim ve yetişkinlik sırasında bir dizi hayati düzenleyici mekanizmaya (apoptozun düzenlenmesi vb.) dahil olur. Yaşlanma, yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi, oksidatif stres, inflamasyon ve hipoksi, hücre homeostazını değiştiren ve dengeyi hücrelerin dejenere olma eğiliminde olduğu stresli bir duruma indükleyen uyarılarla, hücreler nörodejenerasyona uğrar. MSS'de ifade edilen majör izoform olan JNK3, bu bağlamda nöral hücre dejenerasyonuna ve sinaps disfonksiyonuna neden olur (de los Reyes Corrales ve diğerleri, 2021). p38 MAPK yolağı ise, hücre gelişmesi, hücre siklusu, hücre ölümü, hücre

farklılaşması ve inflamasyonu da içeren çeşitli hücrel yanıtla yol açabilen ve büyüme faktörleri, ısı şoku, pro-inflamatuar sitokinler ve oksidatif stres dahil çeşitli ekstraselüler uyaranlar tarafından aktive edilmekte ve özellikle kronik inflamasyona neden olarak nöral ölümü indüklemektedir (Kim ve Choi, 2010; Lee ve Kim, 2017). Bu bilgilere göre; çalışmamızda kloroform alkaloit ekstraktının, H₂O₂ ajanının oluşturduğu ERK, JNK ve p38 MAPK proteinlerinin fosforilasyon seviyesindeki artışı baskılayarak, p-ERK1/2/t-ERK1/2, p-JNK/t-JNK ve p-p38/t-p38 MAPK oranını azalttığı, böylece fPC12 hücrelerini nöral apoptoza karşı korumada etkin olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalarda elde edilen kanıtlar, MAPK'lerin, AH patolojisinin hemen hemen tüm yönlerinde, oksidatif streten nöroinflamasyona, glikasyon ürünü sinyallemeinden nöronal plastisiteye ve glutamat toksisitesinden otofaji ve apoptoza kadar şaşırtıcı bir şekilde ortaya çıktığını göstermektedir (Kheiri, Dolatshahi, Rahmani ve Rezaei, 2018). Bunlardan, Ras-ERK sinyalinin, AH beyinlerinde Tau hiperfosforilasyonunu indüklediğini ve Ras-MAPK aktivasyonunun inhibisyonunun ise, Tau hiperfosforilasyonunu ve ayrıca nöronal hücre döngüsü girişini önlediği rapor edilmiştir (Kirouac ve diğerleri, 2017). AH'de JNK'nin, kortikal nöronların apoptozu için gerekli olan anti-apoptotik Bcl-2 genlerinin ekspresyonunu azalttığı; sinaps kaybına, A β birikimine ve Tau'nun fosforilasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (de los Reyes Corrales ve diğerleri, 2021). Benzer şekilde AH'de p38 MAPK ile aktif mikroglia ve astrosit kaynaklı nöroinflamasyon aracılığıyla fosforile olan Tau ilişkilidir. Ayrıca p38 MAPK, A β aracılı nöron toksisiteleri sürecinde de etkilidir (Lee ve Kim, 2017). Diğer taraftan MAPK'nin Tau'yu doğrudan fosforile edemeyeceği, bunun yerine L-tipi VGCC'yi aktive ederek, diğer Ca⁺² bağımlı kinazlar tarafından Tau fosforilasyonunu indükleyebileceğine dair bilgiler de rapor edilmiştir (Ekinci ve diğerleri, 1999). Bu bilgilere göre, nöral ölüm sinyal yollarında yer alan proteinleri de incelediğimiz çalışmamızda, kloroform alkaloit ekstraktının Tau proteinin Akt/GSK-3 β sinyal yolağı aracılı fosforilasyonunun baskılanmasında her üç MAPK sinyal yolağının inhibe edilmesinin etkili olduğu söylenebilir. Ayrıca, kloroform alkaloit ekstraktının MAPK sinyal yollarını inhibe edici etkisinin altında yatan mekanizmanın L-tipi VGCC'nin blokajı acılı hücre içi Ca⁺² homeostazı olduğu düşünülmektedir ve bu durum oldukça dikkat çekicidir. Ek olarak, elde edilen bu bulgular kloroform alkaloit ekstraktının NH'lere neden olan nöroinflamasyon mekanizması üzerinde de etkili olabileceğini göstermiştir. Bu öngörümüz, TÜBİTAK 1001 116S299 No'lu proje kapsamında yapılan LPS ile inflamasyon oluşturulmuş mikroglia hücre hattı (BV-2)'de kloroform alkaloit ekstraktından elde edilen sonuçlar ile de desteklenmiştir. Yapılan literatür araştırmalarında allokrriptopin ile MAPK sinyal yollarındaki proteinlerin

fosforilasyonunun azaltıldığı çalışmaya rastlanmamıştır. Buna göre, çalışmamız *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloid bileşenlerinin, özellikle allokrriptopinin ERK1/2, JNK ve p38 proteinlerinin fosforilasyonunu baskılayarak, dikkate değer nöroprotektif etkisinin ortaya konulduğu ilk çalışmadır. Bu çalışma sonuçları ile NH'lerin önlenmesi ve/veya tedavisinde kullanılabilecek anti-nöroinflamatuvar özelliğe sahip yeni bir MAPK (p-ERK1/2, p-JNK ve p-p38) inhibitörü etken maddelerin tanımlanması gündeme gelebilecektir.

Akt proteini, nöral ölüm mekanizmalarında etkisi kanıtlanmış bir protein olup, PI3K tarafından fosforile edilerek aktive olur (Beaulieu, 2012; Şahin ve diğerleri, 2014). Aktif hale gelen Akt (p-Akt), GSK-3 β , Bax, Bad ve Kaspaz-9 gibi birçok pro-apoptotik proteinleri fosforile ederek inaktive eder. Aynı zamanda Bcl-2, Bcl-X_L gibi anti-apoptotik proteinlerin ifadesini indükleyerek apoptozun inhibisyonunu sağlar, dolayısıyla p-Akt hücreyi ölümünden korur (Mitsiades ve diğerleri, 2002). Diğer taraftan Akt seviyesindeki artışın, AH'deki hiperfosforile Tau (NFY'lerin ana bileşeni) düzeylerinde önemli bir artışa neden olduğu rapor edilmiştir (Pei ve diğerleri, 2003). Bu nedenle, PI3K yolağı Tau fosforilasyonunun baskılanmasında önemlidir. Buna göre, PI3K Tau proteinini fosforile eden GSK-3 β 'yı Ser 9 rezidüsünden fosforile ederek inaktive eden Akt'yi aktive eder (Meydani, Hernandez-Rodriguez, Youdim ve Gutierrez-Robledo, 2001; Yao ve diğerleri, 2016). Dolayısıyla, Akt aktivasyonu NH'lerde terapötik bir rol oynayabilir (Cheng ve diğerleri, 2013; Deng, Xu, Duan, Zhang ve Wang, 2005). Bu nedenle, çalışmamızda *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform alkaloid ekstraktının fPC12 hücrelerinde H₂O₂ ile azalmış p-Akt/t-Akt protein oranını artırıcı ve buna bağlı olarak nöral ölüm yolları üzerindeki baskılayıcı etkisi araştırılmıştır. Sonuçlarımız, H₂O₂ ile muamele edilen hücrelerde, p-Akt protein seviyesinin kontrolden 0,31'e baskılandığını göstermiştir. Ayrıca, H₂O₂'nin ve tüm deney gruplarının t-Akt protein seviyesinde kontrole göre anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir. Literatürde, p-Akt seviyesinin H₂O₂ ile azalmasının, AH'de hiperfosforile Tau düzeylerindeki artıştan sorumlu olduğu bildirilmiştir (Kim ve diğerleri, 2011; Pei ve diğerleri, 2003). Bu nedenle, çalışmamızda yukarıda sonuçlarını verdiğimiz çalışma öncesinde p-Akt protein seviyesinin azalışında etkin olabilecek H₂O₂ konsantrasyon denemeleri (100-400 μ M) yapılmış olup, en iyi sonuç 200 μ M'lık uygulamadan elde edilmiştir. PC12 hücreleri ve farklı hasar verici ajanların kullanıldığı çalışmalarda genel olarak p-Akt protein seviyesi kontrolün ~0,13-0,5 katı arasında tespit edilmiştir (Huang ve diğerleri, 2017; Jiang ve diğerleri, 2016a; Jing ve diğerleri, 2017; Lee ve diğerleri, 2009a; Xian ve diğerleri, 2013). Bu bulgulara dayanarak, çalışmamızda kullanılan 24 saat 200 μ M

H₂O₂'nin, Xian ve diğerkleri (2013) A β ile, Huang ve diğerkleri (2017) alüminyum maltolat ile ve Lee ve diğerkleri (2009a) 100 μ M H₂O₂ ile yapılan uygulamalarına göre fPC12 hücrelerinde p-Akt protein seviyesini daha etkin şekilde azalttığı söylenebilir. Çalışmamızda, NH modeli ile yapılan uygulamalar öncesinde kloroform alkaloit ekstraktının (250 ve 500 μ g/mL) tek başına p-Akt protein seviyesi üzerine etkisi incelenmiş olup, bu konsantrasyonların Akt proteininin defosforilasyonunu ve inaktivasyonunu indüklediği buna bağlı nöral hücre ölümüne neden olmadığı belirlenmiştir. Bulgularımızda özellikle 250 μ g/mL'lik grupta p-Akt seviyesindeki artış dikkat çekicidir. Bu durum, AH'de hiperfosforile Tau düzeylerinin azalmasının sağlanması açısından önemlidir (Pei ve diğerkleri, 2003). Çünkü, Akt'nin fosforilasyonunun artışı, kullandığımız kloroform alkaloit ekstraktının hücre sağkalımında önemli olan PI3K aracılı sinyalleme yollarında rol oynayabileceğini gösterir (Jing ve diğerkleri, 2017). Ayrıca, bulgularımız kloroform alkaloit ekstraktının NH'lerde güvenli kullanılabilme potansiyeli olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda, H₂O₂ ile oluşan p-Akt protein seviyesindeki azalışın kloroform alkaloit ekstraktı uygulaması ile tersine dönerek arttığı belirlenmiş olup, en iyi sonuç 100 μ g/mL'lik uygulamadan elde edilmiştir (H₂O₂ uygulanmış gruba göre 4,5 kat). Yapılan çalışmalarda bitkilerden elde edilen bazı alkaloitlerin A β ile artan Akt sinyalini baskıladığı (Seo ve diğerkleri, 2018), fosforilasyon durumunun modülasyonu yoluyla GSK-3 β 'yı etkisiz hale getiren PI3K/Akt'nin aktivasyonuna yol açtığı ve bunun da p-APP ve A β seviyelerinin düşmesine neden olduğu bildirilmiştir (Fan ve diğerkleri, 2019). Xian ve diğerkleri (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, 24 saat süre ile 20 μ M A β ₂₅₋₃₅'e maruz bırakılan fPC12 hücrelerinde p-Akt protein seviyesinin kontrolden ~0,45'e baskılandığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, A β ₂₅₋₃₅ uygulaması öncesi *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil.'da bulunan izorinkofilin alkaloitinin ticari preparatının (1-50 μ M) uygulandığı gruplarda, p-Akt protein seviyesinin A β ₂₅₋₃₅ uygulanmış gruba göre sırasıyla ~1,2-2,1 kat arttığı belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre, çalışmamızda kullandığımız kloroform alkaloit ekstraktının hasar verici ajanla muamele sonucu azalmış p-Akt seviyesini arttırmada daha etkili olduğu görülmektedir. Dolayısıyla, kloroform alkaloit ekstraktının H₂O₂ ajanının oluşturduğu Akt proteininin fosforilasyon seviyesindeki azalmayı tersine çevirerek p-Akt/t-Akt oranını arttırdığı, böylece fPC12 hücrelerini nöral apoptoza karşı korumada etkin olduğu görülmüştür. Yapılan bazı çalışmalarda, PI3K/Akt sinyal yolağının GSK-3 β aracılı Tau proteini hiperfosforilasyonu ve nöral sağkalımda etkin olduğu; bu yolağın inhibisyonunun GSK-3 β aktivitesini artırarak Tau proteini hiperfosforilasyonunu indüklediği bildirilmiştir (Baki ve diğerkleri, 2004; Lee ve diğerkleri, 2009a). Bu bilgiye göre; ilgili etken maddemizin p-Akt

yolağındaki etkisi, bu yolla ilişkili Tau proteininin hiperfosforilasyonunun baskılanması ve dolayısıyla mikrotübül stabilizasyonun sağlanması açısından da önemlidir. Yapılan literatür araştırmalarında allokrıptopın ile Akt proteinin fosforilasyonunun arttırıldığı çalışmaya rastlanmamıştır. Buna göre, çalışmamız *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloit bileşenlerinin, özellikle allokrıptopının Akt proteininin fosforilasyonunu sağlayarak, dikkate değer nöroprotektif etkisinin ortaya konulduğu ilk çalışmadır. Bu çalışma ile yeni bir Akt aktivatörü (p-Akt; Ser 473 rezidüsünden fosforile halde olan aktif form) etken maddelerin tanımlanması gündeme gelebilecektir.

Santral sinir sisteminde GSK-3 β aktivitesindeki artışın, nörogelişimsel bozukluklar, AH, PH, şizofreni, bipolar bozukluklar ve depresyonun da dahil olduğu hastalıkların patogeneğinde rol aldığı bilinmektedir (Bhat, Budd Haeberlein ve Avila, 2004; Cole, 2013; Jope ve Roh, 2006; Kozikowski ve diğerleri, 2006; Şahin ve diğerleri, 2014). GSK-3 β proteini her yerde aktif olup, PI3K/Akt hücrel sinyallemeinin kritik bir efektörüdür ve özellikle AH'de büyük bir öneme sahiptir (Bhattacharya, Ray ve Johnson, 2005; Ragot ve diğerleri, 2011; Takashima, 2006). Çünkü GSK-3 β 'nın aktivasyonu (defosforile halde olan GSK-3 β) Tau proteinlerini fosforile eder ve Tau proteinlerinin mikrotübüllerden ayrılmasına neden olur (Ng ve diğerleri, 2015). Diğer taraftan aktif Akt, GSK-3 β 'yı Ser 9'da fosforile eder ve bu fosforilasyon GSK-3 β 'yı inhibe eder (Plyte, Hughes, Nikolakaki, Pulverer ve Woodgett, 1992). Dolayısıyla, GSK-3 β 'nın inaktivasyonu NH'lerde olası bir terapötik yol sağlayabilir (Joshi ve diğerleri, 2022; Liu ve diğerleri, 2021a). Bu nedenle, çalışmamızda *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform alkaloit ekstraktının fPC12 hücrelerinde H₂O₂ ile azalmış p-GSK-3 β /t-GSK-3 β protein oranını arttırıcı ve buna bağılı olarak nöral ölüm yolları üzerindeki baskılayıcı etkisi araştırılmıştır. Sonuçlarımız, H₂O₂ ile muamele edilen hücrelerde, p-GSK-3 β protein seviyesinin kontrolden 0,42'e baskılandığını göstermiştir. Ayrıca, H₂O₂'nin ve tüm deney gruplarının t-GSK-3 β protein seviyesinde kontrole göre anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir. PC12 hücreleri ile yapılan bazı çalışmalarda, H₂O₂'nin GSK-3 β 'nın fosforilasyonunu önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (Lee ve diğerleri, 2009a; Liu ve diğerleri, 2009). Bu nedenle, çalışmamızda yukarıda sonuçlarını verdiğimiz çalışma öncesinde p-GSK-3 β protein seviyesinin azalışında etkin olabilecek H₂O₂ konsantrasyon denemeleri (100-400 μ M) yapılmış olup, en iyi sonuç 200 μ M'lık uygulamadan elde edilmiştir. Bu sonuçlar, H₂O₂ ve p-Akt protein seviyeleri çalışmalarından elde edilen sonuçlar ile de desteklenmiştir. Literatürde PC12 hücreleri ve farklı hasar verici ajanların kullanıldığı çalışmalarda genel olarak, p-GSK-3 β protein

seviyesi kontrolün ~0,25-0,6 katı arasında tespit edilmiştir (Huang ve diğerleri, 2017; Lee ve diğerleri, 2009a; Liu ve diğerleri, 2009; Xian ve diğerleri, 2013). Bu bulgulara dayanarak çalışmamızda kullanılan 24 saat 200 μM H_2O_2 'nin Xian ve diğerleri (2013) A β ile ve Huang ve diğerleri (2017) alüminyum maltolat ile yaptıkları uygulamalarına göre fPC12 hücrelerinde fosforile protein seviyesini daha etkin şekilde azalttığı söylenebilir. Çalışmamızda, NH modeli ile yapılan uygulamalar öncesinde kloroform alkaloit ekstraktının (250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$) tek başına p-GSK-3 β protein seviyesi üzerine etkisi incelenmiş olup, bu konsantrasyonların GSK-3 β proteininin defosforilasyonunu ve aktivasyonunu indüklediği buna bağlı nöral hücre ölümüne neden olmadığı belirlenmiştir. Bulgularımızda özellikle 250 $\mu\text{g/mL}$ 'lik grupta p-GSK-3 β seviyesindeki artış dikkat çekicidir. Bu durum, GSK-3 β aracılı Tau protein hiperfosforilasyonunun önlenmesi ve nöronal sağkalım açısından önemlidir (Baki ve diğerleri, 2004; Lee ve diğerleri, 2009a). Ayrıca, bulgularımız deney modeli içinde test ettiğimiz kloroform alkaloit ekstraktı ve konsantrasyonlarının NH'lerde güvenli olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Çalışmamızda, H_2O_2 ile oluşan p-GSK-3 β protein seviyesindeki azalışın kloroform alkaloit ekstraktı uygulaması ile tersine dönerek arttığı belirlenmiş olup, en iyi sonuç 100 $\mu\text{g/mL}$ 'lik uygulamadan elde edilmiştir (H_2O_2 uygulanmış gruba göre 3,2 kat). Yapılan bazı çalışmalarda alkaloitlerin, GSK-3 β aktivitesinin azaltılması yoluyla beyindeki çözünebilir ve çözünmeyen A β plak seviyesini, HEK293 hücrelerinde ise oluşturulan Tau hiperfosforilasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Yu ve diğerleri, 2011; Durairajan ve diğerleri, 2012). Yapılan bir çalışmada 24 saat süre ile 20 μM A β_{25-35} 'e maruz bırakılan fPC12 hücrelerinde p-GSK-3 β protein seviyesinin kontrolden ~0,43'e baskılandığı gösterilmiştir. Diğer taraftan, A β_{25-35} uygulaması öncesi *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil.'da bulunan izorinkofilin ticari preparatının (1-50 μM) uygulandığı gruplarda, p-GSK-3 β protein seviyesinin A β_{25-35} uygulanmış gruba göre ~1,6-2,1 kat arttığı belirlenmiştir (Xian ve diğerleri, 2013). Bu çalışmaya göre, çalışmamızda kullandığımız kloroform alkaloit ekstraktının hasar verici ajanla muamele sonucu azalmış p-GSK-3 β seviyesini arttırmada daha etkili olduğu söylenebilir. Dolayısıyla, kloroform alkaloit ekstraktının fPC12 hücrelerinde H_2O_2 ajanının oluşturduğu GSK-3 β proteinin fosforilasyon seviyesindeki azalmayı tersine çevirerek p-GSK-3 β /t-GSK-3 β oranını arttırdığı, böylece nöral apoptoza karşı nöroprotektif etkisinin olduğu belirlenmiştir. Literatürlerde aktif GSK-3 β inhibitörleri ile hücrelerin H_2O_2 kaynaklı hasardan korunduğu bildirilmiştir (Nair ve Olanow, 2008; Liu ve diğerleri, 2009). GSK-3 β inhibisyonu konusunda Akt kontrol mekanizmaları önemlidir ve GSK-3 β aktif halde iken Tau hiperfosforilasyonuna ve nöronal hücre ölümüne neden

olmaktadır (Hooper ve diğerleri, 2007; Şahin ve diğerleri, 2014). Çalışmamızda kullandığımız kloroform alkaloit ekstraktının hem p-Akt seviyesini, hem de p-GSK-3 β seviyesini arttırarak nöral ölüme karşı hücreleri koruduğu düşünülmektedir. Yapılan araştırmalarda allokriptopinin, fosforile GSK-3 β protein seviyesini arttırarak nöral ölüm yolağı üzerinde etkili olduğu dolayısıyla nöroprotektif etkisinin gösterildiği bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Buna göre, çalışmamız bu alanda *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloit bileşenlerinin, özellikle allokriptopinin GSK-3 β proteininin fosforilasyonunu sağlayarak, dikkate değer nöroprotektif etkisinin ortaya konulduğu ilk çalışmadır. Bu çalışma ile p-Tau oluşumunu ve apoptozu baskılayarak, nöral hasar yaratıcı ajanlara karşı koruyucu etkisi olan yeni bir GSK-3 β inhibitörü (p-GSK-3 β ; Ser 9 rezidüsünden fosforile halde olan inaktif form) ajan kaynağı gündeme gelebilecektir.

Normal hücrelerde Tau proteini, aksonal mikrotübülleri stabilize eden ve hücre içi taşıma işlemlerinden sorumlu olan nöronal mikrotübülle ilişkili bir proteindir (Ng ve diğerleri, 2015). Patolojik olarak hiperfosforile edildiğinde, Tau molekülleri mikrotübüllerden ayrılır ve çözünmez NFY'ler haline gelir. NFY'ler nöron aksonlarında ve dendritlerde birikir ve böylece nöronların dejenerasyonuna yol açar (Fadaka ve diğerleri, 2017). Tau proteininin hiperfosforilasyonu, PP'leri ve kinazlar tarafından düzenlenir ve bu proteinin fosforilasyonu ve defosforilasyonu arasındaki denge, özellikle AH tedavisi için kritiktir (Jiang ve diğerleri, 2016b). Dolayısıyla, son yıllarda yapılan çalışmalarda, başta AH olmak üzere NH'lerde ilaç geliştirme için Tau merkezli yaklaşım ve Tau hiperfosforilasyonundan sorumlu olan kinazlar hedeflenmektedir. Ek olarak, Tau agregasyon inhibitörleri ve mikrotübül stabilizatörleri de geliştirilme aşamasındadır (Ng ve diğerleri, 2015; Soeda ve Takashima, 2020). Bu nedenle, çalışmamızda *G. grandiflorum*'dan elde edilen kloroform alkaloit ekstraktının fPC12 hücrelerinde H₂O₂ ile artmış p-Tau (Ser 396)/Tau-5 ve p-Tau (Thr 212)/Tau-5 protein oranını azaltıcı ve buna bağlı olarak nöral ölüm yolları üzerindeki baskılayıcı etkisi araştırılmıştır. Sonuçlarımız, H₂O₂ ile muamele edilen hücrelerde, p-Tau (Ser 396) ve p-Tau (Thr 212) protein seviyelerinin sırasıyla kontrolün 1,85 ve 1,83 katı arttığını göstermiştir. Ayrıca, H₂O₂'nin ve tüm deney gruplarının t-Tau (Tau-5) protein seviyesinde kontrole göre anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir. Literatürde, oksidatif stresin Tau patolojisi ile bağlantılı olduğu, Tau proteinini aşırı ifade eden hücrelerin, peroksizomlarının tükenmesinden dolayı oksidatif strese karşı artan duyarlılığa sahip olduğu bildirilmiştir (Zhao ve diğerleri, 2013). PC12 hücreleri ile yapılan çalışmalarda, ROS ve toksinlerin Tau fosforilasyonunu arttırdığı dolayısıyla nörodejenerasyona neden olduğunu gösteren bulgular

da mevcuttur (Liu ve diğeri, 2015a; Poppek ve diğeri, 2006). Bu nedenle, çalışmamızda yukarıda sonuçlarını verdiğimiz çalışma öncesinde p-Tau protein seviyelerinin artışında etkin olabilecek H₂O₂ konsantrasyon denemeleri (100-400 µM) yapılmış olup, en iyi sonuç 200 µM'lık uygulamadan elde edilmiştir. H₂O₂ hem apoptozu hem de nekrozu indükleyebilir. Düşük konsantrasyonları apoptoza neden olurken, yüksek konsantrasyonları nekroza neden olmaktadır (Cole ve Perez-Polo, 2002; Lieberthal, Menza ve Levine, 1998). Bu nedenle çalışmamızda, H₂O₂'nin ağır sitotoksik etki gösterebileceği yüksek konsantrasyonlarda apoptozdan çok nekroz oluşturma ihtimaline bağlı fosforile protein seviyesinin azalmasından dolayı 24 saat 300 ve 400 µM tercih edilmemiştir. H₂O₂'nin düşük konsantrasyonları da (100 ve 150 µM) fPC12 hücre modelimizde apoptozun belirlenmemesi veya düşük seviyelerde belirlenmesinden dolayı tercih edilmemiştir. Bu sonuçlar, H₂O₂ ve p-Akt ile H₂O₂ ve p-GSK-3β protein seviyeleri çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile de desteklenmiştir. PC12 hücrelerinin kullanıldığı farklı hasar verici ajanlarla yapılan çalışmalarda genel olarak p-Tau (Ser 396) protein seviyesinin kontrolün ~1,25-2,25 katı arasında olduğu tespit edilmiştir (Gu ve diğeri, 2018; Huang ve diğeri, 2017; Senavong ve diğeri, 2016; Wang ve diğeri, 2017). Bir diğer p-Tau proteini olan Thr'nin farklı epitopları ile yapılan çalışmalarda protein seviyesinin kontrolün ~1,5-2,25 katı arasında olduğu tespit edilmiştir (Senavong ve diğeri, 2016; Wang ve diğeri, 2017; Yao ve diğeri, 2016). Bu bulgulara dayanarak çalışmamızda kullanılan 24 saat 200 µM H₂O₂'nin Gu ve diğeri (2018) ve Wang ve diğeri (2017)'nin farklı nörodejeneratif ajanlarla yapılan uygulamalarına göre fPC12 hücrelerinde fosforile protein seviyesini daha etkin şekilde arttırdığı söylenebilir. Yapılan bazı çalışmalarda ise, apoptoza giden PC12 hücrelerinde, Tau fosforilasyonunun erken apoptoz fazında gerçekleştiği gösterilmiştir (Mills, Lee ve Pittman, 1998). Flow sitometrik apoptoz analizlerimizde, 200 µM H₂O₂ ile oluşturulan hücre modelimizde özellikle EAH'lerin yüzdesinin GAH'lerin yüzdesinden fazla olması oldukça dikkat çekicidir (bkz. 4.7). Elde edilen bu bulgular, fPC12 hücrelerinde H₂O₂'nin p-Tau (Ser 396) ve p-Tau (Thr 212) protein seviyelerini arttırıcı etkisini ve oluşturulan hücre modelinin başarılı olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda, NH modeli ile yapılan uygulamalar öncesinde kloroform alkaloit ekstraktının (250 ve 500 µg/mL) tek başına p-Tau protein seviyeleri üzerine etkisi incelenmiş olup, bu konsantrasyonların p-Tau proteinlerinin fosforilasyonunu indüklediği buna bağlı nöral hücre ölümüne neden olmadığı belirlenmiştir. Bulgularımızda özellikle 500 µg/mL'lik grupta p-Tau seviyelerindeki azalış dikkat çekicidir. Bu durum, özellikle AH'de nöral hücrelerin apoptozunun inhibe edilmesi ve Tau fosforilasyonun önlenmesi açısından önemlidir (Liu ve

