



**ÇOKLU DOYMAMIŞ YAĞ ASİTLERİNİN İNSAN SH-SY5Y
HÜCRELERİNDE A β ₁₋₄₂ TOKSİSİTESİYLE OLUŞTURULAN
ALZHEİMER MODELİNDEKİ ETKİLERİNİN *İN VİTRO* YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

Mualla Pınar ELÇİ

**DOKTORA TEZİ
BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2024

ETİK BEYAN

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

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

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

Mualla Pınar ELÇİ

16.07.2024

ÇOKLU DOYMAMIŞ YAĞ ASİTLERİNİN İNSAN SH-SY5Y HÜCRELERİNDE $A\beta_{1-42}$
TOKSİSİTESİYLE OLUŞTURULAN ALZHEİMER MODELİNDEKİ ETKİLERİNİN *İN*
VİTRO YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Mualla Pınar ELÇİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2024

ÖZET

Alzheimer hastalığı (AH), bilişsel fonksiyonlarda bozulma ile karakterize ilerleyici, kronik bir hastalıktır. Günümüzde AH'nin tam tedavisi bulunmamaktadır, mevcut tedaviler belirtileri azaltmak ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak şeklindedir. Yağ asitlerinin tüketim miktarları ve aralarındaki dengenin nörolojik hastalıklardan koruyucu olabileceği düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında, $\Omega 3/\Omega 6$ çoklu doymamış yağ asitlerinin (ÇDYA) oranlarının, $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelindeki hücre canlılığı, hücre içi ROT miktarı, apoptoz oranları, azalan mitokondriyal membran potansiyeli üzerine koruyucu etkileri, asetilkolin esterase (AChE) enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkileri ve pro/antiinflamatuvar sitokinler üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. $\Omega 6$ ve $\Omega 3$ yağ asitleri uygulanan hücrelerin canlılığı MTT testi ile belirlendi. Apoptotik hücrelerin yüzdesi, FITC-konjuge Annexin-V/PI ile tespit edildi. TNF- α , COX-2, IL-6, NF κ B ve TGF β 1 genlerinin ekspresyon seviyeleri Real-Time PCR ile sitokin salınımları ise Enzime Bağlı İmmün Sorbent Tahlili (ELISA) yöntemi kullanılarak belirlendi. ROT, MMP ve Hücre döngü analizleri akış sitometrisi ile yapıldı. Çalışma sonuçlarımıza göre, 48 saat $\Omega 3/\Omega 6$ oranları uygulaması sonucu MTT testinde, 1/1, 1/2 ve 1/8 dozlarında istatistiksel olarak anlamlı düşüş, 1/4 ve 1/16 gruplarında ise artış gözlenmiştir. Apoptoz sonuçlarına göre, 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16 dozlarının 48 saat uygulamadan sonra kontrol grubunda %95,7 olan hücre canlılığının sırasıyla, %95,6, %81,4, %86,2, %32,2 ve %19,8'e düştüğü, $\Omega 6$ dozu arttıkça yüzde canlılığının azaldığı bulunmuştur. ROT ve MMP düzeylerinin, kontrol grubuna göre tüm gruplarda azaldığı tespit edilmiştir. Oksidatif strese karşı en yüksek nörokoruyucu etki 1/1 dozunda gözlenmiştir. $A\beta_{1-42}$ 'nin neden olduğu hücre döngüsündeki blokajı ise 1/8 dozunun kısmi de olsa düzeltilebildiği gözlenmiştir. AChE enzim aktivitesinde, 1/4, 1/8 ve 1/16 dozlarında istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlenmiştir. TNF- α ve IL-6 mRNA ekspresyon seviyesi; en düşük 1/4 dozunda, en yüksek ise 1/16 dozunda bulunmuştur. COX-2 mRNA ekspresyon seviyesinin en yüksek 1/4, 1/8 ve 1/16 dozlarında $\Omega 6$ oranı arttıkça anlamlı olarak arttığı, en düşük seviyenin ise 1/1 dozunda olduğu gözlenmiştir. TGF β 1 mRNA ekspresyon seviyesi; 1/4 ve 1/8 dozlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. TNF- α ve IL-6'nın protein seviyeleri en düşük 1/2 ve 1/4 dozlarında görülmüştür. COX-2 protein seviyesinin 1/8 dozunda istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur. TGF β 1 protein seviyelerinde istatistiksel anlamlı artış 1/4 ve 1/16 dozlarında bulunmuştur. Sonuç olarak, $\Omega 6$ ve $\Omega 3$ yağ asitleri 1/4 ve 1/8 dozlarında kullanıldığında nöroinflamasyonu azaltabileceği ve Alzheimer hastalığına karşı koruyucu etki sağlayabileceği söylenebilir.