diğerleri, 2009; Şahin ve diğerleri, 2014). Ayrıca, bulgularımız deney modeli içinde test ettiğimiz kloroform alkaloit ekstraktı ve konsantrasyonlarının NH'lerde kullanımının güvenli olabileceğini göstermiştir. Çalışmamızda, H₂O₂ ile oluşan p-Tau proteinlerinin seviyesindeki artışın kloroform alkaloit ekstraktı uygulaması ile tersine dönerek baskılandığı belirlenmiş olup, en iyi sonuç her iki protein için de 500 µg/mL'lik uygulamadan elde edilmiştir (H₂O₂ uygulanmış gruba göre 3,7 kat/p-Tau (Ser 396) ve 2,0 kat/p-Tau (Thr 212)). Yapılan çalışmalarda çeşitli alkaloitlerin transgenik AH farelerinin korteksinde ve hipokampusünde çözünmez ve çözünebilir Aβ seviyeleri ve hiperfosforile Tau gibi etkileri ortadan kaldırdığı, birkaç *in vitro* sistemde de Tau hiperfosforilasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Durairajan ve diğerleri, 2012; Liu ve diğerleri, 2014; Yu ve diğerleri, 2011). Yapılan bir çalışmada 24 saat süre ile 20 µM Aβ₂₅₋₃₅'e maruz bırakılan fPC12 hücrelerinde p-Tau (Ser 396) protein seviyesinin kontrole göre ~1,6 kat, p-Tau (Thr 212)'nin farklı bir epitopu olan p-Tau (Thr 205) protein seviyesinin ise kontrole göre ~1,4 kat artış gösterdiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada, Rubiaceae familyasında yer alan *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil. türünün rinkofilin ve izorinkofilin alkaloitlerinin (100 µM) p-Tau protein seviyesini (Ser 396) ~1,3 kat, p-Tau (Thr 205) protein seviyesini ise sırasıyla ~1,2 ve 1,4 kat baskıladığı gösterilmiştir (Xian ve diğerleri, 2012b). Buna göre; farklı familyalarda yer alan bu iki türle yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında, içeriğinde allokriptopin, trans-kanadin-N-oksit ve tetrahidropalmatin alkaloitleri bulunan kloroform alkaloit ekstraktlarımızın *Uncaria rhynchophylla* türünde bulunan rinkofilin ve izorinkofilin alkaloitlerine göre daha etkili olduğu görülmektedir. Dolayısıyla, kloroform alkaloit ekstraktının fPC12 hücrelerinde H₂O₂ ajanının oluşturduğu Tau proteinlerinin fosforilasyon seviyesindeki artışı baskılayarak p-Tau/t-Tau oranını azalttığı, böylece nöral apoptoza karşı nöroprotektif etkisinin olduğu belirlenmiştir. Literatür araştırmalarında allokriptopinin, p-Tau protein seviyesini baskılayarak nöral ölüm yolağı üzerinde etkili olduğu bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloit bileşenlerinin, özellikle allokriptopinin Tau proteinin hiperfosforilasyonunu baskılayarak, dikkate değer nörokoruyucu etkisinin ortaya konulduğu ilk çalışmadır. Bu çalışma ile p-Tau (Ser 396)/t-Tau (Tau 5) ve p-Tau (Thr 212)/t-Tau (Tau 5) protein oranları üzerinde inhibitör etkisi olan etken bir maddenin, NH'lerin önlenmesi ve/veya tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda Tau proteinlerinin fosforilasyonunun Akt/GSK-3β sinyal yolağı üzerinden olduğu, hücrelere hasar verici ajanların p-Akt ve p-GSK-3β protein seviyelerini azaltarak Tau proteinlerinin fosforilasyonunu arttırdığı belirtilmiştir (Gao ve diğerleri, 2012; Huang ve diğerleri, 2017; Jiang ve diğerleri, 2016b; Xian ve diğerleri, 2013). Bu bilgiler

doğrultusunda, kloroform alkaloit ekstraktının nöral hücrelerde apoptozun inhibe edilmesinde etkin p-Akt ve p-GSK-3 β proteinlerinin artışını sağlayarak Akt/GSK-3 β sinyal yolağını düzenlendiği ve buna bağlı Tau hiperfosforilasyonunu baskıladığı belirlenmiştir. Bu çalışma sonuçları ile yeni bir Akt aktivatörü, apoptozu baskılayarak, nöral hasar yaratıcı ajanlara karşı koruyucu etkisi olan yeni bir GSK-3 β ve Tau agregasyon inhibitörü etken maddelerin tanımlanması gündeme gelebilecektir. Bu durum, elde edilen çalışmamızı ilgili alanda önemli ve özgün kılmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma ile *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloit ekstraktlarının anti-oksidan, hücre içi Ca⁺² homeostazını sağlayıcı, L-tipi Ca⁺² kanal blokeri, p-ERK1/2, p-JNK ve p-p38 proteinlerini defosforile edici, p-Akt (Ser 473) ve p-GSK-3 β (Ser 9) proteinlerini fosforile edici, p-Tau (Ser 396) ve p-Tau (Thr 212) proteinlerini defosforile edici, nöral apoptozdan koruyucu etkileri ve bunların birbirleri ile ilişkili olarak etkileşiminin olduğu ortaya konulmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu doktora tez çalışmasından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, aşağıdaki çıkarım ve öneriler yapılmıştır.

1. Çalışmada, Türkiye’de yaygın olarak yetişen, alkaloit içeriğince zengin ve bilişsel güçlendirici olarak geleneksel tıpta uygulamaları bulunan, ancak nörodejeneratif hastalıklarda ve özellikle AH sinyal yolları üzerindeki etkisi kapsamlı olarak araştırılmamış olan, *Glaucium grandiflorum* bitkisi kullanılmıştır.
2. Farklı çözücülerin kullanıldığı ekstraksiyonlarda farklı alkaloit profilleri ortaya çıkmaktadır ve GC-MS tekniği, biyolojik olarak aktif bileşenler içeren tıbbi bitkilerin fitokimyasal analizlerinde önemli bir rol oynar. Bu nedenle, *G. grandiflorum*’un kloroform, metanol ve su çözücülerini ile alkaloit ekstraktları hazırlanmış olup, alkaloit ekstraktlarının GC-MS ile kalitatif ve kantitatif analizi yapılmıştır. Çalışmada, alkaloit ekstraktlarının alkaloit profilleri benzer bulunmuş olup, her üç ekstraktta da belirlenen allokrriptopin, tetrahidropalmitin ve tetrahidroberberin N-oksit izokinolin alkaloitlerinin miktarlarında farklılık gözlenmiştir. Ek olarak, allokrriptopin her üç ekstraktta da, majör alkaloit olarak belirlenmiştir.
3. Ekstraktların çözücüsünün farklılığına göre allokrriptopinin miktarı farklılık göstermiştir. Kloroform ekstraktında diğer çözücülerin ekstraktlarına göre allokrriptopin miktarı yüksek bulunduğundan, kloroformun allokrriptopin alkaloiti için iyi bir çözücü olduğu söylenebilir. Bu durum, bitki ekstraksiyonlarında allokrriptopin gibi izokinolin alkaloitlerinin yüksek miktarda ve saflıkta elde edilmesinde kloroform çözücüsünün kullanılmasını öne çıkaran önemli bir bulgu olmuştur.
4. *In vitro* hücre çalışmalarında, alkaloit ekstraktlarının (kloroform, metanol ve su) düşük konsantrasyonlarda yüksek konsantrasyon uygulamaları kadar etkili olduğu ve toksik etki göstermediği, yüksek konsantrasyon uygulamalarında ise ağır sitotoksik etkilerinin olmadığı belirlenmiştir. Çalışmamız, *G. grandiflorum*’dan elde edilen alkaloit ekstraktlarının H₂O₂ ajanına karşı PC12 hücreleri üzerinde protektif etkilerinin gösterildiği ilk çalışmadır. Bu sonuçlara göre, allokrriptopince zengin alkaloit ekstraktlarının NH’lerde oksidatif strese bağlı oluşabilecek nöral hasara karşı, biyogüvenli nöroprotektif bir ajan olarak kullanılabileceği önerilebilir.
5. Oksidatif stres, NH’lerin patogenezi ve patofizyolojisinde merkezi bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, oksidatif stres üzerine alkaloit ekstraktlarının etkilerini incelediğimiz

çalışmamızda, her üç alkaloit ekstraktının da H_2O_2 ile artan hücre içi ROS seviyesini belirgin bir şekilde azalttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının ROS'a karşı koruyuculuk bakımından daha öne çıktığı dikkati çekmiştir. Çalışmamız, alkaloit ekstraktlarının birçok nöral hastalığın temel sebebi olarak gösterilen oksidatif strese bağlı nöral ölümden koruyucu etkilerini ve bu etkilerin tartışma bölümünde açıklandığı gibi hücre içi Ca^{+2} seviyesi, MAPK sinyal yolları aracılı Tau fosforilasyonu, AKT/GSK-3 β sinyal yolağı aracılı Tau fosforilasyonu ve nöral apoptoz ile ilişkilendirildiği ilk çalışmadır. Dolayısıyla, bu çalışmadan elde edilen sonuçların ilgili alana önemli katkı sağladığını düşünmekteyiz.

6. Nöral apoptoz, NH'lerde nörodejeneratif disapoptotik sürecin patogenezinde yer almaktadır. Bu sebeple, nöral apoptozun indüklenmesi ve indüklenen bu apoptozun alkaloit ekstraktları ile baskılanmasını araştırdığımız çalışmamızda, elde edilen sonuçlar alkaloit ekstraktlarının yüksek bir Bcl-2/Bax oranı ve $[Ca^{+2}]_i$ 'nin azaltılması aracılı yüksek bir mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) ile, H_2O_2 tarafından indüklenen oksidatif strese karşı nöroprotektif etki gösterdiğini ve böylece apoptozun erken fazını inhibe ettiğini ortaya koymuştur. Bu mekanizmalar dışında, alkaloit ekstraktlarımızın protein çalışmalarında gösterildiği gibi özellikle hücrelerde erken apoptoz fazında gerçekleşen Tau fosforilasyonunu baskıladığı buna bağlı olarak da apoptozun erken aşamasını inhibe etme özelliğine sahip olduğu gözlenmiştir. Ek olarak, alkaloit ekstraktlarımızın Kaspaz-9/-3 genlerinin ekspresyonunu baskılayarak, apoptozun sonraki fazını da inhibe ettiği söylenebilir. Buna göre çalışmamız, *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloit bileşenlerinin, oksidatif stres indüklü nöral apoptozu inhibe ederek NH'ler için faydalı bir sitoprotektif ajan olarak kullanılabileceğinin ortaya konulduğu ilk çalışmadır.

7. Apoptotik aktivasyona yol açan anormal hücre döngüsü yeniden girişi, çeşitli nörodejeneratif koşullarda patolojik bir rol oynamaktadır. Buna göre, hücre döngüsü analizlerimizde H_2O_2 uygulanmış fPC12 hücrelerinde G1 fazındaki hücrelerin oranında azalış, Sub G1 fazındaki hücrelerin oranında artışın belirlenmesi, nöral apoptoza indüklenmiş nörodejeneratif hücre modelinin başarılı olduğunun göstergesi olmuştur. Alkaloit ekstraktlarının apoptozu temsil eden Sub G1 fazındaki hücre yüzdesini doza bağlı olarak azalttığı, G1 fazındaki hücre yüzdesini ise arttırdığı belirlenmiştir. Tüm alkaloit ekstraktlarının uygulamalarında, G1/S hücre döngüsünün ilerlemesini düzenleyerek, hücrelerin G1 fazında tutuklanmasını sağlamıştır. G1 fazındaki hücrelerin tutuklanması, alkaloit ekstraktlarının hücreleri onarım mekanizmalarına yönlendirebileceğini ve böylece muhtemelen nöral apoptozu baskılayabileceğini göstermiştir.

8. Hücre döngüsü analiz sonuçlarımız, ROS analizi ve apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonu üzerine yaptığımız çalışmalarımızdan elde ettiğimiz sonuçlarla uyumludur. Bu durum, alkaloit ekstraktlarının hücre içi ROS seviyesini baskılayarak ve Bcl-2/Bax oranını artırarak hücre döngüsünü regüle edebileceğini göstermektedir. Ayrıca, alkaloit ekstraktlarının protein çalışmalarında gösterildiği gibi Tau proteininin hiperfosforilasyonunu baskılayarak da hücre döngüsü regülasyonunu sağladığı söylenebilir. Bu nedenle, Tau proteininin hiperfosforilasyonunun altında yatan mekanizmaları hücre döngüsü düzenleyici bileşikleri kullanarak anlamak, hücre döngüsü proteinlerinin yeniden oluşmasının hasarlı nöronlarda neden bu kadar önemli olduğunu anlamaya katkı sağlayabilir. Tüm bu bilgilere göre, alkaloit ekstraktlarının anti-oksidan, hücre döngüsü düzenleyici, anti-apoptotik ve anti-Tau etkilerinin (mitokondriyal yolakla ilişkili) birbiriyle ilişkili olduğu savunulabilir. NH'lerde hücre döngüsünün düzenlenmesinde alkaloitlerin kullanıldığı çalışmalar sınırlı olup, hücre döngüsünde meydana gelen bu değişimler, alkaloit ekstraktlarının nörobiyolojik ve nörokimyasal olarak nörodejenerasyonda etkin olabileceğinin başka bir kanıtı olarak gösterilebilir. Buna göre, çalışmamız *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloit bileşenlerin, anti-oksidan, anti-apoptotik ve anti-Tau özelliklere sahip G1/S geçiş inhibitörü dolayısıyla, hücre döngüsü regülasyonunu sağlayıcı aktif maddelerin sentezinde kullanılabileceğini gösteren ilk çalışmadır.

9. Apoptoz, AH ve PH dahil olmak üzere birçok NH'de baskın nöral ölüm şeklidir ve genler tarafından düzenlenen bir mekanizmadır. Oksidatif strese indüklenerek oluşturulan NH hücre modelinde, alkaloit ekstraktlarının Bcl-2 aile üyelerinin ekspresyonlarını düzenleyerek ve kaspaz aktivasyonunu inhibe ederek mitokondriyal apoptotik yolağı bloke ettiği dolayısıyla nöral apoptozu baskıladığı, buna göre nörodejeneratif hasara karşı koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir. Sonuçlarımız, flow sitometrik apoptoz analizi sonuçlarımızla uyumlu olarak, apoptozun erken evresinde (başlangıç fazı) daha etkili olan alkaloit ekstraktlarının bu etkilerinin Bax ve Bcl-2 ekspresyonunun modülasyonu ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. Ayrıca, alkaloit ekstraktlarının Kaspaz-9/-3 genlerinin aşağı regülasyonu ile de apoptozun sonraki aşamasını (efektör fazı) engelleyebileceği düşünülmektedir. Ek olarak, ROS analizi ve hücrel Ca^{+2} homeostazı sonuçlarımızla tutarlı olarak alkaloit ekstraktlarının, hücrel ROS seviyelerini baskılayarak ve hücre içi Ca^{+2} homeostazını sağlayarak hücredeki aşırı ROS ve Ca^{+2} seviyelerinin neden olduğu apoptozla ilişkili genlerdeki değişiklikleri modüle ettiği söylenebilir. Çalışmamız, *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloit bileşenlerinin, anti-apoptotik etkisinin, apoptozla ilişkili genlerin (mitokondriyal apoptotik yoldaki genlerin) ekspresyonu üzerindeki regüle

edici etkileri ile ilişkili olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Bu nedenle çalışmamız, bu bileşiklerin mitokondriyal apoptozu bloke etme özelliklerinden dolayı nöroprotektif ve/veya terapötik etkinliğinin, NH'ler için farmakolojik bir temel sağlayabileceğini göstermiştir.

10. Tez kapsamında yapılan flow sitometrik ROS, apoptoz ve hücre döngüsü analizi ile qRT-PCR ile yapılan apoptoz çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre; kloroform alkaloit ekstraktının hücre içi aşırı ROS seviyesini baskılama, hücre döngüsünü düzenleme ve nöral apoptozu baskılamada daha öne çıktığı dikkati çekmiştir. Bunun, kloroform alkaloit ekstraktındaki allokriptopin miktarının diğer alkaloit ekstraktlara göre daha yüksek olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Çalışmamız, *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloit bileşenlerinin, özellikle de allokriptopinin ROS inaktivasyonu, hücre döngüsünün regülasyonu ve nöral apoptozun inhibisyonu aracılı nöroprotektif etkilerinin ortaya konulduğu ilk çalışmadır. Bu nedenle, çalışmamız allokriptopinin kullanılacağı anti-oksidan, hücre döngüsü regülatörü ve anti-apoptotik potansiyele sahip ajanların sentezi ve/veya geliştirilmesi için yapılacak ileri düzey çalışmalara temel oluşturabilir. Tüm bu bilgiler doğrultusunda, yukarıda belirtilen çalışmalar sonrasında yapılan hücre içi Ca^{+2} homeostazı, MAPK sinyal yolları ve Akt/GSK-3 β /Tau nöral ölüm sinyal yolları ile ilgili moleküler çalışmalarda sadece yüksek allokriptopin içerikli kloroform alkaloit ekstraktı kullanılmıştır.

11. Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonundaki düzensizlik, NH'lerde hücre ölümünden sorumlu mekanizmalar arasında yer almaktadır. Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun kontrolünden sorumlu L-tipi VGCC'lerde oksidatif disfonksiyona bağlı oluşan aktivasyon, yaşlanan nöronlar ve NH'lerdeki baskın değişiklikler arasındadır. Çalışmamız, allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının oksidatif stres ile artmış hücre içi Ca^{+2} seviyesini baskıladığını ve bu baskılamanın L-tipi Ca^{+2} kanalı aracılı olduğunu göstermiştir. Kloroform alkaloit ekstraktımızda majör alkaloit olarak belirlenen allokriptopin ile yapılan çalışmalarda, bu alkaloitin özellikle kardiyolojik ve ileum araştırmalarında öne çıktığı ve Ca^{+2} konsantrasyonunu modüle edici etkiye sahip olduğu görülmüştür. Dolayısıyla, allokriptopinin farklı çalışmalarda L-tipi Ca^{+2} kanal blokleri olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, *in vitro* NH modeli ve bu modelde rol oynayan Cav1.2 ve Cav1.3 alt tiplerinin ekspresyonu üzerinde baskılayıcı etkisi daha önce çalışılmamıştır. Çalışmamız, *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloit bileşenlerinin, özellikle allokriptopinin L-tipi Ca^{+2} kanal blokleri olma potansiyelinin ve dolayısıyla nöral Ca^{+2} homeostazının regülasyonu aracılı nöroprotektif etkisinin ortaya konulduğu ilk çalışmadır. Bu bilgilere göre, birçok farklı mekanizmada etkili alkaloit bileşenlerin özellikle de allokriptopinin, L-tipi Ca^{+2} kanal

blokeri olarak kullanımı önerilebilir. Ancak, bu bileşenleri nootropik olarak veya NH'de önleyici bir tedavi olarak uygulamak için bunun arkasındaki mekanizma ve/veya mekanizmalar araştırılmalıdır. Bunlara ek olarak, çalışmamız allokrriptopinin sadece NH'lerde değil, hücre içi Ca^{+2} homeostazının önemli olduğu diğer hastalıklarda da etkili olabileceğini göstermektedir.

12. MAPK'ler, sinyal iletim yollarındaki anahtar kinazlardır ve her bir ana MAPK alt ailesinin (ERK1/2, JNK ve p38) üyeleri, nöronal hasar ve hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, MAPK sinyal yolları üzerinde allokrriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının protein düzeyinde etkisini incelediğimiz çalışmamızda, H_2O_2 ile artmış p-ERK1/2/t-ERK1/2, p-JNK/t-JNK ve p-p38/t-p38 protein oranını kloroform alkaloit ekstraktının azaltıcı ve buna bağlı olarak MAPK sinyal yolları üzerindeki baskılayıcı etkisi belirlenmiştir. ERK1/2, JNK ve/veya p38'in ROS ile aktivasyonu, nöral apoptoz ile sonuçlanmaktadır. Buna göre elde ettiğimiz sonuçlar da bu durumu desteklemekte olup, hücre içi ROS seviyesi ve nöral apoptozun baskılandığını gösterdiğimiz flow sitometrik ve qRT-PCR çalışmalarımızla paralellik göstermiştir. Ayrıca, kloroform alkaloit ekstraktının Tau proteinin Akt/GSK-3 β sinyal yolağı aracılı fosforilasyonunun baskılanmasında her üç MAPK sinyal yolağının inhibe edilmesinin etkili olduğu öngörülmektedir. Ek olarak, kloroform alkaloit ekstraktının MAPK sinyal yollarını inhibe edici etkisinin altında yatan mekanizmanın L-tipi VGCC'nin blokajı acılı hücre içi Ca^{+2} homeostazı olduğu düşünülmektedir ve bu durum oldukça dikkat çekicidir. p38 MAPK sinyal yolağı NH'lerde özellikle inflamasyon ile ilişkilidir. Buna göre, çalışmamız allokrriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının p38 MAPK sinyal yolağı üzerinden nöroinflamasyon mekanizmasında da etkili olabileceğini göstermiştir. Dolayısıyla, p38 MAPK inhibitörü olma potansiyelini taşıyan allokrriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktından, nöroproteksiyonda yer alan çeşitli sinyal yolları üzerinde (nöral ölüm ve inflamasyon yolları) etkili bitkisel temelli ilaç formülasyonları geliştirilebilir. Çalışmamız *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloit bileşenlerinin, özellikle allokrriptopinin ERK1/2, JNK ve p38 proteinlerinin fosforilasyonunu baskılayarak, dikkate değer nöroprotektif etkisinin ortaya konulduğu ilk çalışmadır. Bu çalışma sonuçları ile NH'lerin önlenmesi ve/veya tedavisinde kullanılabilecek anti-nöroinflamatuvar özelliğe sahip yeni bir MAPK (p-ERK1/2, p-JNK ve p-p38) inhibitörü etken maddelerin tanımlanması gündeme gelebilecektir. Ek olarak, bu alkaloit bileşenlerden NH harici farklı hastalıklardan da koruyucu olabilecek, MAPK inhibitörü bitkisel temelli ilaçlar elde edilebilecektir.

13. Akt proteini, nöral ölüm mekanizmalarında etkisi kanıtlanmış bir protein olup, bu proteinin fosforilasyonla aktivasyonu NH'lerde terapötik bir rol oynayabilir. Bu nedenle, Akt proteininin seviyesindeki değişiklikleri incelediğimiz çalışmamızda, allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının H₂O₂ ile azalmış p-Akt/t-Akt protein oranını arttırıcı ve buna bağlı olarak nöral ölüm yolları üzerindeki baskılayıcı etkisi ortaya konulmuştur. Çalışmada allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının yüksek konsantrasyonları tek başına deney modeli içinde test edilmiş, belirlenen konsantrasyonların Akt proteininin defosforilasyonunu ve inaktivasyonunu indüklediği buna bağlı nöral hücre ölümüne neden olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının NH'lerde güvenli kullanılabilme potansiyeli olduğunu göstermiştir. Oluşturulan hücre modelinde, allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının Akt'nin aktivasyonu ile Akt/GSK-3 β sinyal yolağını düzenlediği, Tau hiperfosforilasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Western blot hibridizasyonu ile GSK-3 β ve Tau protein seviyeleri analizlerinde elde ettiğimiz bulgular da bu durumu desteklemektedir. Çalışmamız, *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloit bileşenlerinin, özellikle allokriptopinin Akt proteininin fosforilasyonunu sağlayarak, dikkate değer nöroprotektif etkisinin ortaya konulduğu ilk çalışmadır. Dolayısıyla, bu çalışma ile yeni Akt aktivatörü etken maddelerin tanımlanması gündeme gelmiştir.

14. GSK-3 β proteini, nöral ölüm mekanizmalarında etkisi kanıtlanmış bir diğer protein olup, bu proteinin Ser 9 rezidüsünden fosforilasyonla inaktivasyonu NH'lerde terapötik bir rol oynayabilir. Bu nedenle, GSK-3 β proteininin seviyesindeki değişiklikleri incelediğimiz çalışmamızda, allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının H₂O₂ ile azalmış p-GSK-3 β /t-GSK-3 β oranını arttırıcı ve buna bağlı olarak nöral ölüm yolları üzerindeki baskılayıcı etkisi ortaya konulmuştur. Çalışmada allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının yüksek konsantrasyonları tek başına deney modeli içinde test edilmiş, belirlenen konsantrasyonların GSK-3 β defosforilasyonunu indüklediği ve buna bağlı nöral hücre ölümüne neden olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının NH'lerde güvenli kullanılabilme potansiyeli olduğunu göstermiştir. Oluşturulan hücre modelinde, allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının p-GSK-3 β 'nin inaktivasyonu ile Akt/GSK-3 β sinyal yolağını düzenlediği, Tau hiperfosforilasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Western blot hibridizasyonu ile Akt ve Tau protein seviyeleri analizlerinde elde ettiğimiz bulgular da bu durumu desteklemektedir. Çalışmamız bu alanda *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloit bileşenlerinin, özellikle allokriptopinin GSK-3 β proteininin fosforilasyonunu sağlayarak, dikkate değer

nöroprotektif etkisinin ortaya konulduğu ilk çalışmadır. Bu çalışma ile apoptozu baskılayarak, nöral hasar yaratıcı ajanlara karşı koruyucu etkisi olan yeni bir GSK-3 β inhibitörü ajan kaynağı gündeme gelmiştir.

15. Nöral ölüm yollarında etkili ve mikrotübül ilişkili bir protein olan Tau'nun fosforilasyonu ve defosforilasyonu arasındaki denge, özellikle AH tedavisi için kritiktir. Dolayısıyla, başta AH olmak üzere NH'lerde etkili ilaç geliştirme çalışmalarında Tau hiperfosforilasyonundan sorumlu kinazları, Tau agregasyon inhibitörleri ve mikrotübül stabilizatörleri içeren tau merkezli yaklaşım hedeflenmektedir. Bu nedenle, Tau proteininin seviyesindeki değişiklikleri incelediğimiz çalışmamızda, allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının H₂O₂ ile artmış p-Tau (Ser 396)/Tau-5 ve p-Tau (Thr 212)/Tau-5 protein oranını azaltıcı ve buna bağlı olarak nöral ölüm yolları üzerindeki baskılayıcı etkisi ortaya konulmuştur. Apoptozu giden PC12 hücrelerinde, Tau fosforilasyonunun erken apoptoz fazında gerçekleştiği bilinmektedir. Dolayısıyla, 200 μ M H₂O₂ ile oluşturulan hücre modelimizde özellikle erken apoptotik hücre (EAH)'lerin yüzdesinin geç apoptotik hücre (GAH)'lerin yüzdesinden fazla olması oldukça dikkat çekicidir. Elde edilen bu bulgular, fPC12 hücrelerinde H₂O₂'nin Akt/GSK-3 β sinyal yolağının disregülasyonu aracılığıyla p-Tau protein seviyelerini arttırıcı etkisini ve oluşturulan hücre modelinin başarılı olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda tek başına allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının fosforile protein seviyeleri üzerindeki etkisi test edilmiş, modelin bu yüksek konsantrasyonlarla da çalışılabileceği ortaya konulmuştur. Oluşturulan hücre modelinde, allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının Tau proteinin hiperfosforilasyonunu baskılayarak, nöral apoptozu karşı korumada etkin olduğu gözlenmiştir. Çalışmamız *G. grandiflorum*'dan elde edilen alkaloit bileşenlerinin, özellikle allokriptopinin Tau proteinin hiperfosforilasyonunu baskılayarak, dikkate değer nörokoruyucu etkisinin ortaya konulduğu ilk çalışmadır. Bu çalışma ile p-Tau (Ser 396)/t-Tau (Tau 5) ve p-Tau (Thr 212)/t-Tau (Tau 5) protein oranları üzerinde inhibitör etkisi olan etken bir maddenin, NH'lerin önlenmesi ve/veya tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir.

16. Nöral ölüm yollarında etkili proteinler ile yapılan tüm çalışmalar dikkate alındığında, p-Akt, p-GSK-3 β protein seviyelerini allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının arttırdığı, p-Tau protein seviyelerini ise azalttığı, buna bağlı olarak nöroprotektif etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Yapılan analizlerde allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktlarının 100 ve 250 μ g/mL konsantrasyonlarının ilaç geliştirme formülasyonlarında kullanılması önerilebilir. Allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının nöral ölüm yolağı üzerinde etkilerinin bu kadar detaylı incelendiği bir çalışmaya literatürde

rastlanmamıştır. Çalışmamızda, allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının nöral hücrelerde apoptozun inhibe edilmesinde etkin p-Akt ve p-GSK-3 β proteinlerinin artışı sağlayarak Akt/GSK-3 β sinyal yolağını düzenlediği ve buna bağlı Tau hiperfosforilasyonu engellediği belirlenmiştir. Bu çalışma sonuçları ile yeni bir Akt aktivatörü, apoptozu baskılayarak, nöral hasar yaratıcı ajanlara karşı koruyucu etkisi olan yeni bir GSK-3 β ve Tau agregasyon inhibitörü etken maddelerin tanımlanması gündeme gelmiştir. Bu durum, elde edilen sonuçları ilgili alanda önemli ve özgün kılmaktadır.

17. Çalışmamızda, allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının nöral ölümde etkili Akt/GSK-3 β /Tau ve MAPK sinyal yolaklarında çoklu mekanizmalarla etkili olmasının literatürle de desteklendiği gibi kloroform alkaloit ekstraktının anti-oksidan mekanizması ile ilişkili olabileceği söylenebilir. Ayrıca, allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının yine bu mekanizma ile ilişkili olarak otofajinin kilit düzenleyicilerinden biri olan rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR) sinyal yolağı üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Çünkü, oksidatif stresin mTOR sinyal yolağı disregülasyonuna neden olarak disfonksiyonel otofajiye neden olduğu bunun da nörodejenerasyonda etkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca, mTOR sinyal yolağı üzerinde kloroform alkaloit ekstraktının etkinliğini gösterdiğimiz Akt proteini ile ilişkili bir yolaktır. Son dönem çalışmalar, doğal ürünler ile PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının modüle edilmesinin nörodejenerasyonun önlenmesinde umut verici bir strateji olduğuna vurgu yapmaktadır. Buna göre, ilgili mekanizmaların birbiriyle ilişkilerinin ve bu mekanizmalar üzerinde allokriptopince zengin kloroform alkaloit ekstraktının etkilerinin detaylı olarak ortaya konulabilmesi için ileri düzey moleküler çalışmaların yapılması önerilmektedir.

18. *G. grandiflorum*'un alkaloit ekstraktlarında majör alkaloit olarak tespit ettiğimiz allokriptopin alkaloiti ile yapılan çalışmalarda, allokriptopinin AChE-i etkisinin olduğu ve anti-aritmik etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Allokriptopin ile yapılan bir *in vivo* çalışmalarda ise, bu alkaloitin bağırsak kanalında metabolize edilebildiği, böbrek, akciğer ve kalp gibi dokulara ek olarak BOS'a geçebildiği bildirilmiştir. Literatürdeki bu çalışma MSS bozukluklarının tedavisinde en büyük zorluklardan biri olmaya devam eden KBB'yi aşma konusunda allokriptopinin başarılı olabileceğinin göstergesidir. Ayrıca, ekibimizce farklı bir tez çalışması kapsamında, ticari allokriptopinin KBB'yi geçişine yönelik yapılan *in siliko* araştırmalarda QPlogBB (öngörülen beyin/kan partiyon katsayısı) CNS (öngörülen merkezi sinir sistemi aktivitesi) değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar, allokriptopinin iki parametre için de kabul edilen aralıklarda olduğunu göstermiştir. Bu durum allokriptopinin KBB'yi geçerek, MSS'ye ulaşabileceğini ve nöral sisteme yönelik ilaç adayı olabilme

potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda, allokriptopinin NH'ler üzerinde etkilerinin gösterildiği çalışmalar sınırlı olup, yapılan çalışmalarda birden fazla mekanizma üzerine aynı anda odaklanılmadığı görülmüştür. Diğer taraftan allokriptopinin KBB'den geçebilmesine dair bilgiler, özellikle ilaç formülasyonlarında temel basamak olan, pek çok ilaç etken maddesinin faz aşamalarına geçmesinin önündeki engelin allokriptopin için kalkmasının göstergesi olabilir. Çalışmamız allokriptopinin etkinliğinin birden fazla mekanizma üzerinden ortaya konulduğu ilk çalışma olması bakımından son derece önemlidir. Allokriptopini ileri düzey moleküler araştırmalar açısından gündeme getirmiş olan çalışmamız, bu alanda yapılacak çalışmalara yenilikçi bir bakış açısı kazandırmıştır. Ayrıca, allokriptopin, diğer alkaloit ve NH ilaç adayı etken maddelere alternatif olabileceğinden Türkiye'de yaygın yetişen *G. grandiflorum*'dan yoğun elde edilebiliyor olması ülke için önemli ekonomik potansiyel yaratabilecektir.

Bu tez çalışması kapsamında, doğal bileşiklerden olan *G. grandiflorum* alkaloit ekstraktlarının aktif bileşenleri tanımlanmış, bu bileşenlerin özellikle de allokriptopinin anti-oksidatif, hücre içi Ca^{+2} homeostazını sağlayıcı, L-tipi Ca^{+2} kanal blokeri, p-ERK1/2, p-JNK ve p-p38 proteinlerini defosforile edici, p-Akt (Ser 473) ve p-GSK-3 β (Ser 9) proteinlerini fosforile edici, p-Tau (Ser 396) ve p-Tau (Thr 212) proteinlerini defosforile edici, nöral apoptozdan koruyucu etkileri ve bunların birbirleri ile ilişkili olarak etkileşimi ortaya konulmuştur. Alkaloit bileşenlerden elde edilen bu etkiler sinerjistik olmakla birlikte, allokriptopinin burada majör rol oynadığı görülmüştür. Dolayısıyla, bu çalışmadan elde edilen sonuçlar bugüne kadar NH'lerde tam başarı sağlayamayan ilaçların yerine, daha etkin ve yan etkisi daha az olan, anti-oksidan özelliğe sahip yeni bir ajanın keşfedilmesi açısından son derece önemlidir. Ayrıca, bu alkaloit ekstraktları ve/veya allokriptopin benzer yolakları hedef alan farklı hastalıkları önleyici ve/veya tedavi edici etken maddeler için de alternatif olabilir. Bununla birlikte, alkaloitlerin özellikle de allokriptopinin önleyici ve/veya terapötik potansiyellerini daha iyi anlamak için, geliştirilecek ilaç formülasyonları ile yeni tasarlanmış klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Aarsland, D., Hutchinson, M., and Larsen, J. P. (2003). Cognitive, psychiatric and motor response to galantamine in Parkinson's disease with dementia. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 18(10), 937-941.
- Abramov, A. Y., Bachurin, S. O. (2021). Neurodegenerative disorders-searching for targets and new ways of diseases treatment. *Medicinal Research Reviews*, 41(5), 2603-2605.
- Abu-Ghalyun, Y., Masalmeh, A., and Al-Khalil, S. (1997). Effects of allocryptopine, an alkaloid isolated from *Glaucium arabicum* on rat isolated ileum and urinary bladder. *General Pharmacology: The Vascular System*, 29(4), 621-623.
- Ahmed, F., Ghalib, R. M., Sasikala, P., and Ahmed, K. M. (2013). Cholinesterase inhibitors from botanicals. *Pharmacognosy Reviews*, 7(14), 121-130.
- Ahmed, T., Zulfiqar, A., Arguelles, S., Rasekhian, M., Nabavi, S. F., Silva, A. S., and Nabavi, S. M. (2020). Map kinase signaling as therapeutic target for neurodegeneration. *Pharmacological Research*, 160, 105090.
- Ahn, J. Y. (2014). Neuroprotection signaling of nuclear Akt in neuronal cells. *Experimental Neurobiology*, 23(3), 200-206.
- Aimé, P., Sun, X., and Greene, L. A. (2018). *Manipulation and study of gene expression in neurotoxin-treated neuronal PC12 and SH-SY5Y cells for in vitro studies of Parkinson's disease, In: Gene expression and regulation in mammalian cells-Transcription toward the establishment of novel therapeutics*. London: Intech Open, 1-372.
- Ajmal, M. R. (2023). Protein misfolding and aggregation in proteinopathies: causes, mechanism and cellular response. *Diseases*, 11(1), 30.
- Akaberi, T., Shourgashti, K., Emami, S. A., AND Akaberi, M. (2021). Phytochemistry and pharmacology of alkaloids from *Glaucium* spp. *Phytochemistry*, 191, 112923.
- Albert-Gascó, H., Ros-Bernal, F., Castillo-Gómez, E., and Olucha-Bordonau, F. E. (2020). MAP/ERK signaling in developing cognitive and emotional function and its effect on pathological and neurodegenerative processes. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4471.
- Alles, S. R., Garcia, E., Balasubramanyan, S., Jones, K., Tyson, J. R., Joy, T., Snutch, T. P., and Smith, P. A. (2018). Peripheral nerve injury increases contribution of L-type calcium channels to synaptic transmission in spinal lamina II: Role of $\alpha 2\delta$ -1 subunits. *Molecular Pain*, 14, 1744806918765806.
- Almasi, S., Shahsavandi, B., Aliparasty, M. R., Alipour, M. R., Rahnama, B., and Feizi, H. (2015). The anti-apoptotic effect of ghrelin in the renal tissue of chronic hypoxic rats. *Physiology and Pharmacology*, 19(2), 114-120.
- Al-Snafi, A. E., Talab, T. A., and Majid, W. J. (2019). Medicinal plants with central nervous activity-an overview (Part 1). *IOSR Journal of Pharmacy*, 9(3), 52-102.

- Altamura, S., and Muckenthaler, M. U. (2009). Iron toxicity in diseases of aging: Alzheimer's disease, Parkinson's disease and atherosclerosis. *Journal of Alzheimer's Disease*, 16(4), 879-895.
- Amanat, F., Duehr, J., Oestereich, L., Hastie, K. M., Ollmann Saphire, E., and Krammer, F. (2018). Antibodies to the glycoprotein GP2 subunit cross-react between old and new world arenaviruses. *MSphere*, 3(3), e00189-18.
- Amato, A., Terzo, S., and Mulè, F. (2019). Natural compounds as beneficial antioxidant agents in neurodegenerative disorders: A focus on Alzheimer's disease. *Antioxidants*, 8(12), 608.
- Amtul, Z., and Rahman, A. (2016). *Nutraceuticals neuroprotect naturally: Alzheimer's disease, Parkinson's disease, stroke and major depressive disorder*, In: *Studies in natural products chemistry*. Amsterdam: Elsevier, 373-397.
- Andorfer, C., Acker, C. M., Kress, Y., Hof, P. R., Duff, K., and Davies, P. (2005). Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms. *Journal of Neuroscience*, 25(22), 5446-5454.
- Anekonda, T. S., and Quinn, J. F. (2011). Calcium channel blocking as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease: The case for isradipine. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1812(12), 1584-1590.
- Ansari, N., and Khodagholi, F. (2013). Natural products as promising drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease: Molecular mechanism aspect. *Current Neuropharmacology*, 11(4), 414-429.
- Asih, P. R., Prikas, E., Stefanoska, K., Tan, A. R., Ahel, H. I., and Ittner, A. (2020). Functions of p38 MAP kinases in the central nervous system. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 570586.
- Attia, H. N., and Maklad, Y. A. (2018). Neuroprotective effects of coenzyme Q10 on paraquat-induced Parkinson's disease in experimental animals. *Behavioural Pharmacology*, 29(1), 79-86.
- Ayeni, E. A., Gong, Y., Yuan, H., Hu, Y., Bai, X., and Liao, X. (2022). Medicinal plants for anti-neurodegenerative diseases in west africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 285, 114468.
- Ayyat, P., Şahin, A. S., and Soner, B. C. (2019). Agomelatinin sıçanlarda Parkinson hastalığı ID modeli üzerine etkisi. *Journal of Dr. Behcet Uz Children's Hospital*, 9(3), 216-222.
- Azam, S., Haque, M. E., Balakrishnan, R., Kim, I. S., and Choi, D. K. (2021). The ageing brain: Molecular and cellular basis of neurodegeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 683459.
- Bae, J. R., and Kim, S. H. (2017). Synapses in neurodegenerative diseases. *BMB Reports*, 50(5), 237-246.

- Baev, A. Y., Vinokurov, A. Y., Novikova, I. N., Dremin, V. V., Potapova, E. V., and Abramov, A. Y. (2022). Interaction of mitochondrial calcium and ROS in neurodegeneration. *Cells*, 11(4), 706.
- Baki, L., Shioi, J., Wen, P., Shao, Z., Schwarzman, A., Gama-Sosa, M., Neve, R., and Robakis, N. K. (2004). PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: Effects of FAD mutations. *The EMBO Journal*, 23(13), 2586-2596.
- Balaraman, Y., Limaye, A. R., Levey, A. I., and Srinivasan, S. (2006). Glycogen synthase kinase 3 β and Alzheimer's disease: Pathophysiological and therapeutic significance. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(11), 1226-1235.
- Balon, K., and Wiatrak, B. (2021). PC12 and THP-1 cell lines as neuronal and microglia model in neurobiological research. *Applied Sciences*, 11(9), 3729.
- Bao, G., Li, C., Qi, L., Wang, N., and He, B., (2016). Tetrandrine protects against oxygen-glucose-serum deprivation/reoxygenation-induced injury via PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway in rat spinal cord astrocytes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 925-930.
- Baracaldo-Santamaría, D., Avendaño-Lopez, S. S., Ariza-Salamanca, D. F., Rodriguez-Giraldo, M., Calderon-Ospina, C. A., González-Reyes, R. E., and Nava-Mesa, M. O. (2023). Role of calcium modulation in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 9067.
- Baran S.S. (2022). *İzokinolin grubu bir alkaloid olan allokriptopinin oksidatif stres kaynaklı nöral hasara karşı koruyucu etkinliği ve ilaç adayı olabilme potansiyelinin in-vitro ve in-siliko olarak araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 72-76.
- Baranov, S. V., Baranova, O. V., Yablonska, S., Suofu, Y., Vazquez, A. L., Kozai, T. D., Cui, X. T., Ferrando, L. M., Larkin, T. M., Tyurina, Y. Y., Kagan, V. E., Carlisle, D. L., Kristal, B. S., and Friedlander, R. M. (2019). Mitochondria modulate programmed neuritic retraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(2), 650-659.
- Barnham, K. J., Masters, C. L., and Bush, A. I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drug discovery*, 3(3), 205-214.
- Bazinet, R. P., and Layé, S. (2014). Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(12), 771-785.
- Beaulieu, J. M. (2012). A role for Akt and glycogen synthase kinase-3 as integrators of dopamine and serotonin neurotransmission in mental health. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 37(1), 7-16.
- Belardetti, F., and Zamponi, G. W. (2012). Calcium channels as therapeutic targets. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, 1(4), 433-451.
- Benek, O., Korabecny, J., and Soukup, O. (2020). A perspective on multi-target drugs for Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 41(7), 434-445.

- Benkert, J., Hess, S., Roy, S., Beccano-Kelly, D., Wiederspohn, N., Duda, J., Simons, C., Patil, K., Gaifullina, A., Mannal, N., Dragicevic, E., Spaich, D., Müller, S., Nemeth, J., Hollmann, H., Deuter, N., Mousba, Y., Kubisch, C., Poetschke, C., Striessnig, J., Pongs, O., Schneider, T., Wade-Martins, R., Patel, S., Parlato, R., Frank, T., Kloppenburg, P., and Liss, B. (2019). CaV2.3 channels contribute to dopaminergic neuron loss in a model of Parkinson's disease. *Nature Communications*, 10(1), 1-11.
- Berliocchi, L., Bano, D., and Nicotera, P. (2005). Ca²⁺ signals and death programmes in neurons. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1464), 2255-2258.
- Bezprozvanny, I. (2009). Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 15(3), 89-100.
- Bhat, R. V., Budd Haeberlein, S. L., and Avila, J. (2004). Glycogen synthase kinase 3: A drug target for CNS therapies. *Journal of Neurochemistry*, 89(6), 1313-1317.
- Bhatia, N. K., Srivastava, A., Katyal, N., Jain, N., Khan, M. A. I., Kundu, B., and Deep, S. (2015). Curcumin binds to the pre-fibrillar aggregates of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) and alters its amyloidogenic pathway resulting in reduced cytotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1854(5), 426-436.
- Bhattacharya, S., Ray, R. M., and Johnson, L. R. (2005). Decreased apoptosis in polyamine depleted IEC-6 cells depends on Akt-mediated NF-κB activation but not GSK3β activity. *Apoptosis*, 10, 759-776.
- Blandini, F., Mangiagalli, A., Cosentino, M., Marino, F., Samuele, A., Rasini, E., Fancellu, R., Martignoni, E., Riboldazzi, G., Calandrella, D., Frigo, G. M., and Nappi, G. (2003). Peripheral markers of apoptosis in Parkinson's disease: The effect of dopaminergic drugs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1010(1), 675-678.
- Boczek, T., Lisek, M., Kowalski, A., Pikula, S., Niewiarowska, J., Wiktorska, M., and Zylinska, L. (2012). Downregulation of PMCA2 or PMCA3 reorganizes Ca²⁺ handling systems in differentiating PC12 cells. *Cell Calcium*, 52(6), 433-444.
- Bohush, A., Niewiadomska, G., and Filipek, A. (2018). Role of mitogen activated protein kinase signaling in Parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 2973.
- Borumand, M. R., Motaghinejad, M., Motevalian, M., and Gholami, M. (2019). Duloxetine by modulating the Akt/GSK3 signaling pathways has neuroprotective effects against methamphetamine-induced neurodegeneration and cognition impairment in rats. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 44(2), 146-154.
- Bozkurt, B., Çoban, G., Kaya, G. I., Onur, M. A., and Ünver-Somer, N. (2017a). Alkaloid profiling, anticholinesterase activity and molecular modeling study of *Galanthus elwesii*. *South African Journal of Botany*, 113, 119-127.
- Bozkurt, B., Önür, M. A., Somer, N. Ü., and Kaya Cebioğlu, İ. (2018). *Türkiye florasında yetişen Glaucium türlerinin GC-MS tekniği rehberliğinde alkaloid profillerinin araştırılması ve biyolojik aktivite potansiyellerinin belirlenmesi*. TÜBİTAK 3001 Projesi Sonuç Raporu (315S064), Ankara, 1-66.

- Bozkurt, B., Ulkar, D., Demir, S., Kaya, G., Ünver-Somer, N., and Önür, M. A. (2017b). Identification of isoquinoline alkaloids in *Glaucium acudidentatum* by GC-MS, New & old phytochemicals: Their role in ecology, *Veterinary & Welfare*, 18.
- Brandt, R., Trushina, N. I., and Bakota, L. (2020). Much more than a cytoskeletal protein: Physiological and pathological functions of the non-microtubule binding region of tau. *Frontiers in Neurology*, 11, 590059.
- Bribi, N. (2018). Pharmacological activity of alkaloids: A review. *Asian Journal of Botany*, 1(1), 1-6.
- Brunquell, J., Morris, S., Snyder, A., and Westerheide, S. D. (2018). Coffee extract and caffeine enhance the heat shock response and promote proteostasis in an HSF-1-dependent manner in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Stress and Chaperones*, 23(1), 65-75.
- Buée, L., Bussi re, T., Bu e-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews*, 33(1), 95-130.
- Bustamante, J., Acosta, L., Karadayian, A. G., and Lores-Arnaiz, S. (2019). Ketamine induced cell death can be mediated by voltage dependent calcium channels in PC12 cells. *Experimental and Molecular Pathology*, 111, 104318.
- Cahl kov , L., Vrabec, R., Pidan , F., Pe inov , R., Maafi, N., Mamun, A. A., Ritomsk , A., Wijaya, V., and Blunden, G. (2021). Recent progress on biological activity of amaryllidaceae and further isoquinoline alkaloids in connection with Alzheimer's disease. *Molecules*, 26(17), 5240.
- Cai, C. Z., Zhou, H. F., Yuan, N. N., Wu, M. Y., Lee, S. M. Y., Ren, J. Y., Su, H., Lu, J., Chen, X., Li, M., Tan, J., and Lu, J. H., (2019). Natural alkaloid harmine promotes degradation of alpha-synuclein via PKA-mediated ubiquitin-proteasome system activation. *Phytomedicine*, 61, 152842.
- Cai, W. F., Kang, K., Huang, W., Liang, J. L., Feng, Y. L., Liu, G. S., Chang, D. H., Wen, Z. L., Paul, C., Xu, M., Millard, R. W., and Wang, Y. (2015). CXCR 4 attenuates cardiomyocytes mitochondrial dysfunction to resist ischaemia-reperfusion injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(8), 1825-1835.
- Cargnello, M., and Roux, P. P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 50-83.
- Chang, C. F., Lee, Y. C., Lee, K. H., Lin, H. C., Chen, C. L., Shen, C. K. J., and Huang, C. C., (2016). Therapeutic effect of berberine on TDP-43-related pathogenesis in FTLT and ALS. *Journal of Biomedical Science*, 23(1), 1-12.
- Chang, K. W., Zong, H. F., Ma, K. G., Zhai, W. Y., Yang, W. N., Hu, X. D., Xu, J. H., Chen, X. L., Ji, S. F., and Qian, Y. H. (2018). Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor alleviates A β_{1-42} -induced neurotoxicity via downregulation of p38 and JNK MAPK signaling pathways. *Neurochemistry International*, 120, 238-250.

- Chaudhari, N., Talwar, P., Parimisetty, A., Lefebvre d'Hellencourt, C., and Ravanani, P. (2014). A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 213.
- Chauhan, M., Modi, P. K., and Sharma, P. (2020). Aberrant activation of neuronal cell cycle caused by dysregulation of ubiquitin ligase Itch results in neurodegeneration. *Cell Death & Disease*, 11(6), 1-13.
- Chen, H., Huang, Y., Huang, D., Wu, Z., Li, Y., Zhou, C., and Wei, G. (2018). Protective effect of gigantol against hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat bone marrow mesenchymal stem cells through the PI3K/Akt pathway. *Molecular Medicine Reports*, 17(2), 3267-3273.
- Chen, L., Liu, L., Yin, J., Luo, Y., and Huang, S. (2009). Hydrogen peroxide-induced neuronal apoptosis is associated with inhibition of protein phosphatase 2A and 5, leading to activation of MAPK pathway. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(6), 1284-1295.
- Chen, L., Na, R., Gu, M., Richardson, A., and Ran, Q. (2008). Lipid peroxidation up-regulates BACE1 expression *in vivo*: A possible early event of amyloidogenesis in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 107(1), 197-207.
- Chen, M., Li, L., Liu, C., and Song, L., (2020). Berberine attenuates A β -induced neuronal damage through regulating miR-188/NOS1 in Alzheimer's disease. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 474(1), 285-294.
- Chen, X. H., Zhou, X., Yang, X. Y., Zhou, Z. B., Lu, D. H., Tang, Y., Ling, Z. M., Zhou, L. H., and Feng, X. (2016). Propofol protects against H₂O₂-induced oxidative injury in differentiated PC12 cells via inhibition of Ca²⁺-dependent NADPH oxidase. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(4), 541-551.
- Chen, X., and Pan, W. (2014). The treatment strategies for neurodegenerative diseases by integrative medicine. *Integrative Medicine International*, 1(4), 223-225.
- Chen, X., Guo, C., and Kong, J. (2012). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*, 7(5), 376-385.
- Cheng, B., Martinez, A. A., Morado, J., Scofield, V., Roberts, J. L., and Maffi, S. K. (2013). Retinoic acid protects against proteasome inhibition associated cell death in SH-SY5Y cells via the AKT pathway. *Neurochemistry International*, 62(1), 31-42.
- Cheng, Y. C., Chen, P. Y., Way, T. D., Cheng, C. L., Huang, Y. P., Hsia, T. C., Chou, Y. C., and Peng, S. F. (2021). Pre-treatment of pterostilbene enhances H₂O₂-induced cell apoptosis through caspase-dependent pathway in human keratinocyte cells. *In Vivo*, 35(2), 833-843.
- Cheng, Z., Kang, C., Che, S., Su, J., Sun, Q., Ge, T., Guo, Y., Lv, J., Sun, Z., Yang, W., Li, B., Li, X. and Cui, R. (2022). Berberine: A promising treatment for neurodegenerative diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 845591.

- Chi, H., Chang, H. Y., and Sang, T. K. (2018). Neuronal cell death mechanisms in major neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 3082.
- Chinopoulos, C., & Adam-Vizi, V. (2006). Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology: novel aspects of an enduring theme. *The FEBS Journal*, 273(3), 433-450.
- Chlebek, J., De Simone, A., Hošťálková, A., Opletal, L., Pérez, C., Pérez, D. I., Havlíková L., Cahlíková, L., Andrisano V., and Andrisano, V. (2016). Application of BACE1 immobilized enzyme reactor for the characterization of multifunctional alkaloids from *Corydalis cava* (Fumariaceae) as Alzheimer's disease targets. *Fitoterapia*, 109, 241-247.
- Choi, D., Hwang, S., Lee, E., Yoon, S., Yoon, B. K., and Bae, D. (2004). Expression of mitochondria-dependent apoptosis genes (p53, Bax, and Bcl-2) in rat granulosa cells during follicular development. *The Journal of the Society for Gynecologic Investigation: JSGI*, 11(5), 311-317.
- Choi, H. J., Cha, S. J., Lee, J. W., Kim, H. J., and Kim, K. (2020). Recent advances on the role of GSK3 β in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Sciences*, 10(10), 675.
- Chung, E. S., Bok, E., Sohn, S., Lee, Y. D., Baik, H. H., and Jin, B. K. (2010). GT1b-induced neurotoxicity is mediated by the Akt/GSK-3/tau signaling pathway but not caspase-3 in mesencephalic dopaminergic neurons. *BMC Neuroscience*, 11(1), 1-12.
- Chung, Y. C., Baek, J. Y., Kim, S. R., Ko, H. W., Bok, E., Shin, W. H., Won, S., Jin, B. K., and Jin, B. K., (2017). Capsaicin prevents degeneration of dopamine neurons by inhibiting glial activation and oxidative stress in the MPTP model of Parkinson's disease. *Experimental & Molecular Medicine*, 49(3), e298.
- Cole, A. R. (2013). Glycogen synthase kinase 3 substrates in mood disorders and schizophrenia. *The FEBS Journal*, 280(21), 5213-5227.
- Cole, K. K., and Perez-Polo, J. R. (2002). Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition prevents both apoptotic-like delayed neuronal death and necrosis after H₂O₂ injury. *Journal of Neurochemistry*, 82(1), 19-29.
- Coleman, W. L., Kulp, A. C., and Venditti, J. J. (2015). Functional distribution of synapsin I in human sperm. *FEBS Open Bio*, 5, 801-808.
- Conejero-Goldberg, C., Townsend, K., and Davies, P. (2008). Effects of cell cycle inhibitors on tau phosphorylation in N2aTau3R cells. *Journal of Molecular Neuroscience*, 35, 143-150.
- Congdon, E. E., and Sigurdsson, E. M. (2018). Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 14(7), 399-415.
- Corcia, P., Lunetta, C., Vourc'h, P., Pradat, P. F., and Blasco, H. (2023). Time for optimism in amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neurology*, 30(5), 1459-1464.

- Corsini, S., Tortora, M., Rauti, R., and Nistri, A., (2017). Nicotine protects rat hypoglossal motoneurons from excitotoxic death via downregulation of connexin 36. *Cell Death & Disease*, 8(6), e2881.
- Costa, L. G., Giordano, G., and Guizzetti, M. (2011). *In vitro* neurotoxicology: An introduction. *Methods in Molecular Biology*, 758, 1-9.
- Coşar, G., Bilgehan, H., and Gözler, T. (1981). The antibacterial effects of some alkaloids isolated from *Glaucium flavum* Crantz. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 15(2), 105-109.
- Coxon, K. M., Pahlitzsch, M., Davis, B. M., Duggan, J., Guo, L., and Cordeiro, M. F. (2017). *Retinal ganglion cell apoptosis and neuroprotection*, In: *Reference module in neuroscience and biobehavioral psychology*. Amsterdam: Elsevier, 62-72.
- Cramb, K. M., Beccano-Kelly, D., Cragg, S. J., and Wade-Martins, R. (2023). Impaired dopamine release in Parkinson's disease. *Brain*, awad064.
- Crews, L., Patrick, C., Adame, A., Rockenstein, E., and Masliah, E. (2011). Modulation of aberrant CDK5 signaling rescues impaired neurogenesis in models of Alzheimer's disease. *Cell Death & Disease*, 2(2), e120.
- Cui, J., Zhao, S., Li, Y., Zhang, D., Wang, B., Xie, J., and Wang, J. (2021). Regulated cell death: Discovery, features and implications for neurodegenerative diseases. *Cell Communication and Signaling*, 19(1), 1-29.
- Çankaya, S., Çankaya, B., Kılıç, U., Kılıç, E., and Yuluğ, B. (2019). The therapeutic role of minocycline in Parkinson's disease. *Drugs in Context*, 8, 212553.
- D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582-592.
- Dang, T. K., Hong, S. M., Dao, V. T., Tran, P. T. T., Tran, H. T., Do, G. H., Hai, T. N., Pham, H. T. N., and Kim, S. Y. (2023). Anti-neuroinflammatory effects of alkaloid-enriched extract from *Huperzia serrata* on lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglial cells. *Pharmaceutical Biology*, 61(1), 135-143.
- Darzynkiewicz, Z., Halicka, H. D., Zhao, H. (2010). Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 676, 137-47.
- de la Fuente, A. G., Pelucchi, S., Mertens, J., Di Luca, M., Mauceri, D., and Marcello, E. (2022). Novel therapeutic approaches to target neurodegeneration. *British Journal of Pharmacology*, 180(13), 1651-1673.
- de los Reyes Corrales, T., Losada-Pérez, M., and Casas-Tintó, S. (2021). JNK pathway in CNS pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 3883.
- De Nuccio, F., Cianciulli, A., Porro, C., Kashyryna, M., Ruggiero, M., Calvello, R., Miraglia, A., Nicolardi, G., Lofrumento, D. D., and Panaro, M. A. (2021). Inflammatory response modulation by vitamin C in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Biology*, 10(11), 1155.

- Deheshi, S., Dabiri, B., Fan, S., Tsang, M., and Rintoul, G. L. (2015). Changes in mitochondrial morphology induced by calcium or rotenone in primary astrocytes occur predominantly through ROS-mediated remodeling. *Journal of Neurochemistry*, 133(5), 684-699.
- Demir, S., Ulkar, D., Kaya, G. I., Onur, M. A., Unver, S. N., and Bozkurt, B. (2017). *Differences in the alkaloid composition of Glaucium leiocarpum Boiss. growing in northern and southern areas of Turkey*. Planta Medica International Open Congress, San Francisco, 164.
- Deng, H., and Ma, Z., (2021). Protective effects of berberine against MPTP-induced dopaminergic neuron injury through promoting autophagy in mice. *Food & Function*, 12(18), 8366-8375.
- Deng, X., Gao, F., and May Jr, W. S. (2003). Bcl2 retards G1/S cell cycle transition by regulating intracellular ROS. *Blood*, 102(9), 3179-3185.
- Deng, Y. Q., Xu, G. G., Duan, P., Zhang, Q., and Wang, J. Z. (2005). Effects of melatonin on wortmannin-induced tau hyperphosphorylation. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26(5), 519-526.
- Dey, P., Kundu, A., Kumar, A., Gupta, M., Lee, B. M., Bhakta, T., Dashi S., and Kim, H. S. (2020). Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). *Recent Advances in Natural Products Analysis*, 2020, 505–567.
- Dhanasekaran, D. N., Kashef, K., Lee, C. M., Xu, H., and Reddy, E. P. (2007). Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene*, 26(22), 3185-3202.
- Di Carlo, M., Picone, P., Carrotta, R., Giacomazza, D., & San Biagio, P. L. (2011). *Alzheimer's disease and type 2 diabetes: different pathologies and same features. In Topics in the prevention, treatment and complications of type 2 diabetes*. London: IntechOpen, 1-354.
- Diederich, M., and Ghibelli, L. (2010). The dual role of calcium as messenger and stressor in cell damage, death, and survival. *International Journal of Cell Biology*, 2010, 546163.
- Di Giovanni, S., Movsesyan, V., Ahmed, F., Cernak, I., Schinelli, S., Stoica, B., and Faden, A. I. (2005). Cell cycle inhibition provides neuroprotection and reduces glial proliferation and scar formation after traumatic brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(23), 8333-8338.
- Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., and Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1245049.
- Ding, K., Chen, L., He, J., Wang, J., Yu, C., and Wang, H. (2021). Tetrahydropalmatine alleviates hyperlipidemia by regulating lipid peroxidation, endoplasmic reticulum stress, and inflammasome activation by inhibiting the TLR4-NF- κ B pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 6614985.

- Dolphin, A. C. (2016). Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: Physiology and pathophysiology and pharmacology. *The Journal of Physiology*, 594(19), 5369-5390.
- Domanskyi, A., and Parlato, R. (2022). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Antioxidants*, 11(3), 504.
- Dominguez, N., van Weering, J. R., Borges, R., Toonen, R. F., and Verhage, M. (2018). Dense-core vesicle biogenesis and exocytosis in neurons lacking chromogranins A and B. *Journal of Neurochemistry*, 144(3), 241-254.
- Doncheva, T., Kostova, N., Yordanova, G., Saadi, H., Akrib, F., Dimitrov, D., and Philipov, S. (2014). Comparison of alkaloid profile from *Glaucium corniculatum* (Papaveraceae) of Algerian and Bulgarian origin. *Biochemical Systematics and Ecology*, 56, 278-280.
- Dong, Z., Wang, Y. H., Tang, Z. S., Li, C. H., Jiang, T., Yang, Z. H., and Zeng, J. (2022). Exploring the anti-inflammatory effects of protopine total alkaloids of *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 935201.
- Du, H., and Yan, S. S. (2010). Mitochondrial medicine for neurodegenerative diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(5), 560-572.
- Duarte, A. I., Santos, P., Oliveira, C. R., Santos, M. S., and Rego, A. C. (2008). Insulin neuroprotection against oxidative stress is mediated by Akt and GSK-3 β signaling pathways and changes in protein expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783(6), 994-1002.
- Durães, F., Pinto, M., and Sousa, E. (2018). Old drugs as new treatments for neurodegenerative diseases. *Pharmaceuticals*, 11(2), 44.
- Durairajan, S. S. K., Liu, L. F., Lu, J. H., Chen, L. L., Yuan, Q., Chung, S. K., Huang, L., Li, X. S., Huang, J. D., and Li, M. (2012). Berberine ameliorates β -amyloid pathology, gliosis, and cognitive impairment in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. *Neurobiology of Aging*, 33(12), 2903-2919.
- Eberhardt, O., Coelln, R. V., Kügler, S., Lindenau, J., Rathke-Hartlieb, S., Gerhardt, E., Haid, S., Isenmann, S., Gravel, C., Srivanasan, A., Bahr, M., Weller, M., Dichgans, J., and Schulz, J. B. (2000). Protection by synergistic effects of adenovirus-mediated X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis and glial cell line-derived neurotrophic factor gene transfer in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, 20(24), 9126-9134.
- Efferth, T., and Koch, E. (2011). Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy. *Current Drug Targets*, 12(1), 122-132.
- Ekinci, F. J., Malik, K. U., and Shea, T. B. (1999). Activation of the L voltage-sensitive calcium channel by mitogen-activated protein (MAP) kinase following exposure of neuronal cells to β -amyloid: MAP kinase mediates β -amyloid-induced neurodegeneration. *Journal of Biological Chemistry*, 274(42), 30322-30327.

- El-Afifi, F., al-Eisawi, D., al-Khalil, S., and Schiff Jr, P. L. (1986). Alkaloids of *Glaucium grandiflorum*. *Journal of Natural Products*, 49(6), 1166-1167.
- Ellis, J. G., Davila, M., and Chakrabarti, R. (2003). Potential involvement of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in encystation of a primitive eukaryote, *Giardia lamblia*: Stage-specific activation and intracellular localization. *Journal of Biological Chemistry*, 278(3), 1936-1945.
- Erekat, N. S. (2018). *Apoptosis and its role in Parkinson's disease*, In: *Parkinson's disease: Pathogenesis and clinical aspects*. Brisbane: Exon Publications, 65-82.
- Eroymak, S., and Yiğit, V. (2017). Alzheimer hastalığının maliyet analizi. *Journal of Suleyman Demirel University Institute of Social Sciences*, 29(4), 167-196.
- Essa, M. M., Moghadas, M., Ba-Omar, T., Walid Qoronfleh, M., Guillemin, G. J., Manivasagam, T., Justin-Thenmozhi, A. J., Ray, B., Bhat, A., Chidaambara, S. B., Fernandes, A. J., Song, B. J., and Akbar, M. (2019). Protective effects of antioxidants in Huntington's disease: An extensive review. *Neurotoxicity Research*, 35(3), 739-774.
- Esteras, N., Alquézar, C., Bartolomé, F., De la Encarnación, A., Bermejo-Pareja, F., Molina, J. A., and Martín-Requero, Á. (2015). G1/S cell cycle checkpoint dysfunction in lymphoblasts from sporadic Parkinson's disease patients. *Molecular Neurobiology*, 52(1), 386-398.
- Fadaka, A. O., Ojo, O. A., Osukoya, O. A., Akuboh, O., and Ajiboye, B. O. (2017). Role of p38 MAPK signaling in neurodegenerative diseases: A mechanistic perspective. *Biology Chemistry*, 2, 1026.
- Fan, D., Liu, L., Wu, Z., and Cao, M. (2019). Combating neurodegenerative diseases with the plant alkaloid berberine: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Current Neuropharmacology*, 17(6), 563-579.
- Farkhondeh, T., Mehrpour, O., Buhrmann, C., Pourbagher-Shahri, A. M., Shakibaei, M., and Samarghandian, S. (2020). Organophosphorus compounds and MAPK signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4258.
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., and De Laurenzi, V. (2012). Role of apoptosis in disease. *Aging*, 4(5), 330-349.
- Federico, A., Cardaioli, E., Da Pozzo, P., Formichi, P., Gallus, G. N., and Radi, E. (2012). Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *Journal of the Neurological Sciences*, 322(1-2), 254-262.
- Fedorenko, O. A., Pulbutr, P., Banke, E., Akaniro-Ejim, N. E., Bentley, D. C., Olofsson, C. S., Chan, S., and Smith, P. A. (2020). CaV1.2 and CaV1.3 voltage-gated L-type Ca²⁺ channels in rat white fat adipocytes. *Journal of Endocrinology*, 244(2), 369-381.
- Fedurco, M., Gregorová, J., Šebrlová, K., Kantorová, J., Peš, O., Baur, R., Sigel, E., and Táborská, E. (2015). Modulatory effects of *Eschscholzia californica* alkaloids on recombinant GABAA receptors. *Biochemistry Research International*, 2015, 617620.

- Feng, Y., Wang, B., Du, F., Li, H., Wang, S., Hu, C., Zhu, C., and Yu, X. (2013). The involvement of PI3K-mediated and L-VGCC-gated transient Ca^{2+} influx in 17β -estradiol-mediated protection of retinal cells from H_2O_2 -induced apoptosis with Ca^{2+} overload. *PLoS One*, 8(11), e77218.
- Feng, Y., Wang, D., Wang, Q., Li, Z., Yang, S. L., Feng, Y. L., Luo, T., and Li, Y. (2021). Protective effects and mechanism of hyperoside in PC12 cells against oxidative stress injury induced by hydrogen peroxide. *Natural Product Communications*, 16(5), 1934578X211015126.
- Fielder, E., Von Zglinicki, T., and Jurk, D. (2017). The DNA damage response in neurons: Die by apoptosis or survive in a senescence-like state?. *Journal of Alzheimer's Disease*, 60(s1), S107-S131.
- Frangieh, J., Legendre, C., Bréard, D., Richomme, P., Henrion, D., Fajloun, Z., Mattei, C., Le Ray, A. M., and Legros, C. (2022). Oxostephanine, thalamiculine, and thaliphyline-three isoquinoline alkaloids that inhibit L-type voltage-gated Ca^{2+} channels. *Future Pharmacology*, 2(3), 238-255.
- Fricker, M., Tolkovsky, A. M., Borutaite, V., Coleman, M., and Brown, G. C. (2018). Neuronal cell death. *Physiological Reviews*, 98(2), 813-880.
- Friedman, M., Levin, C. E., Choi, S. H., Kozukue, E., and Kozukue, N. (2006). HPLC analysis of catechins, theaflavins, and alkaloids in commercial teas and green tea dietary supplements: comparison of water and 80% ethanol/water extracts. *Journal of Food Science*, 71(6), 328-337.
- Frontinan-Rubio, J., Sancho-Bielsa, F. J., Peinado, J. R., LaFerla, F. M., Giménez-Llort, L., Durán-Prado, M., and Alcaín, F. J. (2018). Sex-dependent co-occurrence of hypoxia and β -amyloid plaques in hippocampus and entorhinal cortex is reversed by long-term treatment with ubiquinol and ascorbic acid in the 3 $\times$ Tg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 92, 67-81.
- Fujita, Y., Izawa, Y., Ali, N., Kanematsu, Y., Tsuchiya, K., Hamano, S., Tamaki, T., and Yoshizumi, M. (2006). Pramipexole protects against H_2O_2 -induced PC12 cell death. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 372(4), 257-266.
- Fukunaga, K., Izumi, H., Yabuki, Y., Shinoda, Y., Shioda, N., and Han, F. (2019). Alzheimer's disease therapeutic candidate SAK3 is an enhancer of T-type calcium channels. *Journal of Pharmacological Sciences*, 139(2), 51-58.
- Gandhi, S., and Abramov, A. Y. (2012). Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 428010.
- Gao, J., Liu, S., Xu, F., Liu, Y., Lv, C., Deng, Y., Shi, J., and Gong, Q. (2018). Trilobatin protects against oxidative injury in neuronal PC12 cells through regulating mitochondrial ROS homeostasis mediated by AMPK/Nrf2/Sirt3 signaling pathway. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 267.
- Gao, Y., Dong, C., Yin, J., Shen, J., Tian, J., and Li, C. (2012). Neuroprotective effect of fucoidan on H_2O_2 -induced apoptosis in PC12 cells via activation of PI3K/Akt pathway. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 32, 523-529.

- Gaude, E., Schmidt, C., Gammage, P. A., Dugourd, A., Blacker, T., Chew, S. P., Saez-Rodriguez, J., O'Neill, J. S., Szabadkai, G., Minczuk, M., and Frezza, C. (2018). NADH shuttling couples cytosolic reductive carboxylation of glutamine with glycolysis in cells with mitochondrial dysfunction. *Molecular Cell*, 69(4), 581-593.
- Ge, M., Chen, S., Huang, Y., Chen, W., He, L., and Zhang, Y. (2022). Role of calcium homeostasis in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 18, 487-498.
- Getachew, B., Csoka, A. B., Aschner, M., and Tizabi, Y., 2019. Nicotine protects against manganese and iron-induced toxicity in SH-SY5Y cells: Implication for Parkinson's disease. *Neurochemistry International*, 124, 19-24.
- Getlawi, A. O., Shahba, M. A., and Hughes, H. G. (2019). Comparative responses of *Glaucium* spp. to salinity stress. *Horticulture International Journal*, 3(2), 87-98.
- Geva, M., Kusko, R., Soares, H., Fowler, K. D., Birnberg, T., Barash, S., Merelender-Wagner, A., Fine, T., Lysaght, A., Weiner, B., Cha, Y., Kolitz, S., Towfic, F., Orbach, A., Laufer, R., Zeskind, B., Grossman, I., and Hayden, M. R. (2016). Pridopidine activates neuroprotective pathways impaired in Huntington Disease. *Human Molecular Genetics*, 25(18), 3975-3987.
- Ghavami, S., Shojaei, S., Yeganeh, B., Ande, S. R., Jangamreddy, J. R., Mehrpour, M., Christoffersson, J., Chaabane, W., Moghadam, A. R., Kashani, H. H., Hashemi, M., Owji, A. A., and Łos, M. J. (2014). Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*, 112, 24-49.
- Giampieri, F., Mazzoni, L., Gasparini, M., Forbes, T., Afrin, S., Pirkovic, A., Zivkovic, Z., Bajic, V., Dekanski, D., Spremo-Potparevic, B., and Battino, M. (2015). *Cell cycle aberrations and oxidative stress in age related neurodegenerative diseases: The role of food antioxidants*. Growth and Development through Science and Technology Congress, Italy, 61.
- Gil, J. M., and Rego, A. C. (2008). Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *European Journal of Neuroscience*, 27(11), 2803-2820.
- Girdhar, S., Girdhar, A., Verma, S. K., Lather, V., and Pandita, D. (2015). Plant derived alkaloids in major neurodegenerative diseases: From animal models to clinical trials. *Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*, 1(3), 91-100.
- Gitler, A. D., Dhillon, P., and Shorter, J. (2017). Neurodegenerative disease: Models, mechanisms, and a new hope. *Disease Models & Mechanisms*, 10(5), 499-502.
- Gleichmann, M., and Mattson, M. P. (2011). Neuronal calcium homeostasis and dysregulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(7), 1261-1273.
- Glenn, W. S., Runguphan, W., and O'Connor, S. E. (2013). Recent progress in the metabolic engineering of alkaloids in plant systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 354-365.
- Godoy, J. A., Valdivieso, A. G., Inestrosa, N. C., (2018). Nicotine modulates mitochondrial dynamics in hippocampal neurons. *Molecular Neurobiology*, 55(12), 8965-8977.

- Golpich, M., Amini, E., Mohamed, Z., Azman Ali, R., Mohamed Ibrahim, N., and Ahmadiani, A. (2017). Mitochondrial dysfunction and biogenesis in neurodegenerative diseases: Pathogenesis and treatment. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 23(1), 5-22.
- Gonzalez, L. E., Kotler, M. L., Vattino, L. G., Conti, E., Reisin, R. C., Mulatz, K. J., Snutch, T. P., and Uchitel, O. D. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis-immunoglobulins selectively interact with neuromuscular junctions expressing P/Q-type calcium channels. *Journal of Neurochemistry*, 119(4), 826-838.
- Goodnight, A. V., Kremsky, I., Khampang, S., Jung, Y. H., Billingsley, J. M., Bosinger, S. E., Corces, V. G., and Chan, A. W. (2019). Chromatin accessibility and transcription dynamics during *in vitro* astrocyte differentiation of Huntington's disease monkey pluripotent stem cells. *Epigenetics & Chromatin*, 12(1), 1-25.
- Gopalakrishnan, K., and Udayakumar, R. (2014). GC-MS analysis of phytochemicals of leaf and stem of *Marsilea quadrifolia* (L.). *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 4(6), 517-526.
- Gordeeva, A. V., Zvyagilskaya, R. A., and Labas, Y. A. (2003). Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells. *Biochemistry*, 68(10), 1077-1080.
- Gordon, P. H., Moore, D. H., Miller, R. G., Florence, J. M., Verheijde, J. L., Doorish, C., Hilton, J. F., Spiltalny, G. M., MacArthur, R. B., Mitumoto, H., Neville, H. E., Boylan, K., Mozaffar, T., Belsh, J. M., Ravits, J., Bedlack, R. S., Graves, M. C., McCluskey, L. F., Barohn, R., and Tandan, R. (2007). Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: A phase III randomised trial. *The Lancet Neurology*, 6(12), 1045-1053.
- Gorman, A. M. (2008). Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: Recurring themes around protein handling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(6a), 2263-2280.
- Gözler, T. (1982). Alkaloids of Turkish *Glaucium* species 1: Alkaloids of *Glaucium grandiflorum* var *torquatum*. *Planta Medica*, 46(3), 179-180.
- Gu, L., Yu, Q., Li, Q., Zhang, L., Lu, H., and Zhang, X. (2018). Andrographolide protects PC12 cells against β -amyloid-induced autophagy-associated cell death through activation of the Nrf2-mediated p62 signaling pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2844.
- Guan, S., Bao, Y. M., Jiang, B., and An, L. J. (2006). Protective effect of protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* on hydrogen peroxide-induced oxidative PC12 cell death. *European Journal of Pharmacology*, 538(1-3), 73-79.
- Guglielmotto, M., Giliberto, L., Tamagno, E., and Tabaton, M. (2010). Oxidative stress mediates the pathogenic effect of different Alzheimer's disease risk factors. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2, 3.
- Guo, C., Sun, L., Chen, X., and Zhang, D. (2013a). Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*, 8(21), 2003-2014.

- Guo, C., Yang, L., Wan, C. X., Xia, Y. Z., Zhang, C., Chen, M. H., Wang, Z., D., Li, Z. R., Li, X. M., Geng, Y. D., and Kong, L. Y. (2016). Anti-neuroinflammatory effect of sophoraflavanone G from *Sophora alopecuroides* in LPS-activated BV2 microglia by MAPK, JAK/STAT and Nrf2/HO-1 signaling pathways. *Phytomedicine*, 23(13), 1629-1637.
- Guo, J. Q., Gao, X., Lin, Z. J., Wu, W. Z., Huang, L. H., Dong, H. Y., Chen, J., Lu, J., Fu, Y. F., Wang, J., Ma, Y. J., Chen, X. W., Wu, Z. X., He, F. Q., Yang, S. L., Liao, L. M., Zheng, F., and Tan, J. M. (2013b). BMSCs reduce rat granulosa cell apoptosis induced by cisplatin and perimenopause. *BMC cell Biology*, 14, 18.
- Gutiérrez-Grijalva, E. P., López-Martínez, L. X., Contreras-Angulo, L. A., Elizalde-Romero, C. A., and Heredia, J. B. (2020). *Plant alkaloids: Structures and bioactive properties*, In: *Plant-derived bioactives*. Berlin: Springer, 85-117.
- Hadipour, E., Tayarani-Najaran, Z., and Fereidoni, M. (2020). Vitamin K2 protects PC12 cells against A β (1-42) and H₂O₂-induced apoptosis via p38 MAP kinase pathway. *Nutritional Neuroscience*, 23(5), 343-352.
- Haque, M. M., Murale, D. P., Kim, Y. K., and Lee, J. S. (2019). Crosstalk between oxidative stress and tauopathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1959.
- Harper, S. J., and Wilkie, N. (2003). MAPKs: New targets for neurodegeneration. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 7(2), 187-200.
- He, L. Y., Hu, M. B., Li, R. L., Zhao, R., Fan, L. H., Wang, L., Peng, W., Liu, Y. J., and Wu, C. J. (2020). The effect of protein-rich extract from *Bombyx batryticatus* against glutamate-damaged PC12 cells via regulating γ -aminobutyric acid signaling pathway. *Molecules*, 25(3), 553.
- He, Y., Leung, K. W., Zhuo, Y. H., and Ge, J. (2009). Pro370Leu mutant myocilin impairs mitochondrial functions in human trabecular meshwork cells. *Molecular Vision*, 15, 815-823.
- Heck, J., Palmeira Do Amaral, A. C., Weißbach, S., El Khallouqi, A., Bikbaev, A., and Heine, M. (2021). More than a pore: How voltage-gated calcium channels act on different levels of neuronal communication regulation. *Channels*, 15(1), 322-338.
- Hollville, E., Romero, S. E., and Deshmukh, M. (2019). Apoptotic cell death regulation in neurons. *The FEBS Journal*, 286(17), 3276-3298.
- Hooper, C., Meimaridou, E., Tavassoli, M., Melino, G., Lovestone, S., and Killick, R. (2007). p53 is upregulated in Alzheimer's disease and induces tau phosphorylation in HEK293a cells. *Neuroscience Letters*, 418(1), 34-37.
- Howard, R., Zubko, O., Bradley, R., Harper, E., Pank, L., O'Brien, J., Fox, C., Tabet, N., Livingston, G., Bentham, P., McShane, R., Burns, A., Ritchie, C., Reeves, S., Lovestone, S., Ballard, C., Noble, W., Nilforooshan, R., Wilcock, G., and Gray, R. (2020). Minocycline at 2 different dosages vs placebo for patients with mild Alzheimer disease: A randomized clinical trial. *JAMA Neurology*, 77(2), 164-174.

- Hu, Y. Z., Ding, K., Chen, X. N., and Han, T. (2017). *Study on optimization of extraction method of total alkaloids from Zizyphi spinosi semen*. New Jersey: Atlantic Press, 846-854.
- Huang, W., Cheng, P., Yu, K., Han, Y., Song, M., and Li, Y. (2017). Hyperforin attenuates aluminum-induced A β production and tau phosphorylation via regulating Akt/GSK-3 β signaling pathway in PC12 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, 1-6.
- Huang, Y., Sun, L., Zhu, S., Xu, L., Liu, S., Yuan, C., Guo, Y., Wang, X., and Wang, X. (2020). Neuroprotection against Parkinson's disease through the activation of Akt/GSK3 β signaling pathway by tovophyllin A. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 723.
- Huang, Z., Tian, Z., Zhao, Y., Zhu, F., Liu, W., and Wang, X. (2022). MAPK signaling pathway is essential for female reproductive regulation in the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi*. *Cells*, 11(10), 1602.
- Huntington Study Group DOMINO Investigators. (2010). A futility study of minocycline in Huntington's disease. *Movement Disorders*, 25(13), 2219-2224.
- Hussain, G., Rasul, A., Anwar, H., Aziz, N., Razzaq, A., Wei, W., Muhammad, A., Li, J., and Li, X. (2018). Role of plant derived alkaloids and their mechanism in neurodegenerative disorders. *International Journal of Biological Sciences*, 14(3), 341-357.
- Hügel, H. M., de Silva, N. H., Siddiqui, A., Blanch, E., and Lingham, A. (2021). Natural spirocyclic alkaloids and polyphenols as multi target dementia leads. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 43, 116270.
- Ikram, M., Park, T. J., Ali, T., and Kim, M. O., (2020). Antioxidant and neuroprotective effects of caffeine against Alzheimer's and Parkinson's disease: Insight into the role of Nrf-2 and A2AR signaling. *Antioxidants*, 9(9), 902.
- İnternet: Alzheimer İçin Korkutan Uyarı; 2050'de Türkiye 4'üncü Sırada. URL-1: <https://www.cnnturk.com/saglik/alzheimer-icin-korkutan-uyari-2050de-turkiye-4uncu-sirada?page=1>, Son Erişim Tarihi: 25.03.2023.
- İnternet: İşte Türkiye'deki Parkinson İnsidansı. URL-2: <https://medimagazin.com.tr/guncel/iste-turkiyedeki-parkinson-insidansi-50778>, Son Erişim Tarihi: 25.03.2023.
- İnternet: Türkiye Halk Sağlığı ve Kronik Hastalıklar Enstitüsü. URL-3: <https://tuhke.tuseb.gov.tr/haberler/nadir-hastaliklar-raporu-yayinlandi-20221102>, Son Erişim Tarihi: 25.03.2023.
- İnternet: Dementia Statistics. URL-4: <https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/dementia-statistics/>, Son Erişim Tarihi: 25.03.2023.
- İnternet: World Alzheimer Reports 2021. URL-5: <https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2021/>, Son Erişim Tarihi: 25.03.2023.

İnternet: Dementia. URL-6: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>, Son Erişim Tarihi: 25.03.2023.

İnternet: Parkinson Disease. URL-7: <https://emedicine.medscape.com/article/1831191-overview#a6>, Son Erişim Tarihi: 25.03.2023.

İnternet: Huntington's Disease. URL-8: <http://www.neurocntr.com/huntingtons-disease>, Son Erişim Tarihi: 25.03.2023.

İnternet: Gelişmiş Ülkelerde Alzheimer Hastalığı Azalırken, Türkiye'de Artıyor!. URL-9: <https://www.alzheimerdernegi.org.tr/gelismis-ulkelerde-alzheimer-hastaligi-azalirken-turkiyede-artiyor/>, Son Erişim Tarihi: 25.03.2023.

İnternet: A Comprehensive Breakdown of ALS Treatment Costs. URL-10: <https://www.americanlifefund.com/navigating-als-treatment-costs/#:~:text=The%20average%20annual%20cost%20per,and%20%2451%2C000%20in%20,indirect%20costs>, Son Erişim Tarihi: 25.03.2023.

İnternet: Drug Therapy of Neurodegenerative Diseases. URL-11: <https://basicmedicalkey.com/drug-therapy-of-neurodegenerative-diseases/>, Son Erişim Tarihi: 25.03.2023.

İnternet: Verapamil. URL-12: <https://hopes.stanford.edu/verapamil/>, Son Erişim Tarihi: 25.03.2023.

İnternet: Alkaloids. URL-13: <https://www.tcichemicals.com/TH/en/c/10839>, Son Erişim Tarihi: 25.03.2023.

İnternet: Tetrahydroberberine URL-14: <https://www.selleckchem.com/products/tetrahydroberberine.html>, Son Erişim Tarihi: 25.03.2023.

İnternet: *Glaucium grandiflorum* subsp. *refractum* (Nábělek) Mory is an accepted name. URL-15: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2826373>, Son Erişim Tarihi: 25.03.2023.

İnternet: *Glaucium grandiflorum* subsp. *refractum* var. *refractum* (Nábelek) Mory. URL-16: <https://bizimbitkiler.org.tr/v3/demo/details.php?id=9792>, Son Erişim Tarihi: 25.03.2023.

İnternet: Peachtree Corners, Georgia, United States. URL-17: <https://www.researchgate.net/institution/RayBiotech/post/7-Ways-to-Study-Protein-Phosphorylation-63371f97cedd4ee5ee0e3c09>, Son Erişim Tarihi: 25.03.2023.

İnternet: Best Practice for Western Blot Detection of Phosphorylation Events. URL-18: <https://www.bio-rad-antibodies.com/tips-western-blot-detection-of-phosphorylation-events.html>, Son Erişim Tarihi: 25.03.2023.

İnternet: Bizim Bitkiler, Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi. URL-19: <http://www.bizimbitkiler.org.tr>, Son Erişim Tarihi: 25.03.2023.

- Internet: Alkaloids. URL-20: https://www.chemicalbook.com/ProductCatalog_EN/2322-4.htm, Son Erişim Tarihi: 25.03.2023.
- Ip, P., Sharda, P. R., Cunningham, A., Chakrabartty, S., Pande, V., and Chakrabartty, A. (2017). Quercitrin and quercetin 3- β -d-glucoside as chemical chaperones for the A4V SOD1 ALS-causing mutant. *Protein Engineering, Design and Selection*, 30(6), 431-440.
- Ishola, I. O., Akinyede, A. A., Adeluwa, T. P., and Micah, C., (2018). Novel action of vinpocetine in the prevention of paraquat-induced parkinsonism in mice: Involvement of oxidative stress and neuroinflammation. *Metabolic Brain Disease*, 33(5), 1493-1500.
- Islam, M. T. (2017). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurological Research*, 39(1), 73-82.
- ISO, E. (2009). *10993-5 biological evaluation of medical devices, In: Part 5 tests for in vitro cytotoxicity*. Geneva: International Organization for Standardization, 1-34.
- Israilov, I. A., Karimova, S. U., Denisenko, O. N., Yunusov, M. S., Murav'eva, D. A., and Yunusov, S. Y. (1983). Alkaloids of *Glaucium corniculatum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 19(6), 714-716.
- Ivanov, I. G., Vrancheva, R. Z., Aneva, I., Dincheva, I. N., Badjakov, I. K., and Pavlov, A. I. (2020). Alkaloids profiling and acetylcholinesterase inhibitory activity of *Corydalis* species. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 21(53-54), 12-20
- Iyaswamy, A., Krishnamoorthi, S. K., Song, J. X., Yang, C. B., Kaliyamoorthy, V., Zhang, H., Sreenivasmurthy, S. G., Malampati, S., Wang, Z. Y., Zhu, Z., Tong, B. C. K., Cheung, K.H., Lu, J. H., Durairarajan, S. S. K., and Li, M. (2020). NeuroDefend, a novel Chinese medicine, attenuates amyloid- β and tau pathology in experimental Alzheimer's disease models. *Journal of Food and Drug Analysis*, 28(1), 132-146.
- Jadiya, P., Garbincius, J. F., & Elrod, J. W. (2021). Reappraisal of metabolic dysfunction in neurodegeneration: Focus on mitochondrial function and calcium signaling. *Acta Neuropathologica Communications*, 9(1), 124.
- Jara, C., Torres, A. K., Olesen, M. A., and Tapia-Rojas, C. (2020). *Mitochondrial dysfunction as a key event during aging: From synaptic failure to memory loss*, In: *Mitochondria and brain disorders*. London: Intech Open, 1-124.
- Jellinger, K. A. (2010). Basic mechanisms of neurodegeneration: A critical update. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(3), 457-487.
- Jeon, G. S., Shim, Y. M., Lee, D. Y., Kim, J. S., Kang, M., Ahn, S. H., Shin, J. Y., Geum, D., Hong, Y. H., Hong, Y. H., and Sung, J. J. (2019). Pathological modification of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Molecular Neurobiology*, 56(3), 2007-2021.

- Jeong, J. S., Piao, Y., Kang, S., Son, M., Kang, Y. C., Du, X. F., Ryu, J., Cho, Y. W., Jiang, H. H., Oh, M. S., Hong, S. P., Oh, Y. J., and Pak, Y. K. (2018). Triple herbal extract DA-9805 exerts a neuroprotective effect via amelioration of mitochondrial damage in experimental models of Parkinson's disease. *Scientific Reports*, 8(1), 1-13.
- Jiang, F., Gao, R., Liu, H., Zhao, D., Xu, P., Zhang, L., and Qian, X. (2016a). Neuroprotective effect of hyperoside on human PC12 cells against the oxidative damage. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 9(5), 5176-5183.
- Jiang, W., Luo, T., Li, S., Zhou, Y., Shen, X. Y., He, F., Xu, J., and Wang, H. Q. (2016b). Quercetin protects against okadaic acid-induced injury via MAPK and PI3K/Akt/GSK3 β signaling pathways in HT22 hippocampal neurons. *PloS One*, 11(4), e0152371.
- Jiang, W., Wei, W., Gaertig, M. A., Li, S., and Li, X. J., (2015). Therapeutic effect of berberine on Huntington's disease transgenic mouse model. *PLoS One*, 10(7), e0134142.
- Jing, W., Zhang, Y., Dong-Qing, L., Xu-Tao, Y., Jiang, H., and Zhang, Y. (2022). Demethylenetetrahydroberberine protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 20(2), 111-119.
- Jing, X., Sheng, G., Jun, L., De-Bing, W., Yu, C., Xin, H., and Guang-Zhong, Y. (2017). *Garcinia xanthochymus* extract protects PC12 cells from H₂O₂-induced apoptosis through modulation of PI3K/AKT and NRF2/HO-1 pathways. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 15(11), 825-833.
- Johri, A., and Beal, M. F. (2012). Antioxidants in Huntington's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(5), 664-674.
- Joep, R. S., and Roh, M. S. (2006). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. *Current Drug Targets*, 7(11), 1421-1434.
- Joseph, C., Mangani, A. S., Gupta, V., Chitranshi, N., Shen, T., Dheer, Y., Devaraj, K. B., Mirzaei, M., You, Y., Graham, S. L., and Gupta, V. (2020). Cell cycle deficits in neurodegenerative disorders: Uncovering molecular mechanisms to drive innovative therapeutic development. *Aging and Disease*, 11(4), 946-966.
- Joshi, D. R., and Adhikari, N. (2019). An overview on common organic solvents and their toxicity. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 28(3), 1-18.
- Joshi, D., Gupta, G., Narayan, G., Mishra, V. N., Chaurasia, R., Pathak, A., Singh, V. K., and Kumar, A. (2022). GSK-3 β inhibitors can rescue neurons through the prosurvival (autophagy) mechanism in Parkinson's Disease. *Research Square*, 1-16.
- Justin Thenmozhi, A., William Raja, T. R., Manivasagam, T., Janakiraman, U., and Essa, M. M. (2017). Hesperidin ameliorates cognitive dysfunction, oxidative stress and apoptosis against aluminium chloride induced rat model of Alzheimer's disease. *Nutritional Neuroscience*, 20(6), 360-368.

- Kakraba, S., Ayyadevara, S., Penthala, N. R., Balasubramaniam, M., Ganne, A., Liu, L., Allai R., Bommagani, S. B., Barger, S. W., Griffin, W. S. T., Crooks, P. A., and Shmookler Reis, R. J. (2019). A novel microtubule-binding drug attenuates and reverses protein aggregation in animal models of Alzheimer's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 310.
- Kam, A., Li, K. M., Razmovski-Naumovski, V., Nammi, S., Chan, K., Li, Y., and Li, G. Q. (2012). The protective effects of natural products on blood-brain barrier breakdown. *Current Medicinal Chemistry*, 19(12), 1830-1845.
- Kang, J. H., Irwin, D. J., Chen-Plotkin, A. S., Siderowf, A., Caspell, C., Coffey, C. S., Waligórska, T., Taylor, P., Pan, S., Frasier, M., Marek, K., Kieburtz, K., Jennings, D., Simuni, T., Tanner, C. M., Singleton, A., Toga, A. W., Chowdhury, S. Mollenhauer, B., Trojanowski, J. Q., and Shaw, L. M. (2013). Association of cerebrospinal fluid β -amyloid₁₋₄₂, T-tau, P-tau181, and α -synuclein levels with clinical features of drug-naive patients with early Parkinson disease. *JAMA Neurology*, 70(10), 1277-1287.
- Kannurpatti, S. S. (2017). Mitochondrial calcium homeostasis: Implications for neurovascular and neurometabolic coupling. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 37(2), 381-395.
- Kanwal, N., and Tahir, A. (2018). *Single nucleotide polymorphism quantitative polymerase chain reaction assay: Detection of mandarin in orange juice*, In: *Fruit juices*. Cambridge: Academic Press, 805-822.
- Karunakaran, S., and Ravindranath, V. (2009). Activation of p38 MAPK in the substantia nigra leads to nuclear translocation of NF- κ B in MPTP-treated mice: Implication in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 109(6), 1791-1799.
- Kaufmann, P., Thompson, J. L., Levy, G., Buchsbaum, R., Shefner, J., Krivickas, L. S., Katz, J., Rollins, Y., Barohn, R. J., Jackson, C. E., Tiriyaki, E., Lomen-Hoerth, C., Armon, C., Tandan, R., Rudnicki, S. A., Rezaia, K., Sufit, R., Pestronk, A., Novella, S. P., Heiman-Patterson, T., Kasarskis, E. J., Pioro, E. P., Montes, J., Arbing, R., Vecchio, D., Barsdorf, A., Mitsumoto, H., and Levin, B. (2009). Phase II trial of CoQ10 for ALS finds insufficient evidence to justify phase III. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 66(2), 235-244.
- Kavitha, R. V., Kumar, J. R., Egbuna, C., and Ifemeje, J. C. (2020). *Phytochemicals as therapeutic interventions in neurodegenerative diseases*, In: *Phytochemicals as lead compounds for new drug discovery*. Amsterdam: Elsevier, 161-178.
- Kennedy, D. O., and Wightman, E. L. (2011). Herbal extracts and phytochemicals: Plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Advances in Nutrition*, 2(1), 32-50.
- Kent, S. A., Spires-Jones, T. L., and Durrant, C. S. (2020). The physiological roles of tau and A β : Implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics. *Acta Neuropathologica*, 140(4), 417-447.

- Khamtache-Abderrahim, S., Lequart-Pillon, M., Gontier, E., Gaillard, I., Pilard, S., Mathiron, D., Djoudad-Kadji, H., and Maiza-Benabdesselam, F. (2016). Isoquinoline alkaloid fractions of *Fumaria officinalis*: Characterization and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. *Industrial Crops and Products*, 94, 1001-1008.
- Khan, A., Jahan, S., Imtiyaz, Z., Alshahrani, S., Antar Makeen, H., Mohammed Alshehri, B., Kumar, A., Arafah, A., and Rehman, M. U. (2020). Neuroprotection: Targeting multiple pathways by naturally occurring phytochemicals. *Biomedicines*, 8(8), 284.
- Khan, F., Garg, V. K., Singh, A. K., and Kumar, T. (2018). Role of free radicals and certain antioxidants in the management of huntington's disease: A review. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, 7(4), 386-392.
- Kheiri, G., Dolatshahi, M., Rahmani, F., and Rezaei, N. (2018). Role of p38/MAPKs in Alzheimer's disease: Implications for amyloid beta toxicity targeted therapy. *Reviews in the Neurosciences*, 30(1), 9-30.
- Khoramian Tusi, S., Babaei Abraki, S., Amini, M., and Khodagholi, F. (2012). Modulation of H₂O₂-induced neurite outgrowth impairment and apoptosis in PC12 cells by a 1, 2, 4-triazine derivative. *Basic and Clinical Neuroscience*, 3(5), 49-60.
- Kılıç, F. M., Yıldız, K., and Kılıç, M. (2018). Türkiye'de yayılış gösteren bazı *Glaucium* mill. (Papaveraceae) taksonlarının habitat özellikleri. *Turkish Journal of Life Sciences*, 3(2), 255-262.
- Kılıç, F. M., Yıldız, K., and Kılıç, M. (2019). *Glaucium flavum* Crantz (Papaveraceae) türünün morfolojik özellikleri ve Türkiye'deki yayılış alanları. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 9(1), 415-422.
- Kim, E. K., and Choi, E. J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1802(4), 396-405.
- Kim, E. K., and Choi, E. J. (2015). Compromised MAPK signaling in human diseases: An update. *Archives of Toxicology*, 89(6), 867-882.
- Kim, E. K., Lee, S. J., Moon, S. H., Jeon, B. T., Kim, B. K., Park, T. K., Han, J. S., and Park, P. J. (2010b). Neuroprotective effects of a novel peptide purified from venison protein. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(4), 700-707.
- Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J., and Yoon, S. (2015). The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Experimental Neurobiology*, 24(4), 325-340.
- Kim, J., Lee, H. J., and Lee, K. W. (2010a). Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 112(6), 1415-1430.
- Kim, S. Y., Bae, S., Choi, K. H., and An, S. (2011). Hydrogen peroxide controls Akt activity via ubiquitination/degradation pathways. *Oncology Reports*, 26(6), 1561-1566.
- Kim, S., and Rhim, H. (2011). Effects of amyloid- β peptides on voltage-gated L-type CaV1.2 and CaV1.3 Ca²⁺ channels. *Molecules and Cells*, 32(3), 289-294.

- Kim, S., Seo, J. H., and Suh, Y. H. (2004). α -synuclein, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 10, S9-S13.
- Kintsurashvili, L. G., and Vachnadze, V. Y. (2000). Alkaloids of *Glaucium corniculatum* and *G. flavum* growing in Georgia. *Chemistry of Natural Compounds*, 36(2), 225-226.
- Kirouac, L., Rajic, A. J., Cribbs, D. H., and Padmanabhan, J. (2017). Activation of Ras-ERK signaling and GSK-3 by amyloid precursor protein and amyloid beta facilitates neurodegeneration in Alzheimer's disease. *eNeuro*, 4(2), ENEURO.0149-16.2017.
- Kitagishi, Y., Nakanishi, A., Ogura, Y., and Matsuda, S. (2014). Dietary regulation of PI3K/AKT/GSK-3 β pathway in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 6(3), 1-7.
- Klein, J. A., and Ackerman, S. L. (2003). Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(6), 785-793.
- Kleyer, H., Tecon, R., and Or, D. (2017). Resolving species level changes in a representative soil bacterial community using microfluidic quantitative PCR. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2017.
- Kocanci, F. G., and Aslim, B. (2017). Neuroprotective effects of rutin and quercetin flavonoids in *Glaucium corniculatum* methanol and water extracts. *International Journal of Secondary Metabolite*, 4(3), 85-93.
- Kocanci, F. G., and Aslim, B. (2021). Chemical composition and neurotherapeutic potential of *Glaucium corniculatum* extracts. *Pharmacognosy Magazine*, 17(73), 67-75.
- Kocanci, F., Hamamcıoglu, B., and Aslim, B. (2017). The anti-AChE and anti-proliferative activities of *Glaucium acutidentatum* and *Glaucium corniculatum* alkaloid extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(8), 191-200.
- Kocanci, F., Hamamcıoglu, B., and Aslim, B. (2022). The relationship between neuroprotective activity and antigenotoxic and acetylcholinesterase inhibitory effects of *Glaucium corniculatum* extracts. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58.
- Koche, D., Shirsat, R., and Kawale, M. (2016). An overview of major classes of phytochemicals: Their types and role in disease prevention. *Hislopia Journal*, 9(1/2), 0976-2124.
- Koçancı F.G. (2018). *Nöral hastalıklarda alternatif bir ilaç adayı olabilecek Glaucium corniculatum ekstraktlarının apoptoz, inflamasyon ve asetilkolinesteraz (AChE)'i baskılama potansiyellerine göre etkilerinin araştırılması*. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 63-68.
- Koh, S. H., Baek, W., and Kim, S. H. (2011). Brief review of the role of glycogen synthase kinase-3 β in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology Research International*, 2011, 205761.

- Konappa, N., Udayashankar, A. C., Krishnamurthy, S., Pradeep, C. K., Chowdappa, S., and Jogaiah, S. (2020). GC-MS analysis of phytoconstituents from *Amomum nilgiricum* and molecular docking interactions of bioactive serverogenin acetate with target proteins. *Scientific Reports*, 10(1), 1-23.
- Konno, T., Melo, E. P., Chambers, J. E., and Avezov, E. (2021). Intracellular sources of ROS/H₂O₂ in health and neurodegeneration: Spotlight on endoplasmic reticulum. *Cells*, 10(2), 233.
- Koshimura, K., Tanaka, J., Murakami, Y., and Kato, Y. (2003). Effect of high concentration of glucose on dopamine release from pheochromocytoma-12 cells. *Metabolism*, 52(7), 922-926.
- Kosina, P., Gregorova, J., Gruz, J., Vacek, J., Kolar, M., Vogel, M., Ross, W., Naumann, K., Simanek, V., and Ulrichova, J. (2010). Phytochemical and antimicrobial characterization of *Macleaya cordata* herb. *Fitoterapia*, 81(8), 1006-1012.
- Koza, L. A., Winter, A. N., Holsopple, J., Baybayon-Grandgeorge, A. N., Pena, C., Olson, J. R., Mazzarino, R. C., Patterson, D., and Linseman, D. A. (2020). Protocatechuic acid extends survival, improves motor function, diminishes gliosis, and sustains neuromuscular junctions in the hSOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nutrients*, 12(6), 1824.
- Kozikowski, A. P., Gaisina, I. N., Petukhov, P. A., Sridhar, J., King, L. T., Blond, S. Y., Duka, T., Rusnak, M., and Sidhu, A. (2006). Highly potent and specific GSK-3 β inhibitors that block tau phosphorylation and decrease α -synuclein protein expression in a cellular model of Parkinson's disease. *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery*, 1(2), 256-266.
- Kömürcü-Bayrak, E., Poda, M., Güven, G., Güçlü-Geyik, F., Çoban, N., Güleç, Ç., Abacı, N., Akbaş, F., and Erginel-Ünaltuna, N. (2015). 15 yıllık Huntington hastalığı genetik test sonuçları ve literatürdeki hh test kılavuzları. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 5(10), 10-16.
- Kudo, T. A., Kanetaka, H., Mochizuki, K., Tominami, K., Nunome, S., Abe, G., Kosukegawa, H., Abe, T., Mori, H., Mori, K., Takagi, T., and Izumi, S. I. (2015). Induction of neurite outgrowth in PC12 cells treated with temperature-controlled repeated thermal stimulation. *PLoS One*, 10(4), e0124024.
- Kukula-Koch, W. A., and Widelski, J. (2017). *Alkaloids, In: Pharmacognosy*. Cambridge: Academic Press, 1-738.
- Kumar, A., and Ratan, R. R. (2016). Oxidative stress and Huntington's disease: The good, the bad, and the ugly. *Journal of Huntington's disease*, 5(3), 217-237.
- Kumar, A., and Singh, A. (2015). A review on mitochondrial restorative mechanism of antioxidants in Alzheimer's disease and other neurological conditions. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 206.
- Kumar, A., Bodhinathan, K., and Foster, T. C. (2009). Susceptibility to calcium dysregulation during brain aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 1, 2.

- Kumar, G. P., and Khanum, F. (2012). Neuroprotective potential of phytochemicals. *Pharmacognosy Reviews*, 6(12), 81-90.
- Kumar, G. P., Anilakumar, K. R., and Naveen, S. (2015). Phytochemicals having neuroprotective properties from dietary sources and medicinal herbs. *Pharmacognosy Journal*, 7 (1), 1-17.
- Kumar, S., Seal, C. J., Howes, M. J. R., Kite, G. C., and Okello, E. J. 2010. *In vitro* protective effects of *Withania somnifera* (L.) dunal root extract against hydrogen peroxide and β -amyloid (1–42)-induced cytotoxicity in differentiated PC12 cells. *Phytotherapy Research*, 24(10), 1567-1574.
- Kumari, R., Shekhar, N., and Tyagi, S. (2021). Mitochondrial dysfunctions and neurodegenerative diseases: A mini-review. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, 10(4), 147-149.
- Kurz, A., and Perneczky, R. (2011). Novel insights for the treatment of Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(2), 373-379.
- La, C., Ganbold, T., Gaowa, S., Qiburi, Q., Temuqile, T., and Baigude, H. (2020). Eerdun wurile protects neuron and promotes neurite outgrowth through regulation of apoptotic gene expression in PC-12 cells. *Journal of Medicinal Plants Research*, 14(10), 526-534.
- Lacraz, G., Figeac, F., Movassat, J., Kassis, N., and Portha, B. (2010). Diabetic GK/Par rat β -cells are spontaneously protected against H_2O_2 -triggered apoptosis. A cAMP-dependent adaptive response. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 298(1), E17-E27.
- Lamptey, R. N., Chaulagain, B., Trivedi, R., Gothwal, A., Layek, B., and Singh, J. (2022). A review of the common neurodegenerative disorders: Current therapeutic approaches and the potential role of nanotherapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1851.
- Langley, B. C. (2007). *The cell cycle and oxidative neuronal cell death*, In: *Oxidative stress and neurodegenerative disorders*. Amsterdam: Elsevier, 165-182.
- Langley, B., and Ratan, R. R. (2004). Oxidative stress-induced death in the nervous system: Cell cycle dependent or independent?. *Journal of Neuroscience Research*, 77(5), 621-629.
- Lastres-Becker, I., De Miguel, R., De Petrocellis, L., Makriyannis, A., Di Marzo, V., and Fernández-Ruiz, J., (2003). Compounds acting at the endocannabinoid and/or endovanilloid systems reduce hyperkinesia in a rat model of Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 84(5), 1097-1109.
- Lauretti, E., Dincer, O., and Praticò, D. (2020). Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1867(5), 118664.

- Leandrou, E., Emmanouilidou, E., and Vekrellis, K. (2019). Voltage-gated calcium channels and α -synuclein: Implications in Parkinson's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 237.
- Lee, C. C., Huang, C. C., Wu, M. Y., and Hsu, K. S. (2005). Insulin stimulates postsynaptic density-95 protein translation via the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 280(18), 18543-18550.
- Lee, D., Choi, H. G., Hwang, J. H., Shim, S. H., and Kang, K. S. (2020). Neuroprotective effect of tricyclic pyridine alkaloids from *Fusarium lateritium* SSF2, against glutamate-induced oxidative stress and apoptosis in the HT22 hippocampal neuronal cell line. *Antioxidants*, 9(11), 1115.
- Lee, H. G., Casadesus, G., Zhu, X., Castellani, R. J., McShea, A., Perry, G., Petersen, R. B., Bajic, V., and Smith, M. A. (2009b). Cell cycle re-entry mediated neurodegeneration and its treatment role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 54(2), 84-88.
- Lee, J. K., and Kim, N. J. (2017). Recent advances in the inhibition of p38 MAPK as a potential strategy for the treatment of Alzheimer's disease. *Molecules*, 22(8), 1287.
- Lee, K. M., Lee, A. S., and Choi, I. (2017). *Melandrii* herba extract attenuates H₂O₂-induced neurotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells and scopolamine-induced memory impairment in mice. *Molecules*, 22(10), 1646.
- Lee, S. M., Yoon, M. Y., and Park, H. R. (2008). Protective effects of *Paeonia lactiflora* pall on hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(5), 1272-1277.
- Lee, Y. J., Park, K. H., Park, H. H., Kim, Y. J., Lee, K. Y., Kim, S. H., and Koh, S. H. (2009a). Cilnidipine mediates a neuroprotective effect by scavenging free radicals and activating the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Journal of Neurochemistry*, 111(1), 90-100.
- Lenkiewicz, A. M., Czapski, G. A., Jęsko, H., Wilkaniec, A., Szypuła, W., Pietrosiuk, A., Uszyńska, A. M., and Adamczyk, A. (2016). Potent effects of alkaloid-rich extract from *Huperzia selago* against sodium nitroprusside-evoked PC12 cells damage via attenuation of oxidative stress and apoptosis. *Folia Neuropathologica*, 54(2), 156-166.
- L'episcopo, F., Drouin-Ouellet, J., Tirolo, C., Pulvirenti, A., Giugno, R., Testa, N., Caniglia, S., Serapide, M. F., Cisbani, G., Barker, R. A., Cicchetti, F., and Marchetti, B. (2016). GSK-3 β -induced Tau pathology drives hippocampal neuronal cell death in Huntington's disease: Involvement of astrocyte-neuron interactions. *Cell Death & Disease*, 7(4), e2206-e2206.
- Leung, W. C., Zheng, H., Huen, M., Law, S. L., and Xue, H. (2003). Anxiolytic-like action of orally administered DL-tetrahydropalmatine in elevated plus-maze. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27(5), 775-779.
- Levy, O. A., Malagelada, C., and Greene, L. A. (2009). Cell death pathways in Parkinson's disease: Proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis*, 14(4), 478-500.

- Li, B., Huang, A. L., Zhang, Y. L., Li, Z., Ding, H. W., Huang, C., Meng, X. and Li, J. (2017). Design, synthesis and evaluation of hesperetin derivatives as potential multifunctional anti-Alzheimer agents. *Molecules*, 22(7), 1067.
- Li, J., Li, B., Huang, H., Han, T., and Li, Y. (2019). Allocryptopine: A review of its properties and mechanism of antiarrhythmic effect. *Current Protein and Peptide Science*, 20(10), 996-1003.
- Li, P., and Li, Z. (2015). Neuroprotective effect of paeoniflorin on H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells by modulation of reactive oxygen species and the inflammatory response. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 9(5), 1768-1772.
- Li, R., Lu, Y., Zhang, Q., Liu, W., Yang, R., Jiao, J., Liu, J., Gao, G., and Yang, H., (2021). Piperine promotes autophagy flux by P2RX4 activation in SNCA/ α -synuclein-induced Parkinson disease model. *Autophagy*, 18(3), 559-575.
- Li, R., Wang, Y., Yang, Z., He, Y., Zhao, T., Fan, M., Wang, X., Zhu, L., and Wang, X. (2015b). Hypoxia-inducible factor-1 α regulates the expression of L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels in PC12 cells under hypoxia. *Cell Stress and Chaperones*, 20(3), 507-516.
- Li, T., Shi, H., and Zhao, Y. (2018). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by mitogen-activated protein kinase in Alzheimer's disease. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 394(2), 022023.
- Li, X. Y., Mei, G. H., Dong, Q., Zhang, Y., Guo, Z. L., Su, J. J., Tang, Y., P., Jin, X. H., Zhou, H. G., and Huang, Y. Y., (2015a). Enhanced neuroprotective effects of coadministration of tetrandrine with glutathione in preclinical model of parkinson's disease. *Parkinson's Disease*, 2015, 931058.
- Li, Y., Sattler, R., Yang, E. J., Nunes, A., Ayukawa, Y., Akhtar, S., Ji, G., Zhang, P. W., and Rothstein, J. D., (2011). Harmine, a natural beta-carboline alkaloid, upregulates astroglial glutamate transporter expression. *Neuropharmacology*, 60(7-8), 1168-1175.
- Libro, R., Giacoppo, S., Soundara Rajan, T., Bramanti, P., and Mazzon, E. (2016). Natural phytochemicals in the treatment and prevention of dementia: An overview. *Molecules*, 21(4), 518.
- Lieberthal, W., Menza, S. A., and Levine, J. S. (1998). Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 274(2), F315-F327.
- Lima, J. A., and Hamerski, L. (2019). Alkaloids as potential multi-target drugs to treat Alzheimer's disease. *Studies in Natural Products Chemistry*, 61, 301-334.
- Limanaqi, F., Biagioni, F., Mastroiacovo, F., Polzella, M., Lazzeri, G., and Fornai, F. (2020). Merging the multi-target effects of phytochemicals in neurodegeneration: From oxidative stress to protein aggregation and inflammation. *Antioxidants*, 9(10), 1022.
- Lin, K., Liu, Y. Q., Xu, B., Gao, J. L., Fu, Y. C., Chen, Y., Xue, Q., and Li, Y. (2013). Allocryptopine and benzyltetrahydropalmatine block hERG potassium channels expressed in HEK293 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(6), 847-858.

- Lin, M. T., and Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443(7113), 787-795.
- Lin, P., Tian, X. H., Yi, Y. S., Jiang, W. S., Zhou, Y. J., and Cheng, W. J. (2015). Luteolin-induced protection of H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells and the associated pathway. *Molecular Medicine Reports*, 12(5), 7699-7704.
- Lin, X., Wu, S., Wang, Q., Shi, Y., Liu, G., Zhi, J., and Wang, F. (2016). Saikosaponin-D reduces H₂O₂-induced PC12 cell apoptosis by removing ROS and blocking MAPK-dependent oxidative damage. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36, 1365-1375.
- Linan-Rico, A., Ochoa-Cortes, F., Zuleta-Alarcon, A., Alhaj, M., Tili, E., Enneking, J., Harzman, A., Grants, I., Bergase, S., and Christofi, F. L. (2017). UTP-gated signaling pathways of 5-HT release from BON cells as a model of human enterochromaffin cells. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 429.
- Liss, B., and Striessnig, J. (2019). The potential of L-type calcium channels as a drug target for neuroprotective therapy in Parkinson's disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 59, 263-289.
- Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Hart, G. W., and Gong, C. X. (2004). O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: A mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(29), 10804-10809.
- Liu, J. H., Bao, Y. M., Song, J. J., & An, L. J. (2003). Codonopsis pilosula (Franch) Nannf total alkaloids potentiate neurite outgrowth induced by nerve growth factor in PC12 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 24(9), 913-917.
- Liu, J. H., Yin, F., Guo, L. X., Deng, X. H., and Hu, Y. H. (2009). Neuroprotection of geniposide against hydrogen peroxide induced PC12 cells injury: Involvement of PI3 kinase signal pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(2), 159-165.
- Liu, J., Li, Q., Liu, Z., Lin, L., Zhang, X., Cao, M., and Jiang, J. (2016). Harmine induces cell cycle arrest and mitochondrial pathway-mediated cellular apoptosis in SW620 cells via inhibition of the Akt and ERK signaling pathways. *Oncology Reports*, 35(6), 3363-3370.
- Liu, J., Zhang, L., Zhang, J., Li, B., and Zhang, M. (2019). *Curcuma kwangsiensis* extracts produced antioxidant effects against injury induced by H₂O₂ on PC12 cells. *Records of Natural Products*, 13(3), 254-267.
- Liu, L., Liu, M., Zhao, W., Zhao, Y. L., and Wang, Y. (2021b). Tetrahydropalmatine regulates BDNF through TrkB/CAM interaction to alleviate the neurotoxicity induced by methamphetamine. *ACS Chemical Neuroscience*, 12(18), 3373-3386.
- Liu, L., Zeng, Z., Gaur, U., Fang, J., and Little, P. J. (2017b). Berberine protects against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in PC12 cells through activation of ERK1/2 pathway. *Journal of Clinical and Experimental Pharmacology*, 7 (236), 2161-1459.

- Liu, M. H., Yuan, C., He, J., Tan, T. P., Wu, S. J., Fu, H. Y., Liu, J., Yu, S., Chen, Y. D., Le, Q. F., Tian, W., Hu, H. J., Zhang, Y., and Lin, X. L. (2015a). Resveratrol protects PC12 cells from high glucose-induced neurotoxicity via PI3K/Akt/FoxO3a pathway. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35(4), 513-522.
- Liu, M., Xu, Y., Han, X., Liang, C., Yin, L., Xu, L., Qi, Y., Zhao, Y., Peng, J., and Sun, C. (2014). Potent effects of flavonoid-rich extract from *Rosa laevigata* Michx fruit against hydrogen peroxide-induced damage in PC12 cells via attenuation of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Molecules*, 19(8), 11816-11832.
- Liu, P., Chen, X., Zhou, H., Wang, L., Zhang, Z., Ren, X., Zhu, F., Huang, X., Liu, J., Spencer, P. S., and Yang, X. (2018). The isoquinoline alkaloid dauricine targets multiple molecular pathways to ameliorate Alzheimer-like pathological changes *in vitro*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 2025914.
- Liu, W., Liu, X., Tian, L., Gao, Y., Liu, W., Chen, H., Jiang, X., Xu, Z., Ding, H., and Zhao, Q., (2021a). Design, synthesis and biological evaluation of harmine derivatives as potent GSK-3 β /DYRK1A dual inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 222, 113554.
- Liu, Y., Pi, T., Yang, X., and Shi, J. (2021c). Protective effects and mechanisms of *Dendrobium nobile* Lindl. alkaloids on PC12 cell damage induced by A β ₂₅₋₃₅. *Behavioural Neurology*, 2021, 9990375.
- Liu, Z., Li, P., Wu, J., Yi, W., Ping, L., and Xinxin, H. (2015b). *The cascade of oxidative stress and tau protein autophagic dysfunction in Alzheimer's disease*, In: *Alzheimer's disease- challenges for the future*, London: InTechOpen, 1-372.
- Liu, Z., Zhou, T., Ziegler, A. C., Dimitrion, P., and Zuo, L. (2017a). Oxidative stress in neurodegenerative diseases: From molecular mechanisms to clinical applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 2525967.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_T$} method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lleo, A., Greenberg, S. M., and Growdon, J. H. (2006). Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annual Review of Medicine*, 57, 513-533.
- Long, H. Z., Cheng, Y., Zhou, Z. W., Luo, H. Y., Wen, D. D., and Gao, L. C. (2021). PI3K/AKT signal pathway: A target of natural products in the prevention and treatment of Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 648636.
- López, V., and Calvo, M. I. (2011). White tea (*Camellia sinensis* Kuntze) exerts neuroprotection against hydrogen peroxide-induced toxicity in PC12 cells. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(1), 22-26.
- López-Grueso, M. J., Padilla, C. A., Bárcena, J. A., and Requejo-Aguilar, R. (2020). Parkinson's related protein DJ-1 is involved in aberrant cell cycle re-entry through Cdk5. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 43(2), 757-769.

- Lorío, G., Avila, J., and Díaz-Nido, J. (2001). Modifications of tau protein during neuronal cell death. *Journal of Alzheimer's Disease*, 3(6), 563-575.
- LoRusso, E., Hickman, J. J., and Guo, X. (2019). Ion channel dysfunction and altered motoneuron excitability in ALS. *Neurological Disorders & Epilepsy Journal*, 3(2), 124.
- Low, H. B., and Zhang, Y. (2016). Regulatory roles of MAPK phosphatases in cancer. *Immune Network*, 16(2), 85-98.
- Lu, G. S., Jiang, Z. O., Huang, Z. F., Hu, X. X., Tan, X., and Huang, J. Y. (2019). Analysis of chemical constituents and activity on *Zanthoxylum nitidum* Husk. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 15(44), 154-160.
- Lu, X., Zhang, Y., Li, H., Jin, Y., Zhao, L., and Wang, X., (2021). Nicotine prevents *in vivo* A β toxicity in *Caenorhabditis elegans* via SKN-1. *Neuroscience Letters*, 761, 136114.
- Lu, X., Zhang, Y., Li, H., Jin, Y., Zhao, L., and Wang, X., (2021). Nicotine prevents *in vivo* A β toxicity in *Caenorhabditis elegans* via SKN-1. *Neuroscience Letters*, 761, 136114.
- Luk, K. C. (2019). Oxidative stress and α -synuclein conspire in vulnerable neurons to promote Parkinson's disease progression. *The Journal of Clinical Investigation*, 129(9), 3530-3531.
- Luo, C. L., Huang, Y. C., Huang, B., Lu, T., and Fu, Y. S., (2017). Caffeine may affect apoptosis and autophagy activity to promote dopaminergic cells survival under the rotenone induced Parkinson disease model. *The FASEB Journal*, 31(S1), 659-8.
- Lushchak, V. I. (2021). Interplay between bioenergetics and oxidative stress at normal brain aging. Aging as a result of increasing disbalance in the system oxidative stress–energy provision. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 473, 713–722.
- Lv, R., Du, L., Lu, C., Wu, J., Ding, M., Wang, C., Mao, N., and Shi, Z. (2017). Allicin protects against H₂O₂-induced apoptosis of PC12 cells via the mitochondrial pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(3), 2053-2059.
- Magi, S., Castaldo, P., Macrì, M. L., Maiolino, M., Matteucci, A., Bastioli, G., Gratteri, S., Amoroso, S., and Lariccia, V. (2016). Intracellular calcium dysregulation: Implications for Alzheimer's disease. *BioMed Research International*, 2016, 6701324.
- Maharjan, S., Serova, L. I., and Sabban, E. L. (2010). Membrane-initiated estradiol signaling increases tyrosine hydroxylase promoter activity with ER α in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, 112(1), 42-55.
- Majd, S., Chegini, F., Chataway, T., Zhou, X. F., and Gai, W. (2013). Reciprocal induction between α -synuclein and β -amyloid in adult rat neurons. *Neurotoxicity Research*, 23(1), 69-78.
- Malik, R., and Wiedau, M. (2020). Therapeutic approaches targeting protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 98.

- Mamelak, M. (2018). Parkinson's disease, the dopaminergic neuron and gammahydroxybutyrate. *Neurology and Therapy*, 7(1), 5-11.
- Manczak, M., Anekonda, T. S., Henson, E., Park, B. S., Quinn, J., and Reddy, P. H. (2006). Mitochondria are a direct site of A β accumulation in Alzheimer's disease neurons: Implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Human Molecular Genetics*, 15(9), 1437-1449.
- Mandal, P., Sahoo, D., Saha, S., and Chowdhury, J. (2018). Sensing of different human telomeric G-quadruplex DNA topologies by natural alkaloid allocryptopine using spectroscopic techniques. *The Journal of Physical Chemistry B*, 122(45), 10279-10290.
- 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.
- Mao, W., Iwai, C., Keng, P. C., Vulapalli, R., and Liang, C. S. (2006). Norepinephrine-induced oxidative stress causes PC-12 cell apoptosis by both endoplasmic reticulum stress and mitochondrial intrinsic pathway: Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase survival pathway. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 290(5), C1373-C1384.
- Mari, G., Catalani, S., Antonini, E., De Crescentini, L., Mantellini, F., Santeusano, S., Lombardi, P., Amicucci, A., Battistelli, S., Benedetti, S., and Palma, F. (2018). Synthesis and biological evaluation of novel heteroring-annulated pyrrolino-tetrahydroberberine analogues as antioxidant agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(18), 5037-5044.
- Marino, A., Battaglini, M., Moles, N., and Ciofani, G. (2022). Natural antioxidant compounds as potential pharmaceutical tools against neurodegenerative diseases. *ACS Omega*, 7(30), 25974-25990.
- Martini, F., Rosa, S. G., Klann, I. P., Fulco, B. C. W., Carvalho, F. B., Rahmeier, F. L., Fernandes, M. C., and Nogueira, C. W. (2019). A multifunctional compound ebselen reverses memory impairment, apoptosis and oxidative stress in a mouse model of sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Psychiatric Research*, 109, 107-117.
- Maruyama, W., Akao, Y., Carrillo, M. C., Kitani, K. I., Youdium, M. B., and Naoi, M. (2002). Neuroprotection by propargylamines in Parkinson's disease: Suppression of apoptosis and induction of prosurvival genes. *Neurotoxicology and Teratology*, 24(5), 675-682.
- Mathur, S., Gawas, C., Ahmad, I. Z., Wani, M., and Tabassum, H. (2023). Neurodegenerative disorders: Assessing the impact of natural vs drug-induced treatment options. *Aging Medicine*, 6(1), 82-97.
- Matlahov, I., and van der Wel, P. C. (2019). Conformational studies of pathogenic expanded polyglutamine protein deposits from Huntington's disease. *Experimental Biology and Medicine*, 244(17), 1584-1595.

- Mattson, M. P. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(2), 120-130.
- Maximova, A., Werry, E. L., and Kassiou, M. (2021). Senolytics: A novel strategy for neuroprotection in ALS?. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 12078.
- McAlary, L., Aquilina, J. A., and Yerbury, J. J. (2016). Susceptibility of mutant SOD1 to form a destabilized monomer predicts cellular aggregation and toxicity but not *in vitro* aggregation propensity. *Frontiers in Neuroscience*, 10, 499.
- McGarry, A., McDermott, M., Kieburz, K., de Blic, E. A., Beal, F., Marder, K., Ross, C., Shoulson, I., Gilbert, P., Mallonee, W. M., Guttman, M., Wojcieszek, J., Kumar, R., LeDoux, M. S., Jenkins, M., Rosas, H. D., Nance, M., Biglan, K., Como, P., Dubinsky, R. M., Shannon, K. M., O'Suilleabhain, P., Chou, K., Walker, F., Martin, W., Wheelock, V. L., McCusker, E., Jankovic, J., Singer, C., Sanchez-Ramos, J., Scott, B., Suchowersky, O., Factor, S. A., Higgins Jr, D. S., Molho, E., Revilla, F., Caviness, J. N., Friedman, J. H., Perlmutter, J. S., Feigin, A., Anderson, K., Rodriguez, R., McFarland, N. R., Margolis, R. L., Farbman, E. S., Raymond, L. A., Suski, V., Kostyk, S., Colcher, A., Seeberger, L., Epping, E., Esmail, S., Diaz, N., Fung, W. L. A., Diamond, A., Frank, S., Hanna, P., Hermanowicz, N., Dure, L. S. and Cudkowicz, M. (2017). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of coenzyme Q10 in Huntington disease. *Neurology*, 88(2), 152-159.
- Medina Benavente, J. J., Mogami, H., Sakurai, T., and Sawada, K. (2014). Evaluation of silicon nitride as a substrate for culture of PC12 cells: An interfacial model for functional studies in neurons. *PLoS One*, 9(2), e90189.
- Mejia, R. O. S., and Friedlander, R. M. (2001). Caspases in Huntington's disease. *The Neuroscientist*, 7(6), 480-489.
- Melov, S., Adlard, P. A., Morten, K., Johnson, F., Golden, T. R., Hinerfeld, D., Schilling, B., Mavros, C., Masters, C. L., Volitakis, I., Li, Q. X., Loughton, K., Hubbard, A., Cherny, R. A., Gibson, B., and Bush, A. I. (2007). Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau. *PloS One*, 2(6), e536.
- Meng, T., Fu, S., He, D., Hu, G., Gao, X., Zhang, Y., Huang, B., Du, J., Zhou, A., Su, Y., and Liu, D., (2021). Evodiamine inhibits lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in BV-2 cells via regulating AKT/Nrf2-HO-1/NF- κ B signaling axis. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 41 (1), 115-127.
- Mensah, M. L., Komlaga, G., Forkuo, A. D., Firempong, C., Anning, A. K., and Dickson, R. A. (2019). Toxicity and safety implications of herbal medicines used in Africa. *Herbal Medicine*, 63, 1992-0849.
- Mercado-Gómez, O., Hernández-Fonseca, K., Villavicencio-Queijeiro, A., Massieu, L., Chimal-Monroy, J., and Arias, C. (2008). Inhibition of Wnt and PI3K signaling modulates GSK-3 β activity and induces morphological changes in cortical neurons: Role of tau phosphorylation. *Neurochemical Research*, 33(8), 1599-1609.
- Meszlényi, V., Patai, R., Nógrádi, B., Engelhardt, J. I., and Siklós, L. (2017). Commentary: Calcium in the pathomechanism of amyotrophic lateral sclerosis-Taking center stage?. *Journal of Neurology & Neuromedicine*, 2(4), 1031-1039.

- Meydani, M., Hernandez-Rodriguez, J., Youdim, M. B., and Gutierrez-Robledo, L. M. (2001). Antioxidants and cognitive function/discussion/comment. *Nutrition Reviews*, 59(8), S75-80.
- Michel, P. P., Hirsch, E. C., and Hunot, S. (2016). Understanding dopaminergic cell death pathways in Parkinson disease. *Neuron*, 90(4), 675-691.
- Mietelska-Porowska, A., Wasik, U., Goras, M., Filipek, A., and Niewiadomska, G. (2014). Tau protein modifications and interactions: Their role in function and dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 4671-4713.
- Mills, J. C., Lee, V. M., and Pittman, R. N. (1998). Activation of a PP2A-like phosphatase and dephosphorylation of tau protein characterize onset of the execution phase of apoptosis. *Journal of Cell Science*, 111(5), 625-636.
- Minakawa, E. N., and Nagai, Y. (2021). Protein aggregation inhibitors as disease-modifying therapies for polyglutamine diseases. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 621996.
- Miranda, A. S., Cardozo, P. L., Silva, F. R., de Souza, J. M., Olmo, I. G., Cruz, J. S., Gomez, M. V., Ribeiro, F. M., and Vieira, L. B. (2019). Alterations of calcium channels in a mouse model of Huntington's disease and neuroprotection by blockage of CaV1 channels. *ASN Neuro*, 11, 1759091419856811.
- Mitsiades, C. S., Mitsiades, N., Poulaki, V., Schlossman, R., Akiyama, M., Chauhan, D., Hideshima, T., Treon, S. P., Munshi, N. C., Richardson, P. G., and Anderson, K. C. (2002). Activation of NF- κ B and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: Therapeutic implications. *Oncogene*, 21(37), 5673-5683.
- Moh, C., Kubiak, J. Z., Bajic, V. P., Zhu, X., Smith, M. A., and Lee, H. G. (2011). Cell cycle deregulation in the neurons of Alzheimer's disease. *Cell Cycle in Development*, 53, 565-576.
- Mohammad, S., Hutchinson, K. A., da Silva, D. F., Bhattacharjee, J., McInnis, K., Burger, D., and Adamo, K. B. (2021). Circulating small extracellular vesicles increase after an acute bout of moderate-intensity exercise in pregnant compared to non-pregnant women. *Scientific Reports*, 11(1), 1-10.
- Molatore, S., Liyanarachchi, S., Irmeler, M., Perren, A., Mannelli, M., Ercolino, T., Beuschlein, F., Jarzab, B., Wloch, J., Ziaja, J., Zoubaa, S., Neff, F., Beckers, J., Höfler, H., Atkinson, M. J., and Pellegata, N. S. (2010). Pheochromocytoma in rats with multiple endocrine neoplasia (MENX) shares gene expression patterns with human pheochromocytoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(43), 18493-18498.
- Moloney, C. M., Lowe, V. J., and Murray, M. E. (2021). Visualization of neurofibrillary tangle maturity in Alzheimer's disease: A clinicopathologic perspective for biomarker research. *Alzheimer's & Dementia*, 17(9), 1554-1574.

- Morales, I., Guzmán-Martínez, L., Cerda-Troncoso, C., Farías, G. A., and Maccioni, R. B. (2014). Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 112.
- Morales-Gonzalez, J. A. (Ed.). (2013). *Oxidative stress and chronic degenerative diseases: A role for antioxidants*. BoD—Books on Demand.
- Morén, C., deSouza, R. M., Giraldo, D. M., and Uff, C. (2022a). Antioxidant therapeutic strategies in neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9328.
- Morén, C., Treder, N., Martínez-Pinteño, A., Rodríguez, N., Arbelo, N., Madero, S., Gómez, M., Mas, S., Gassó, P., and Parellada, E. (2022b). Systematic review of the therapeutic role of apoptotic inhibitors in neurodegeneration and their potential use in Schizophrenia. *Antioxidants*, 11(11), 2275.
- Morrison, R. S., Kinoshita, Y., Johnson, M. D., Ghatan, S., Ho, J. T., and Garden, G. (2003). Neuronal survival and cell death signaling pathways. *Molecular and Cellular Biology of Neuroprotection in the CNS*, 513, 41-86.
- Mortada, I., Farah, R., Nabha, S., Ojcius, D. M., Fares, Y., Almawi, W. Y., and Sadier, N. S. (2021). Immunotherapies for neurodegenerative diseases. *Frontiers in Neurology*, 12, 654739.
- Morteza-Semnani, K., Saeedi, M., and Hamidian, M. (2004). Anti-inflammatory and analgesic activity of the topical preparation of *Glaucium grandiflorum*. *Fitoterapia*, 75(2), 123-129.
- Morteza-Semnani, K., Saeedi, M., Hamidian, M., Vafamehr, H., and Dehpour, A. R. (2002). Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Glaucium grandiflorum* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 80(2-3), 181-186.
- Morteza-Semnani, K., Saeedi, M., and Mahdavi, M. R. (2005). Antibacterial studies on extracts of three species of *Glaucium* from Iran. *Pharmaceutical Biology*, 43(3), 234-236.
- 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.
- Moujalled, D., Strasser, A., and Liddell, J. R. (2021). Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases. *Cell Death & Differentiation*, 28(7), 2029-2044.
- Moura, D. J., Richter, M. F., Boeira, J. M., Pêgas Henriques, J. A., and Saffi, J. (2007). Antioxidant properties of β -carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. *Mutagenesis*, 22(4), 293-302.
- Muddapu, V. R., Dharshini, S., Chakravarthy, V. S., and Gromiha, M. M. (2020). Neurodegenerative diseases—is metabolic deficiency the root cause?. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 213.

- Mungan, F. (2016). *Türkiye'nin Glaucium Mill. (Papaveraceae) cinsinin revizyonu*. Doktora Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa, 1-137.
- Muraleva, N. A., Kolosova, N. G., and Stefanova, N. A. (2021). MEK1/2-ERK pathway alterations as a therapeutic target in sporadic Alzheimer's disease: A study in senescence-accelerated OXYS rats. *Antioxidants*, 10(7), 1058.
- Muralidar, S., Ambi, S. V., Sekaran, S., Thirumalai, D., and Palaniappan, B. (2020). Role of tau protein in Alzheimer's disease: The prime pathological player. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 1599-1617.
- Muthaiyah, B., Essa, M. M., Chauhan, V., and Chauhan, A. (2011). Protective effects of walnut extract against amyloid beta peptide-induced cell death and oxidative stress in PC12 cells. *Neurochemical Research*, 36(11), 2096-2103.
- Müller, M., Ahumada-Castro, U., Sanhueza, M., Gonzalez-Billault, C., and Cárdenas, C. (2018). Mitochondria and calcium regulation as basis of neurodegeneration associated with aging. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 470.
- Nagy, Z. (2000). Cell cycle regulatory failure in neurones: Causes and consequences. *Neurobiology of Aging*, 21(6), 761-769.
- Naini, S. M. A., and Soussi-Yanicostas, N. (2015). Tau hyperphosphorylation and oxidative stress, a critical vicious circle in neurodegenerative tauopathies?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 151979.
- Nair, V. D., and Olanow, C. W. (2008). Differential modulation of Akt/glycogen synthase kinase-3 β pathway regulates apoptotic and cytoprotective signaling responses. *Journal of Biological Chemistry*, 283(22), 15469-15478.
- Nakajima, Y., Nishida, H., Nakamura, Y., and Konishi, T. (2009). Prevention of hydrogen peroxide-induced oxidative stress in PC12 cells by 3, 4-dihydroxybenzalacetone isolated from Chaga (*Inonotus obliquus* (persoon) Pilat). *Free Radical Biology and Medicine*, 47(8), 1154-1161.
- Naoi, M., Shamoto-Nagai, M., and Maruyama, W. (2019). Neuroprotection of multifunctional phytochemicals as novel therapeutic strategy for neurodegenerative disorders: Antiapoptotic and antiamyloidogenic activities by modulation of cellular signal pathways. *Future Neurology*, 14(1), FNL9.
- Nawaz, H., Shad, M. A., Rehman, N., Andaleeb, H., and Ullah, N. (2020). Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56, e17129.
- Neshatia, V., Matin, M. M., Iranshahi, M., Bahrami, A. R., Behravan, J., Mollazadeh, S., and Rassouli, F. B. (2009). Cytotoxicity of vincristine on the 5637 cell line is enhanced by combination with conferone. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 64(5-6), 317-322.
- Ng, Y. P., Or, T. C. T., and Ip, N. Y. (2015). Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 89, 260-270.

- Nie, J., Tian, Y., Zhang, Y., Lu, Y. L., Li, L. S., and Shi, J. S. (2016). *Dendrobium* alkaloids prevent A β_{25-35} -induced neuronal and synaptic loss via promoting neurotrophic factors expression in mice. *PeerJ*, 4, e2739.
- Niedzielska, E., Smaga, I., Gawlik, M., Moniczewski, A., Stankowicz, P., Pera, J., and Filip, M. (2016). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Molecular Neurobiology*, 53(6), 4094-4125.
- Nimmrich, V., and Eckert, A. (2013). Calcium channel blockers and dementia. *British Journal of Pharmacology*, 169(6), 1203-1210.
- Nimmrich, V., and Gross, G. (2012). P/Q-type calcium channel modulators. *British Journal of Pharmacology*, 167(4), 741-759.
- Ninds Net-Pd Investigators. (2008). A pilot clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson disease: 18-month results. *Clinical neuropharmacology*, 31(3), 141-150.
- Nisha, K., Darshana, M., Madhu, G., and Bhupendra, M. K. (2011). GC-MS analysis and anti-microbial activity of *Psidium guajava* (leaves) grown in Malva region of India. *International Journal of Drug Development and Research*, 3(4), 237-45.
- Novak, V., Dolejš, L., Slavík, J. (1972). Alkaloids of the papaveraceae. XLVIII. (-)-Stylophine methohydroxide, a new alkaloid from *Glaucium corniculatum* CURT., *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 37(10), 3346-3349.
- Ohayagi, Y., Asahara, H., Chui, D. H., Tsuruta, Y., Sakae, N., Miyoshi, K., Yamada, T., Kikuchi, H., Taniwaki, T., Murai, H., Ikezoe, K., Furuya, H., Kawarabayashi, T., Shoji, M., Checler, F., Iwaki, T., Makifuchi, T., Takeda, K., Kira, J. I., and Tabira, T. (2005). Intracellular A β_{42} activates p53 promoter: A pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*, 19(2), 1-29.
- Olatunji, O. J., Chen, H., and Zhou, Y. (2017). Neuroprotective effect of trans-N-caffeoyltyramine from *Lycium chinense* against H₂O₂ induced cytotoxicity in PC12 cells by attenuating oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 895-902.
- Olufunmilayo, E. O., Gerke-Duncan, M. B., and Holsinger, R. D. (2023). Oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative disorders. *Antioxidants*, 12(2), 517.
- Oñate, M., Catenaccio, A., Salvadores, N., Saquel, C., Martinez, A., Moreno-Gonzalez, I., Gamez, N., Soto, P., Soto, C., Hetz, C., and Court, F. A. (2020). The necroptosis machinery mediates axonal degeneration in a model of Parkinson disease. *Cell Death & Differentiation*, 27(4), 1169-1185.
- Orhan, I., Özçelik, B., and Şener, B. (2007b). Antiviral and antimicrobial evaluation of some heterocyclic compounds from Turkish plants. *Bioactive Heterocycles V*, 11, 303–323.
- Orhan, I., Özçelik, B., Karaoğlu, T., and Şener, B. (2007a). Antiviral and antimicrobial profiles of selected isoquinoline alkaloids from *Fumaria* and *Corydalis* species. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62(1-2), 19-26.

- Orhan, I., Şener, B., Choudhary, M. I., and Khalid, A. (2004). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(1), 57-60.
- Orhan, İ., and Şener, B. (2006). Lead compounds and drug candidates from some Turkish plants for human health. *Advances in Phytomedicine*, 2, 331-352.
- Orlowska, A., Perera, P. T., Al Kobaisi, M., Dias, A., Nguyen, H. K. D., Ghanaati, S., Baulin, V., Crawford, R. J., and Ivanova, E. P. (2017). The effect of coatings and nerve growth factor on attachment and differentiation of pheochromocytoma cells. *Materials*, 11(1), 60.
- Ostrowski, T. D., Dantzler, H. A., Polo-Parada, L., and Kline, D. D. (2017). H₂O₂ augments cytosolic calcium in nucleus tractus solitarii neurons via multiple voltage-gated calcium channels. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 312(5), C651-C662.
- Ovádi, J., and Orosz, F. (2008). *Protein folding and misfolding: Neurodegenerative diseases*. Berlin: Springer, 1-278.
- Öniz H. (2003). Apoptoz ölmeye yatmak. *SSK Tepecik Hastanesi Dergisi*, 14 (1), 1-20.
- Özsoy, N., Yılmaz-Özden, T., Aksoy-Sağırlı, P., Şahin, H., and Sarı, A. (2018). Antioxidant, anti-acetylcholinesterase, anti-inflammatory and dna protection activities of *Glaucium grandiflorum* var. *grandiflorum*. *Iranian Journal of Pharmaceutical research: IJPR*, 17(2), 677-684.
- Page, L. S. (2013). *Modulation of neuronal R-Type Ca²⁺ channels (CaV2.3) by G protein-coupled receptors*. Honors Program, Utah State University Biology in the Department of Science, Logan, 1-24.
- Palomo, V., Nozal, V., Rojas-Prats, E., Gil, C., and Martinez, A. (2021). Protein kinase inhibitors for amyotrophic lateral sclerosis therapy. *British Journal of Pharmacology*, 178(6), 1316-1335.
- Pang, C., Yang, H., Hu, B., Wang, S., Chen, M., Cohen, D. S., Chen, H. S., Jarrell, J. T., Carpenter, K. A., Rosin, E. R., and Huang, X. (2019). Identification and analysis of Alzheimer's candidate genes by an amplitude deviation algorithm. *Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism*, 9(1), 460.
- Pang, S., Sun, C., Gao, S., Yang, Y., Pan, X., and Zhang, L., (2020). Evodiamine derivatives improve cognitive abilities in APPswe/PS1ΔE9 transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Animal Models and Experimental Medicine*, 3(2), 193-199.
- Park, C. M., and Xian, M. (2015). Use of phosphorodithioate-based compounds as hydrogen sulfide donors. *Methods in Enzymology*. 554, 127-42.
- Park, J. E., Lee, S. T., Im, W. S., Chu, K., and Kim, M., (2008). Galantamine reduces striatal degeneration in 3-nitropropionic acid model of Huntington's disease. *Neuroscience Letters*, 448(1), 143-147.

- Park, Y. G., Kim, J., and Kim, D. (2013). The potential roles of T-type Ca^{2+} channels in motor coordination. *Frontiers in Neural Circuits*, 7, 172.
- Parkinson Study Group QE3 Investigators. (2014). A randomized clinical trial of high-dosage coenzyme Q10 in early parkinson disease no evidence of benefit. *JAMA Neurology*, 75(1), 543-552.
- Pasko, V. I., Churkina, A. S., Shakhov, A. S., Kotlobay, A. A., and Alieva, I. B. (2023). Modeling of neurodegenerative diseases: 'Step by step' and 'network' organization of the complexes of model systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 604.
- Pasteuning-Vuhman, S., de Jongh, R., Timmers, A., and Pasterkamp, R. J. (2021). Towards advanced iPSC-based drug development for neurodegenerative disease. *Trends in Molecular Medicine*, 27(3), 263-279.
- Patel, F., and Mandal, P. (2019). *Neurodegenerative diseases and their therapeutic approaches*, In: *Neurons dendrites and axons*. London: InTechOpen, 1-128.
- Pchitskaya, E., Popugaeva, E., and Bezprozvanny, I. (2018). Calcium signaling and molecular mechanisms underlying neurodegenerative diseases. *Cell Calcium*, 70, 87-94.
- Pei, J. J., Khatoon, S., An, W. L., Nordlinder, M., Tanaka, T., Braak, H., Tsujio, M., Alafuzoff, I., Winblad, B., Cowburn, R. F., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2003). Role of protein kinase B in Alzheimer's neurofibrillary pathology. *Acta Neuropathologica*, 105, 381-392.
- Penke, B., Szűcs, M., and Bogár, F. (2020). Oligomerization and conformational change turn monomeric β -amyloid and tau proteins toxic: Their role in Alzheimer's pathogenesis. *Molecules*, 25(7), 1659.
- Pera, M., Camps, P., Munoz-Torrero, D., Perez, B., Badia, A., and Clos Guillen, M. V. (2013). Undifferentiated and differentiated PC12 cells protected by huprines against injury induced by hydrogen peroxide. *PLoS One*, 8(9), e74344.
- Petruczynik, A. (2012). Analysis of alkaloids from different chemical groups by different liquid chromatography methods. *Open Chemistry*, 10(3), 802-835.
- Phillipson, J. D., Gray, A. I., Askari, A. A., Khalil, A. A. (1981). Alkaloids from Iraqi species of papaveraceae. *Journal of Natural Products*, 44(3), 296-307.
- Pillai, S. S., and Mini, S. (2016). *Hibiscus rosa sinensis* Linn. petals modulates glycogen metabolism and glucose homeostasis signalling pathway in streptozotocin-induced experimental diabetes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(1), 42-48.
- Pingali, S., Donahue, J. P., and Payton-Stewart, F. (2015). Tetrahydroberberine, a pharmacologically active naturally occurring alkaloid. *Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry*, 71(4), 262-265.

- Pires Da Silva, J., Monceaux, K., Guilbert, A., Gressette, M., Piquereau, J., Novotova, M., Ventura-Clapier, R., Garnier, A., and Lemaire, C. (2020). SIRT1 protects the heart from ER stress-induced injury by promoting eEF2K/eEF2-dependent autophagy. *Cells*, 9(2), 426.
- Plazas, E., Avila, M. C., Muñoz, D. R., and Cusa, L. E. (2022). Natural isoquinoline alkaloids: Pharmacological features and multi-target potential for complex diseases. *Pharmacological Research*, 177, 106126.
- Plyte, S. E., Hughes, K., Nikolakaki, E., Pulverer, B. J., and Woodgett, J. R. (1992). Glycogen synthase kinase-3: Functions in oncogenesis and development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1114(2-3), 147-162.
- Poddar, M. K., Chakraborty, A., and Banerjee, S. (2021). *Neurodegeneration: Diagnosis, prevention, and therapy*, In: *Oxidoreductase*. London: InTechOpen, 1-180.
- Poon, R. Y. (2016). Cell cycle control: A system of interlinking oscillators. *Cell Cycle Oscillators*, 1342, 3-19.
- Poppek, D., Keck, S., Ermak, G., Jung, T., Stolzing, A., Ullrich, O., Davies, K. J. A., Grune, T., and Grune, T. (2006). Phosphorylation inhibits turnover of the tau protein by the proteasome: Influence of RCAN1 and oxidative stress. *Biochemical Journal*, 400(3), 511-520.
- Preininger, V. (1985). *Chemotaxonomy of the papaveraceae alkaloids*, In: *The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids*. Berlin: Springer, 23-37.
- Proft, J., and Weiss, N. (2015). Looking for answers to L-type calcium channels in the ageing brain (Commentary on Zanos et al.). *European Journal of Neuroscience*, 42(8), 2496-2498.
- Qi, S., Feng, Z., Li, Q., Qi, Z., and Zhang, Y. (2018). Inhibition of ROS-mediated activation Src-MAPK/AKT signaling by orientin alleviates H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells. *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 3973-3984.
- Qi, Z., Qi, S., Gui, L., Shen, L., and Feng, Z. (2016). Daphnetin protects oxidative stress-induced neuronal apoptosis via regulation of MAPK signaling and HSP70 expression. *Oncology Letters*, 12(3), 1959-1964.
- Qian, Y. F., Wang, H., Yao, W. B., and Gao, X. D. (2008). Aqueous extract of the Chinese medicine, Danggui-Shaoyao-San, inhibits apoptosis in hydrogen peroxide-induced PC12 cells by preventing cytochrome c release and inactivating of caspase cascade. *Cell Biology International*, 32(2), 304-311.
- Qiu, C., Wang, Y. P., Pan, X. D., Liu, X. Y., Chen, Z., and Liu, L. B. (2016). Exendin-4 protects A β (1-42) oligomer-induced PC12 cell apoptosis. *American Journal of Translational Research*, 8(8), 3540-3548.
- Qu, Z., Zhang, J., Yang, H., Huo, L., Gao, J., Chen, H., and Gao, W. (2016). Protective effect of tetrahydropalmatine against D-galactose induced memory impairment in rat. *Physiology & Behavior*, 154, 114-125.

- Rad, E. S., Eidi, A., Minai-Tehrani, D., Bonakdar, S., and Shoeibi, S. (2022). Neuroprotective effect of root extracts of *Berberis vulgaris* (Barberry) on oxidative stress on SH-SY5Y Cells. *Journal of Pharmacopuncture*, 25(3), 216-223.
- Radak, Z., Zhao, Z., Goto, S., and Koltai, E. (2011). Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. *Molecular Aspects of Medicine*, 32(4-6), 305-315.
- Raffaele, I., Silvestro, S., and Mazzon, E. (2023). MicroRNAs and MAPKs: Evidence of these molecular interactions in Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4736.
- Ragagnin, A. M., Shadfar, S., Vidal, M., Jamali, M. S., and Atkin, J. D. (2019). Motor neuron susceptibility in ALS/FTD. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 532.
- Ragot, K., Delmas, D., Athias, A., Nury, T., Baarine, M., and Lizard, G. (2011). α -Tocopherol impairs 7-ketocholesterol-induced caspase-3-dependent apoptosis involving GSK-3 activation and Mcl-1 degradation on 158N murine oligodendrocytes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164(6), 469-478.
- Rajmohan, R., and Reddy, P. H. (2017). Amyloid-beta and phosphorylated tau accumulations cause abnormalities at synapses of Alzheimer's disease neurons. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(4), 975-999.
- Ramalingam, M., and Kim, S. J. (2012). Reactive oxygen/nitrogen species and their functional correlations in neurodegenerative diseases. *Journal of Neural Transmission*, 119(8), 891-910.
- Ratra, M., Sharma, P. L., and Gupta, R., (2011). Neuroprotective effect of vinpocetine against 3-NP induced reduction of body weight and oxidative stress in rats. *International Journal of Phytomedicine*, 3(2011), 362-369.
- Raturi, A., Ortiz-Sandoval, C., and Simmen, T. (2014). Redox dependence of endoplasmic reticulum (ER) Ca^{2+} signaling.
- Reddy, P., Hemsworth, J., Guthridge, K. M., Vinh, A., Vassiliadis, S., Ezernieks, V., Spangenberg, G. C., and Rochfort, S. J. (2020). Ergot alkaloid mycotoxins: Physiological effects, metabolism and distribution of the residual toxin in mice. *Scientific Reports*, 10(1), 1-10.
- Redza-Dutordoir, M., and Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(12), 2977-2992.
- Rekatsina, M., Paladini, A., Piroli, A., Zis, P., Pergolizzi, J. V., and Varrassi, G. (2020). Pathophysiology and therapeutic perspectives of oxidative stress and neurodegenerative diseases: A narrative review. *Advances in Therapy*, 37(1), 113-139.
- Ren, D., Fu, Y., Wang, L., Liu, J., Zhong, X., Yuan, J., Jiang, C., Wang, H. and Li, Z., (2021). Tetrandrine ameliorated Alzheimer's disease through suppressing microglial inflammatory activation and neurotoxicity in the 5XFAD mouse. *Phytomedicine*, 90, 153627.

- Requejo-Aguilar, R. (2023). Cdk5 and aberrant cell cycle activation at the core of neurodegeneration. *Neural Regeneration Research*, 18(6), 1186-1190.
- Reyes, N. A., Fisher, J. K., Austgen, K., VandenBerg, S., Huang, E. J., and Oakes, S. A. (2010). Blocking the mitochondrial apoptotic pathway preserves motor neuron viability and function in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(10), 3673-3679.
- Ribe, E. M., Serrano-Saiz, E., Akpan, N., and Troy, C. M. (2008). Mechanisms of neuronal death in disease: Defining the models and the players. *Biochemical Journal*, 415(2), 165-182.
- Riccardi, C., and Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*, 1(3), 1458-1461.
- Rippin, I., Bonder, K., Joseph, S., Sarsor, A., Vaks, L., and Eldar-Finkelman, H. (2021). Inhibition of GSK-3 ameliorates the pathogenesis of Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, 154, 105336.
- Rodríguez, L. R., Lapeña-Luzón, T., Benetó, N., Beltran-Beltran, V., Pallardó, F. V., Gonzalez-Cabo, P., and Navarro, J. A. (2022). Therapeutic strategies targeting mitochondrial calcium signaling: a new hope for neurological diseases?. *Antioxidants*, 11(1), 165.
- Rodríguez-Santana, I., Mestre, T., Squitieri, F., Willock, R., Arnesen, A., Clarke, A., D'Alessio, B., Fisher, A., Fuller, R., Hamilton, J. L., Hubberstey, H., Stanley, C., Vetter, L., Winkelmann, M., Doherty, M., Wu, Y., Finnegan, A., and Frank, S. (2022). Economic burden of Huntington's disease in Europe and the USA: Results from the Huntington's Disease burden of illness study (HDBOI). *European Journal of Neurology*, 30(4), 1109-1117.
- Rohn, T. T. (2010). The role of caspases in Alzheimer's disease; Potential novel therapeutic opportunities. *Apoptosis*, 15(11), 1403-1409.
- Romero, A., Egea, J., García, A. G., and López, M. G., (2010). Synergistic neuroprotective effect of combined low concentrations of galantamine and melatonin against oxidative stress in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Journal of Pineal Research*, 49(2), 141-148.
- Rossi, A., Pizzo, P., and Filadi, R. (2019). Calcium, mitochondria and cell metabolism: A functional triangle in bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1866(7), 1068-1078.
- Rothe, G. (2009). *Technical background and methodological principles of flow cytometry*, In: *Cellular diagnostics*. Bremen: Karger Publishers, 53-88.
- Saadeldin, I. M., Hussein, M. A., Suleiman, A. H., Abohassan, M. G., Ahmed, M. M., Moustafa, A. A., Moumen, A. F., and Abdel-Aziz Swelum, A. (2018). Ameliorative effect of ginseng extract on phthalate and bisphenol A reprotoxicity during pregnancy in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(21), 21205-21215.

- Saberzadeh, J., Omrani, M., and Takhshid, M. A. (2016). Protective effects of nimodipine and lithium against aluminum-induced cell death and oxidative stress in PC12 cells. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(11), 1251-1257.
- Sadeghnia, H. R., Kolangikhah, M., Asadpour, E., Forouzanfar, F., and Hosseinzadeh, H. (2017). Berberine protects against glutamate-induced oxidative stress and apoptosis in PC12 and N2a cells. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(5), 594-603.
- Sahana, T. G., and Zhang, K. (2021). Mitogen-activated protein kinase pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Biomedicines*, 9(8), 969.
- Sahu, R., Upadhyay, S., and Mehan, S. (2021). Inhibition of extracellular regulated kinase (ERK)-1/2 signaling pathway in the prevention of ALS: Target inhibitors and influences on neurological dysfunctions. *European Journal of Cell Biology*, 100(7-8), 151179.
- Saito, T., Hisahara, S., Iwahara, N., Emoto, M. C., Yokokawa, K., Suzuki, H., Manabe, T., Matsumura, A., Suzuki, S., Matsushita, T., Kawamata, J., Sato-Akaba, H., Fujii, H. G., and Shimohama, S., (2019). Early administration of galantamine from preplaque phase suppresses oxidative stress and improves cognitive behavior in APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 145, 20-32.
- Sajjad, N., Wani, A., Hassan, S., Ali, R., Hamid, R., Akbar, S., Ganai, B. A., and Bhat, E. (2019). Interplay of antioxidants in Alzheimer's disease. *Journal of Translational Science*, 5, 1-11.
- Salman, M., Tabassum, H., and Parvez, S., (2020). Piperine mitigates behavioral impairments and provides neuroprotection against 3-nitropropionic acid-induced Huntington disease-like symptoms. *Nutritional Neuroscience*, 25 (1), 100-109.
- Saminathan, R., Pachiappan, A., Feng, L., Rowan, E. G., and Gopalakrishnakone, P. (2009). Transcriptome profiling of neuronal model cell PC12 from rat pheochromocytoma. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 29(4), 533-548.
- Sanchis, A., García-Gimeno, M. A., Cañada-Martínez, A. J., Sequedo, M. D., Millán, J. M., Sanz, P., and Vázquez-Manrique, R. P. (2019). Metformin treatment reduces motor and neuropsychiatric phenotypes in the zQ175 mouse model of Huntington disease. *Experimental & Molecular Medicine*, 51(6), 1-16.
- Sanhueza, M., Manso, Y., Soto, C., and Salvadores, N. (2022). Novel mechanisms involved in aging and neurodegeneration: Seeking potential therapeutic targets for neurodegenerative diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14, 1104647.
- Saraç, H., Daştan, T., Durukan, H., Daştan, S. D., Demirbaş, A., and Karaköy, T. (2018). Kırmızı gelincik (Fam: Papaveraceae, *Glaucium grandiflorum* Boiss. & Huet var. *grandiflorum*) bitkisinin farklı özütlerinin besin elementi içeriğinin ve in vitro antiproliferatif etkilerinin değerlendirilmesi. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 417-428.
- Saravanaraman, P., Chinnadurai, R. K., and Boopathy, R. (2014). Why calcium channel blockers could be an elite choice in the treatment of Alzheimer's disease: A comprehensive review of evidences. *Reviews in the Neurosciences*, 25(2), 231-246.

- Sarikaya, B. B., Somer, N. U., Kaya, G. I., Onur, M. A., Bastida, J., and Berkov, S. (2013). GC-MS investigation and acetylcholinesterase inhibitory activity of *Galanthus rizehensis*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 68(3-4), 118-124.
- Sarkadi, B., Meszaros, K., Krencz, I., Canu, L., Krokker, L., Zakarias, S., Barna, G., Anna Sebestyen, A., Papay, J., Hujber, Z., Butz, H., Darvasi, O., Igaz, P., Doczi, J., Luconi, M., Chinopoulos, C., and Patocs, A. (2020). Glutaminases as a novel target for SDHB-associated pheochromocytomas/paragangliomas. *Cancers*, 12(3), 599.
- Satou, T., Akao, N., Matsushashi, R., Koike, K., Fujita, K., and Nikaido, T. (2002). Inhibitory effect of isoquinoline alkaloids on movement of second-stage larvae of *Toxocara canis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(12), 1651-1654.
- Schampel and Kuerten, S. (2017). Danger: High voltage-the role of voltage-gated calcium channels in central nervous system pathology. *Cells*, 6(4), 43.
- Schellino, R., Boido, M., and Vercelli, A. (2019). JNK signaling pathway involvement in spinal cord neuron development and death. *Cells*, 8(12), 1576.
- Schirinzi, T., Martella, G., Imbriani, P., Di Lazzaro, G., Franco, D., Colona, V. L., Alwardat, M., Salimei, P. S., Mercuri, N. B., Pieramtozzi, M., and Pisani, A. (2019). Dietary vitamin E as a protective factor for Parkinson's disease: Clinical and experimental evidence. *Frontiers in Neurology*, 10, 148.
- Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101-1108.
- Schrank, S., Barrington, N., and Stutzmann, G. E. (2020). Calcium-handling defects and neurodegenerative disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 12(7), a035212.
- Senavong, P., Kongkham, S., Saelim, S., and Suangkavathin, V. (2016). Neuroprotective effect of perilla extracts on PC12 cells. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 99(4), S256-S264.
- Seo, E. J., Fischer, N., and Efferth, T. (2018). Phytochemicals as inhibitors of NF- κ B for treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacological Research*, 129, 262-273.
- Sgobio, C., Sun, L., Ding, J., Herms, J., Lovinger, D. M., and Cai, H. (2019). Unbalanced calcium channel activity underlies selective vulnerability of nigrostriatal dopaminergic terminals in Parkinsonian mice. *Scientific Reports*, 9(1), 1-14.
- Shaerzadeh, F., Ahmadiani, A., Esmaeili, M. A., Ansari, N., Asadi, S., Tusi, S. K., Sonboli, A., Ghahremanzamani, M., and Khodaghali, F. (2011). Antioxidant and antiglycating activities of *Salvia sahendica* and its protective effect against oxidative stress in neuron-like PC12 cells. *Journal of Natural Medicines*, 65(3), 455-465.
- Shafiee, A., Ghanbarpour, A., and Akhlaghi, S. (1985). Alkaloids of papaveraceae, XII. alkaloids of *Glaucium corniculatum* subspecies *refractum*, population Pol-Dokhtar. *Journal of Natural Products*, 48(5), 855-856.

- Shamma M., and Moniot, J. L. (1978). *Isoquinoline alkaloids research*. New York: Plenum Press, 1-426.
- Shamma, M. (1972). *The isoquinoline alkaloids-chemistry and pharmacology*, Cambridge: Academic Pres, 1-614.
- Shang, X. F., Yang, C. J., Morris-Natschke, S. L., Li, J. C., Yin, X. D., Liu, Y. Q., Guo, X., Peng, J. W., Goto, M., Zhang, J. Y., and Lee, K. H. (2020). Biologically active isoquinoline alkaloids covering 2014–2018. *Medicinal Research Reviews*, 40(6), 2212-2289.
- Sharifi-Rad, J., Rapposelli, S., Sestito, S., Herrera-Bravo, J., Arancibia-Diaz, A., Salazar, L. A., Yeskaliyeva, B., Beyatli, A., Levy-Gómez, G., González-Contreras, C., Sönmez Gürer, E., Martorell, and Calina, D. (2022). Multi-target mechanisms of phytochemicals in Alzheimer's disease: Effects on oxidative stress, neuroinflammation and protein aggregation. *Journal of Personalized Medicine*, 12(9), 1515.
- Sharma, V., Kaur, A., and Singh, T. G. (2020). Counteracting role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway in Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 129, 110373.
- Sharma, N., and Nehru, B. (2015). Characterization of the lipopolysaccharide induced model of Parkinson's disease: Role of oxidative stress and neuroinflammation. *Neurochemistry international*, 87, 92-105.
- Shaykhalishahi, H., Yazdanparast, R., Ha, H. H., and Chang, Y. T. (2009). Inhibition of H₂O₂-induced neuroblastoma cell cytotoxicity by a triazine derivative, AA3E2. *European journal of pharmacology*, 622(1-3), 1-6.
- Shehat, M. G., and Tigno-Aranjuez, J. (2019). Flow cytometric measurement of ROS production in macrophages in response to FcγR cross-linking. *Journal of Visualized Experiments*, 145, e59167.
- Shekarian, M., Komaki, A., Shahidi, S., Sarihi, A., Salehi, I., and Raoufi, S., (2020). The protective and therapeutic effects of vinpocetine, a PDE1 inhibitor, on oxidative stress and learning and memory impairment induced by an intracerebroventricular (ICV) injection of amyloid beta (Aβ) peptide. *Behavioural Brain Research*, 383, 112512.
- Shou, J. W., Cheung, C. K., Gao, J., Shi, W. W., and Shaw, P. C. (2019). Berberine protects C17.2 neural stem cells from oxidative damage followed by inducing neuronal differentiation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 395.
- Shukla, A., Tiwari, R., and Tiwari, S. (2023). Review on alzheimer disease detection methods: Automatic pipelines and machine learning techniques. *Sci*, 5(1), 13.
- Siano, G., Caiazza, M. C., Ollà, I., Varisco, M., Madaro, G., Quercioli, V., Calvello, M., Cattaneo, A., and Di Primio, C. (2019). Identification of an ERK inhibitor as a therapeutic drug against tau aggregation in a new cell-based assay. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 386.

- Siatka, T., Adamcová, M., Opletal, L., Cahlíková, L., Jun, D., Hrabínová, M., Krunes, J., and Chlebek, J. (2017). Cholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibitory activities of alkaloids from *Argemone platyceras* (Papaveraceae). *Molecules*, 22(7), 1181.
- Sierra-Fonseca, J. A., Najera, O., Martinez-Jurado, J., Walker, E. M., Varela-Ramirez, A., Khan, A. M., Miranda, M., Lamang, N. S., and Roychowdhury, S. (2014). Nerve growth factor induces neurite outgrowth of PC12 cells by promoting Gβγ-microtubule interaction. *BMC Neuroscience*, 15(1), 1-19.
- Singh, A., Kukreti, R., and Kukreti, S. (2022). *Oxidative stress and cellular dysfunction in neurodegenerative disease*, In: *Neurodegenerative diseases biomarkers*. New Jersey: Humana Press, 121-154.
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., and Kukreti, S. (2019). Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*, 24(8), 1583.
- Singh, S., Pathak, N., Fatima, E., and Negi, A. S. (2021). Plant isoquinoline alkaloids: Advances in the chemistry and biology of berberine. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 226, 113839.
- Sinsky, J., Pichlerova, K., and Hanes, J. (2021). Tau protein interaction partners and their roles in Alzheimer's disease and other tauopathies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9207.
- Slanzi, A., Iannoto, G., Rossi, B., Zenaro, E., and Constantin, G. (2020). *In vitro* models of neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 328.
- Sleeman, R. and Carter, J. F., (2005). *Mass spectrometry*, In: *Encyclopedia of analytical science*. Amsterdam: Elsevier, 337-344.
- Snigdha, S., Smith, E. D., Prieto, G. A., and Cotman, C. W. (2012). Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death. *Neuroscience Bulletin*, 28(1), 14-24.
- Snutch, T. P., Peloquin, J., Mathews, E., and McRory, J. E. (2005). *Molecular properties of voltage-gated calcium channels*, In: *Voltage-gated calcium channels*. Berlin: Springer, 1-346.
- Soeda, Y., and Takashima, A. (2020). New insights into drug discovery targeting tau protein. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 590896.
- Sompol, P., and Norris, C. M. (2018). Ca²⁺, astrocyte activation and calcineurin/NFAT signaling in age-related neurodegenerative diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 199.
- Son, Y., Cheong, Y. K., Kim, N. H., Chung, H. T., Kang, D. G., and Pae, H. O. (2011). Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species: How can ROS activate MAPK pathways?. *Journal of Signal Transduction*, 2011, 792639.

- Song, H., Kim, W., Choi, J. H., Kim, S. H., Lee, D., Park, C. H., Kim, S., Kim, D. Y., and Kim, K. T. (2016). Stress-induced nuclear translocation of CDK5 suppresses neuronal death by downregulating ERK activation via VRK3 phosphorylation. *Scientific Reports*, 6(1), 1-14.
- Song, M., Kwon, Y. A., Lee, Y., Kim, H., Yun, J. H., Kim, S., and Kim, D. K. (2012). G1/S cell cycle checkpoint defect in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease. *Psychiatry Investigation*, 9(4), 413-417.
- Songin, M., Jeśko, H., Czapski, G., Adamczyk, A., and Strosznajder, R. P. (2007). GSK-3 β and oxidative stress in aged brain. Role of poly(ADP ribose)polymerase-1. *Folia Neuropathologica*, 45(4), 220-229.
- Soto, C., and Estrada, L. D. (2008). Protein misfolding and neurodegeneration. *Archives of Neurology*, 65(2), 184-189.
- Soto, C., and Pritzkow, S. (2018). Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience*, 21(10), 1332-1340.
- Srinivasan, K., and Kumaravel, S. (2015). A comparative study: The impact of solvent extraction on phytochemical profiling of *Adhatoda vasica*. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences*, 3(6), 874-879.
- Starlin, T., Prabha, P. S., Thayakumar, B. K. A., and Gopalakrishnan, V. K. (2019). Screening and GC-MS profiling of ethanolic extract of *Tylophora pauciflora*. *Bioinformation*, 15(6), 425-429.
- Stringer, R. N., Jurkovicova-Tarabova, B., Huang, S., Haji-Ghassemi, O., Idoux, R., Liashenko, A., Souza, I. A., Rzhetsky, Y., Lacinova, L., Petegem, F. V., Zamponi, G. W., Pamphlett, R., and Weiss, N. (2020). A rare CACNA1H variant associated with amyotrophic lateral sclerosis causes complete loss of CaV3.2 T-type channel activity. *Molecular Brain*, 13(1), 1-11.
- Sun, J., and Nan, G. (2017). The extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in neurological diseases: A potential therapeutic target. *International Journal of Molecular Medicine*, 39(6), 1338-1346.
- Sun, P., Zhang, S., Li, Y., and Wang, L. (2014). Harmine mediated neuroprotection via evaluation of glutamate transporter 1 in a rat model of global cerebral ischemia. *Neuroscience Letters*, 583, 32-36.
- Sun, Y., Savanenin, A., Reddy, P. H., and Liu, Y. F. (2001). Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), 24713-24718.
- Svendsen, A. B., and Verpoorte, R. (1983). *Isolation of alkaloids*, In: *Chromatography of alkaloids*. Amsterdam: Elsevier, 51-58.
- Swift, L. H., and Golsteyn, R. M. (2016). *The relationship between checkpoint adaptation and mitotic catastrophe in genomic changes in cancer cells*, In: *Genome stability*. Cambridge: Academic Press, 373-389.

- Şahin, C., Ünal, G., Arıcıoğlu, F. (2014). Akt-GSK-3 ilişkisi: İki ayrı yolak iki ayrı hastalık. *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi (MÜSBED)*, 4 (1), 51-57.
- Şener, B., Orhan, I. (2005). Discovery of drug candidates from some Turkish plants and conservation of biodiversity, *Pure and Applied Chemistry*, 77(1), 53-64.
- Takalo, M., Wittrahm, R., Wefers, B., Parhizkar, S., Jokivarsi, K., Kuulasmaa, T., Mäkinen, P., Martiskainen, H., Wurst, W., Xiang, X., Marttinen, M., Poutiainen, P., Haapasalo, A., Hiltunen, M., and Haass, C. (2020). The Alzheimer's disease-associated protective Plcγ2-P522R variant promotes immune functions. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1), 1-14.
- Takashima, A. (2006). GSK-3 is essential in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 9(s3), 309-317.
- Talbott, E. O., Malek, A. M., and Lacomis, D. (2016). The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Handbook of Clinical Neurology*, 138, 225-238.
- Tan, J., Li, Q. X., and Evin, G. (2016). Effects of mild and severe oxidative stress on BACE1 expression and APP amyloidogenic processing. *Methods in Molecular Biology*, 1303, 101-16.
- Tang, X. Q., Feng, J. Q., Chen, J., Chen, P. X., Zhi, J. L., Cui, Y., Guo, R. X., and Yu, H. M. (2005). Protection of oxidative preconditioning against apoptosis induced by H₂O₂ in PC12 cells: Mechanisms via MMP, ROS, and Bcl-2, *Brain Research*, 1057(1-2), 57-64.
- Tavakkoli, Z., and Assadi, M. (2019). A taxonomic revision of the genus *Glaucium* (Papaveraceae) in Iran. *Acta Botanica Croatica*, 78(1), 57-65.
- Taylor, D. M., Moser, R., Régulier, E., Breuillaud, L., Dixon, M., Beesen, A. A., Elliston, L., Santos, M. D. F. S., Kim, J., Jones, L., Goldstein, D. R., Ferrante, R. J., and Luthi-Carter, R. (2013). MAP kinase phosphatase 1 (MKP-1/DUSP1) is neuroprotective in Huntington's disease via additive effects of JNK and p38 inhibition. *Journal of Neuroscience*, 33(6), 2313-2325.
- Teleanu, D. M., Niculescu, A. G., Lungu, I. I., Radu, C. I., Vladâcenco, O., Roza, E., ... & Teleanu, R. I. (2022). An overview of oxidative stress, neuroinflammation, and neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 5938.
- Tellone, E., Galtieri, A., Russo, A., Giardina, B., and Ficarra, S. (2015). Resveratrol: A focus on several neurodegenerative diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 392169.
- Thal, D. R., and Fändrich, M. (2015). Protein aggregation in Alzheimer's disease: Aβ and τ and their potential roles in the pathogenesis of AD. *Acta Neuropathologica*, 129(2), 163-165.
- Thal, L. J., Grundman, M., Berg, J., Ernstrom, K., Margolin, R., Pfeiffer, E., Weiner, M. F., Zamrini, E., and Thomas, R. G. (2003). Idebenone treatment fails to slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neurology*, 61(11), 1498-1502.

- Tifoun, N., Bekhouche, M., De las Heras, J. M., Guillaume, A., Bouleau, S., Guénal, I., Mignotte, B., and Le Floch, N. (2022). A high-throughput search for SFXN1 physical partners led to the identification of ATAD3, HSD10 and TIM50. *Biology*, 11(9), 1298.
- Tochigi, M., Inoue, T., Suzuki-Karasaki, M., Ochiai, T., Ra, C., and Suzuki-Karasaki, Y. (2013). Hydrogen peroxide induces cell death in human TRAIL-resistant melanoma through intracellular superoxide generation. *International Journal of Oncology*, 42(3), 863-872.
- Tong, B. C. K., Wu, A. J., Li, M., and Cheung, K. H. (2018). Calcium signaling in Alzheimer's disease and therapies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1865(11), 1745-1760.
- Tran, L. T., Gentil, B. J., Sullivan, K. E., and Durham, H. D. (2014). The voltage-gated calcium channel blocker lomerizine is neuroprotective in motor neurons expressing mutant SOD 1, but not TDP-43. *Journal of Neurochemistry*, 130(3), 455-466.
- Tricarico, P. M., de Oliveira Franca, R. F., Pacor, S., Ceglia, V., Crovella, S., and Celsi, F. (2016). HIV protease inhibitors apoptotic effect in SH-SY5Y neuronal cell line. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(4), 1463-1470.
- Truong, V. L., Jun, M., and Jeong, W. S. (2018). Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *Biofactors*, 44(1), 36-49.
- Tzeng, C. Y., Lee, W. S., Liu, K. F., Tsou, H. K., Chen, C. J., Peng, W. H., and Tsai, J. C. (2022). Allantoin ameliorates amyloid β -peptide-induced memory impairment by regulating the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 153, 113389.
- Udoidong, A. A., Etuk, B. A., and Udo, I. E. (2014). Phytochemical and chromatographic analysis of chloroform extract of *Marsdenia latifolia*. *Advances in Applied Science Research*, 5(1), 53-58.
- Uittenbogaard, M., and Chiaramello, A. (2014). Mitochondrial biogenesis: A therapeutic target for neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 20(35), 5574-5593.
- Uma, G., and Balasubramaniam, V. (2012). GC-MS analysis of *Nothapodytes nimmoniana* [J. Graham] mabberly leaves. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4(9), 4417-4419.
- Ureshino, R. P., Erustes, A. G., Bassani, T. B., Wachilewski, P., Guarache, G. C., Nascimento, A. C., Costa, A. J., Smaili, S. S., and da Silva Pereira, G. J. (2019). The interplay between Ca^{2+} signaling pathways and neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 6004.
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., and Mahajan, R. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7(1), 65-74.
- Vacek, J., Walterova, D., Vrublova, E., and Simanek, V. (2010). The chemical and biological properties of protopine and allocryptopine. *Heterocycles*, 81(8), 1773-1789.

- Van Bulck, M., Sierra-Magro, A., Alarcon-Gil, J., Perez-Castillo, A., and Morales-Garcia, J. A. (2019). Novel approaches for the treatment of Alzheimer's and Parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 719.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), 00341-003411.
- van Lonkhuizen, P. J., Frank, W., Heemskerk, A. W., van Duijn, E., de Bot, S. T., Mühlbäck, A., Landwehrmeyer, G. B., Chavannes, N. H., Meijer, E., and HEALTHE-RND Consortium (2023). Quality of life, health-related quality of life, and associated factors in Huntington's disease: a systematic review. *Journal of Neurology*, 270(5), 2416-2437.
- Van Schependom, J., and D'haeseleer, M. (2023). Advances in neurodegenerative diseases. *Journal of Clinical Medicine*, 12(5), 1709.
- Verpoorte, R. (2005). *Alkaloids*, In: *Encyclopedia of analytical science*. Amsterdam: Elsevier, 56-61.
- Vigont, V. A., Grekhnev, D. A., Lebedeva, O. S., Gusev, K. O., Volovikov, E. A., Skopin, A. Y., Bogomazova, A. N., Shuvalova, L. D., Zubkova, O. A., Khomyakova, E. A., Glushankova, L. N., Klyushnikov, S. A., Illarioshkin, S. N., Lagarkova, M. A., and Kaznacheyeva, E. V. (2021). STIM2 mediates excessive store-operated calcium entry in patient-specific iPSC-derived neurons modeling a juvenile form of Huntington's disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 625231.
- Vorniceanu, C., Vatui, M., Ionescu, A., Zamfirache, M. M., and Bara, I. (2004). Contributions to the chemical study of some papaveraceae species capsules. N. II. *Glaucium flavum*, *Glaucium corniculatum* and *Chelidonium majus*. *Analele Stiintifice ale Universitatii "Alexandru Ioan Cuza" din Iasi Sec. II a. Genetica si Biologie Moleculara*, 5(1), 1-5.
- Wada, T., and Penninger, J. M. (2004). Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*, 23(16), 2838-2849.
- Wang, B., Huang, M., Shang, D., Yan, X., Zhao, B., and Zhang, X. (2021). Mitochondrial behavior in axon degeneration and regeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 650038.
- Wang, C., Cai, Z., Wang, W., Wei, M., Kou, D., Li, T., Yang, Z., Guo, H., Le, W., and Li, S., (2019). Piperine attenuates cognitive impairment in an experimental mouse model of sporadic Alzheimer's disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 70, 147-155.
- Wang, J., Li, L., Wang, Z., Cui, Y., Tan, X., Yuan, T., Liu, Q., Liu, Z., and Liu, X. (2018a). Supplementation of lycopene attenuates lipopolysaccharide-induced amyloidogenesis and cognitive impairments via mediating neuroinflammation and oxidative stress. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 56, 16-25.

- Wang, J., Wang, F., Mai, D., and Qu, S., (2020). Molecular mechanisms of glutamate toxicity in Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 585584.
- Wang, T. H., Wang, S. Y., Wang, X. D., Jiang, H. Q., Yang, Y. Q., Wang, Y., Cheng, Y. L., Zhang, C. R., Liang, W. W., and Feng, H. L. (2018b). Fisetin exerts antioxidant and neuroprotective effects in multiple mutant hSOD1 models of amyotrophic lateral sclerosis by activating ERK. *Neuroscience*, 379, 152-166.
- Wang, T., Xie, C., Yu, P., Fang, F., Zhu, J., Cheng, J., Gu, A., Wang, J., and Xiao, H. (2017). Involvement of insulin signaling disturbances in bisphenol a-induced alzheimer's disease-like neurotoxicity. *Scientific Reports*, 7(1), 7497.
- Wang, W., Bu, B., Xie, M., Zhang, M., Yu, Z., and Tao, D. (2009). Neural cell cycle dysregulation and central nervous system diseases. *Progress in Neurobiology*, 89(1), 1-17.
- Wang, W., Yang, Y., Ying, C., Li, W., Ruan, H., Zhu, X., You, Y., Han, Y., Chen, R., Wang, Y., and Li, M. (2007). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β protects dopaminergic neurons from MPTP toxicity. *Neuropharmacology*, 52(8), 1678-1684.
- Wang, X., and Michaelis, E. K. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2, 12.
- Wang, Y., Liu, Q., Xu, Y., Zhang, Y., Lv, Y., Tan, Y., Jiang, N., Cao, G., Ma, X., Wang, J., Cao, Z., Yu, B., and Kou, J. (2016). Ginsenoside Rg1 protects against oxidative stress-induced neuronal apoptosis through myosin IIA-actin related cytoskeletal reorganization. *International Journal of Biological Sciences*, 12(11), 1341-1356.
- Wang, Z. (2021). Regulation of cell cycle progression by growth factor-induced cell signaling. *Cells*, 10(12), 3327.
- Warnier, M., Gackière, F., Roudbaraki, M., and Mariot, P. (2016). Expression and role of T-type calcium channels during neuroendocrine differentiation. *Journal of Cell Signaling*, 1(113), 2.
- Wiatrak, B., Kubis-Kubiak, A., Piwowar, A., and Barg, E. (2020). PC12 cell line: Cell types, coating of culture vessels, differentiation and other culture conditions. *Cells*, 9(4), 958.
- Wilkaniec, A., Strosznajder, J. B., and Adamczyk, A. (2013). Toxicity of extracellular secreted alpha-synuclein: Its role in nitrosative stress and neurodegeneration. *Neurochemistry International*, 62(5), 776-783.
- Wilson, D. M., Cookson, M. R., Van Den Bosch, L., Zetterberg, H., Holtzman, D. M., and Dewachter, I. (2023). Hallmarks of neurodegenerative diseases. *Cell*, 186(4), 693-714.
- Włodkowicz D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. (2009). Flow cytometry-based apoptosis detection. *Methods in Molecular Biology*, 559, 19–32.
- Wojda, U., Salinska, E., and Kuznicki, J. (2008). Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life*, 60(9), 575-590.

- Wong, K. W., Law, Y. K., Liu, L., and Wang, J. (2017). *U.S. Patent No. 9,561,222*. Patent and Trademark Office, Washington.
- Wu, C., Yang, K., Liu, Q., Wakui, M., Jin, G. Z., Zhen, X., and Wu, J. (2010). Tetrahydroberberine blocks ATP-sensitive potassium channels in dopamine neurons acutely-dissociated from rat substantia nigra pars compacta. *Neuropharmacology*, 59(7-8), 567-57.
- Wu, F. J., Xue, Y., Liu, X. F., Xue, C. H., Wang, J. F., Du, L., Takahashi, K., and Wang, Y. M. (2014). The protective effect of eicosapentaenoic acid-enriched phospholipids from sea cucumber *Cucumaria frondosa* on oxidative stress in PC12 cells and SAMP8 mice. *Neurochemistry International*, 64, 9-17.
- Wu, J., Stoica, B. A., and Faden, A. I. (2011). Cell cycle activation and spinal cord injury. *Neurotherapeutics*, 8(2), 221-228.
- Wu, Y., Chen, M., and Jiang, J. (2019). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and drug targets via apoptotic signaling. *Mitochondrion*, 49, 35-45.
- Wu, Y., Shang, Y., Sun, S., Liang, H., and Liu, R. (2007). Erythropoietin prevents PC12 cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis via the Akt/GSK-3 β /caspase-3 mediated signaling pathway. *Apoptosis*, 12(8), 1365-1375.
- X Sureda, F., Junyent, F., Verdaguer, E., Auladell, C., Pelegri, C., Vilaplana, J., Folch, J., Canudas, A. M., Zarate, C. B., Pallès, M., and Camins, A. (2011). Antiapoptotic drugs: A therapeutic strategy for the prevention of neurodegenerative diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 17(3), 230-245.
- Xian, Y. F., Lin, Z. X., Mao, Q. Q., Chen, J. N., Su, Z. R., Lai, X. P., and Ip, P. S. P. (2013). Isorhynchophylline protects PC12 cells against beta-amyloid-induced apoptosis via PI3K/Akt signaling pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 163057.
- Xian, Y. F., Lin, Z. X., Mao, Q. Q., Hu, Z., Zhao, M., Che, C. T., and Ip, S. P. (2012b). Bioassay-guided isolation of neuroprotective compounds from *Uncaria rhynchophylla* against beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 802625.
- Xian, Y. F., Lin, Z. X., Mao, Q. Q., Ip, S. P., Su, Z. R., and Lai, X. P. (2012a). Protective effect of isorhynchophylline against β -amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 32(3), 353-360.
- Xiao, H., Lv, F., Xu, W., Zhang, L., Jing, P., and Cao, X. (2011). Deprenyl prevents MPP⁺-induced oxidative damage in PC12 cells by the upregulation of Nrf2-mediated NQO1 expression through the activation of PI3K/Akt and Erk. *Toxicology*, 290(2-3), 286-294.
- Xiao, X., Liu, J., Hu, J., Li, T., and Zhang, Y. (2007). Protective effect of protopine on the focal cerebral ischaemic injury in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 101(2), 85-89.

- Xiao, X., Liu, J., Hu, J., Zhu, X., Yang, H., Wang, C., and Zhang, Y. (2008). Protective effects of protopine on hydrogen peroxide-induced oxidative injury of PC12 cells via Ca^{2+} antagonism and antioxidant mechanisms. *European Journal of Pharmacology*, 591(1-3), 21-27.
- Xie, A., Gao, J., Xu, L., and Meng, D. (2014). Shared mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *BioMed Research International*, 2014, 648740.
- Xie, Y., Zhang, Y., Zhang, L. T., Zeng, S. X., Guo, Z. B., and Zheng, B. D. (2013). Protective effects of alkaloid compounds from *Nelumbinis plumula* on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress. *Molecules*, 18(9), 10285-10300.
- Xu, B., Fu, Y., Liu, L., Lin, K., Zhao, X., Zhang, Y., Chen, X., Cai, Z., Huang, Y., and Li, Y. (2015). Effect of α -allocryptopine on delayed afterdepolarizations and triggered activities in mice cardiomyocytes treated with isoproterenol. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 634172.
- Xu, G., He, J., Guo, H., Mei, C., Wang, J., Li, Z., Chen, H., Mang, J., Yang, H., and Xu, Z. (2013). Activin A prevents neuron-like PC12 cell apoptosis after oxygen-glucose deprivation. *Neural Regeneration Research*, 8(11), 1016-1024.
- Xu, H., Wang, E., Chen, F., Xiao, J., and Wang, M. (2021). Neuroprotective phytochemicals in experimental ischemic stroke: Mechanisms and potential clinical applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 6687386.
- Xu, X., Xie, X., Zhang, H., Wang, P., Li, G., Chen, J., Chen, G., Cao, X., Xiong, L., Peng, F., and Peng, C. (2021). Water-soluble alkaloids extracted from *Aconiti Radix lateral*is praeparata protect against chronic heart failure in rats via a calcium signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 135, 111184.
- Yadav, N., and Shukla, P. K. (2021). *Role of oxidative stress in neurodegeneration*, In: *Antioxidants and functional foods for neurodegenerative disorders*. Florida: CRC Press, 1-8.
- Yan, R., Yang, Y., Luo, Y., and Wu, C. (2011). Inhibition of *Corydalis decumbens* alkaloids on hydrogen peroxide induced apoptosis of PC12 cells through down-regulating caspase-3 expression. *Chinese Herbal Medicines*, 3(4), 290-295.
- Yang, M., Wang, Y., Fan, Z., Xue, Q., Njateng, G. S. S., Liu, Y., Cao, J., Khan, A., and Cheng, G. (2021). Chemical constituents and anti-inflammatory activity of the total alkaloid extract from *Melodinus cochinchinensis* (Lour.) Merr. and its inhibition of the NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Phytomedicine*, 91, 153684.
- Yao, E. S., Tang, Y., Liu, X. H., and Wang, M. H. (2016). TPPU protects tau from H_2O_2 -induced hyperphosphorylation in HEK293/tau cells by regulating PI3K/AKT/GSK-3 β pathway. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 36(6), 785-790.

- Yao, Z., Li, J., Bian, L., Li, Q., Wang, X., Yang, X., Wei, X., Wan, G., Wang, Y., Shi, J., and Guo, J. (2022). Nootkatone alleviates rotenone-induced Parkinson's disease symptoms through activation of the PI3K/Akt signaling pathway. *Phytotherapy Research*, 36(11), 4183-4200.
- Yeşilkır Baydar, S. (2020). *Alzheimer hastalığı tedavisi için en kestirme yol: İntranazal yaklaşımlar*, In: *Sağlık bilimlerinde multidisipliner araştırmalar*. İstanbul: Efe Akademi, 575-594.
- You, S., Jang, M., and Kim, G. H. (2022). *Mori Cortex radidis* extract protected against diet-induced neuronal damage by suppressing the AGE-RAGE/MAPK signaling pathway in *C. elegans* and mouse model. *Journal of Functional Foods*, 91, 104996.
- Yu, G., Li, Y., Tian, Q., Liu, R., Wang, Q., Wang, J. Z., and Wang, X. (2011). Berberine attenuates calyculin A-induced cytotoxicity and tau hyperphosphorylation in HEK293 cells. *Journal of Alzheimer's Disease*, 24(3), 525-535.
- Yu, H. J., and Koh, S. H. (2017). The role of PI3K/AKT pathway and its therapeutic possibility in Alzheimer's disease. *Hanyang Medical Reviews*, 37(1), 18-24.
- Yu, L., Wang, W., Pang, W., Xiao, Z., Jiang, Y., and Hong, Y. (2017). Dietary lycopene supplementation improves cognitive performances in tau transgenic mice expressing P301L mutation via inhibiting oxidative stress and tau hyperphosphorylation. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(2), 475-482.
- Yu, Q., Liu, T., Li, S., Feng, J., Wu, L., Wang, W., Chen, K., Xia, Y., Niu, P., Xu, L., Wang, F., Dai, W., Zhou, Y., and Guo, C. (2018). The protective effects of levotetrahydropalmatine on conA-induced liver injury are via TRAF6/JNK signaling. *Mediators of Inflammation*, 2018, 4032484.
- Yu, X., Gao, X., Zhu, Z., Cao, Y., Zhang, Q., Tu, P., and Chai, X. (2014). Alkaloids from the tribe bocconieae (Papaveraceae): A chemical and biological review. *Molecules*, 19(9), 13042-13060.
- Yubin, J. I., Miao, Y., Bing, W., and Yao, Z. (2014). The extraction, separation and purification of alkaloids in the natural medicine. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(1), 338-45.
- Zaidi, A. (2010). Plasma membrane Ca-ATPases: Targets of oxidative stress in brain aging and neurodegeneration. *World Journal of Biological Chemistry*, 1, 271-280.
- Zaki, M. O., El-Desouky, S., Elsherbiny, D. A., Salama, M., and Azab, S. S. (2022). Glimepiride mitigates tauopathy and neuroinflammation in P301S transgenic mice: Role of AKT/GSK3 β signaling. *Inflammopharmacology*, 30(5), 1871-1890.
- Zhang, H., Wu, C., Huang, J. F., Chen, Y., and Ni, W. F., (2021b). Piperine attenuates the inflammatory response, oxidative stress and pyroptosis to facilitate recovery after spinal cord injury via sutophagy enhancement, *Research Square*, 1-23.

- Zhang, J., Chen, Y. U., Yang, J., Xu, B., Wen, Y. I., Xiang, G., Wei, G., Zhu, C., Xing, Y., and Li, Y. (2015). Electrophysiological and trafficking defects of the SCN5A T353I mutation in Brugada syndrome are rescued by alpha-allocryptopine. *European Journal of Pharmacology*, 746, 333-343.
- Zhang, L., Wu, T., Olatunji, O. J., Tang, J., Wei, Y., and Ouyang, Z. (2019). N6-(2-hydroxyethyl)-adenosine from *Cordyceps cicadae* attenuates hydrogen peroxide induced oxidative toxicity in PC12 cells. *Metabolic Brain Disease*, 34(5), 1325-1334.
- Zhang, R., Guo, Q., Kennelly, E. J., Long, C., and Chai, X. (2020). Diverse alkaloids and biological activities of *Fumaria* (Papaveraceae): An ethnomedicinal group. *Fitoterapia*, 146, 104697.
- Zhang, S., Ye, J., and Dong, G. (2010). Neuroprotective effect of baicalein on hydrogen peroxide-mediated oxidative stress and mitochondrial dysfunction in PC12 cells. *Journal of Molecular Neuroscience*, 40(3), 311-320.
- Zhang, X., Song, S., and Peng, W. (2021a). Cell cycle deregulation in neurodegenerative diseases. *International Journal of Neuroscience*, 133(4), 408-416.
- Zhang, X., Wang, L., Li, B., Shi, J., Xu, J., and Yuan, M. (2023). Targeting mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases: Expanding the therapeutic approaches by plant-derived natural products. *Pharmaceuticals*, 16(2), 277.
- Zhang, Y., Ona, V. O., Li, M., Drozda, M., Dubois-Dauphin, M., Przedborski, S., Ferrante, R. J., and Friedlander, R. M. (2003). Sequential activation of individual caspases, and of alterations in Bcl-2 proapoptotic signals in a mouse model of Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 87(5), 1184-1192.
- Zhang, Y., Sha, R., Wang, K., Li, H., Yan, B., and Zhou, N. (2018). Protective effects of tetrahydropalmatine against ketamine-induced learning and memory injury via antioxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic mechanisms in mice. *Molecular Medicine Reports*, 17(5), 6873-6880.
- Zhao, J., Wang, X., Huo, Z., Chen, Y., Liu, J., Zhao, Z., Meng, F., Su, Q., Bao, W., Zhang, L., Wen, S., Wang, X., Liu, H., and Zhou, S. (2022). The impact of mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Cells*, 11(13), 2049.
- Zhao, Y., and Zhao, B. (2013). Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 316523.
- Zhao, Z. Y., Luan, P., Huang, S. X., Xiao, S. H., Zhao, J., Zhang, B., Gu, B. B., Pi, R. B., and Liu, J. (2013). Edaravone protects HT22 neurons from H₂O₂-induced apoptosis by inhibiting the MAPK signaling pathway. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 19(3), 163-169.
- Zheng, J., Winderickx, J., Franssens, V., and Liu, B. (2018). A mitochondria-associated oxidative stress perspective on Huntington's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 329.
- Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2010). Cell cycle and cell death in disease: Past, present and future. *Journal of Internal Medicine*, 268(5), 395-409.

- Zhou, J. Y., and Zhou, S. W. (2012). Isorhynchophylline: A plant alkaloid with therapeutic potential for cardiovascular and central nervous system diseases. *Fitoterapia*, 83(4), 617-626.
- Zhou, J., Zhang, Y., Li, S., Zhou, Q., Lu, Y., Shi, J., Liu, J., Wu, Q., and Zhou, S. (2020). *Dendrobium nobile* Lindl. alkaloids-mediated protection against CCl₄-induced liver mitochondrial oxidative damage is dependent on the activation of Nrf2 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 129, 110351.
- Zhou, Q., Zhang, H., Wu, Q., Shi, J., and Zhou, S. (2017). Pharmacological manipulations of autophagy modulate paraquat-induced cytotoxicity in PC12 cells. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 8(2), 13-22.
- Zhu, Q., Guo, D., Feng, L., and Sun, D. (2013). Expression and purification of the scFv from hybridoma cells secreting a monoclonal antibody against S protein of PEDV. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 32(1), 41-46.
- Zhu, X., Lee, H. G., Raina, A. K., Perry, G., and Smith, M. A. (2002). The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *Neurosignals*, 11(5), 270-281.
- Zubčić, K., Hof, P. R., Šimić, G., and Jazvinščak Jembrek, M. (2020). The role of copper in tau-related pathology in Alzheimer's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 572308.
- Zuo, X., Zhou, J., Li, Y., Wu, K., Chen, Z., Luo, Z., Zhang, X., Liang Y., Esteban, M. A., Zhou, Y., and Fu, X. D. (2021). TDP-43 aggregation induced by oxidative stress causes global mitochondrial imbalance in ALS. *Nature Structural & Molecular Biology*, 28(2), 132-142.
- Zündorf, G., and Reiser, G. (2011). Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(7), 1275-1288.



Gazili olmak ayrıcalıktır...