Bilim Kodu : 10103.11

Anahtar Kelimeler : Alzheimer, $A\beta_{1-42}$, Apoptoz, MMP, Omega 3, Omega 6, ROT, SH-SY5Y

Sayfa Adedi : 115

Danışman : Prof. Dr. Sevgi AKAYDIN

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF POLYUNSATURATED FATTY ACIDS ON THE ALZHEIMER MODEL CAUSED BY A β ₁₋₄₂ TOXICITY IN HUMAN SH-SY5Y CELLS BY *IN VITRO* METHODS

(Ph. D. Thesis)

Mualla Pınar ELÇİ

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

June 2024

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a progressive, chronic disease characterized by impaired cognitive function. Currently, there is no complete cure for AD; current treatments are aimed at reducing symptoms and slowing the progression of the disease. It is thought that the amount of fatty acid consumption and the balance between them may be protective against neurological diseases. In this thesis, it was aimed to determine the protective effects of Ω 3/ Ω 6 polyunsaturated fatty acids (PUFA) ratios on cell viability, intracellular ROS, apoptosis rates, decreased mitochondrial membrane potential, inhibitory effects on acetylcholine esterase (AChE) enzyme activity and pro/anti-inflammatory cytokines in A β ₁₋₄₂-induced AD model in SH-SY5Y cells. The viability of cells treated with Ω 6 and Ω 3 fatty acids was determined by MTT assay. The percentage of apoptotic cells was determined by FITC-conjugated Annexin-V/PI. Expression levels of TNF- α , COX-2, IL-6, NF κ B and TGF β 1 genes were determined by Real-Time PCR and cytokine release was determined by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). ROS, MMP and cell cycle analysis were performed by flow cytometry. According to our study results, a statistically significant decrease was observed in the MTT test after 48 hours of Ω 3/ Ω 6 ratios application in 1/1, 1/2 and 1/8 groups, and an increase was observed in 1/4 and 1/16 groups. According to the apoptosis results, it was found that the cell viability of 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 and 1/16 doses decreased from 95.7% in the control group to 95.6%, 81.4%, 86.2%, 32.2% and 19.8%, respectively, after 48 hours of application, and the percentage viability decreased as the Ω 6 dose increased. ROS and MMP levels were detected to decrease in all groups compared to the control group. The highest neuroprotective effect against oxidative stress was observed at 1/1 dose. A β ₁₋₄₂ induced blockade of the cell cycle was observed to be partially corrected by 1/8 dose. A statistically significant decrease in AChE enzyme activity was observed at 1/4, 1/8 and 1/16 doses. TNF- α and IL-6 mRNA expression levels were lowest at 1/4 dose and highest at 1/16 dose. COX-2 mRNA expression level increased significantly with increasing Ω 6 ratio at the highest 1/4, 1/8 and 1/16 doses, and the lowest was observed at the 1/1 dose. TGF β 1 mRNA expression level showed a statistically significant increase at 1/4 and 1/8 doses. Protein levels of TNF- α and IL-6 were lowest at 1/2 and 1/4 doses. COX-2 protein levels were statistically significant at 1/8 dose. TGF β 1 protein levels were statistically significant at 1/4 and 1/16 doses. As a result, it can be said that Ω 6 and Ω 3 fatty acids, when used in 1/4 and 1/8 doses, can reduce neuroinflammation and provide a protective effect against Alzheimer's disease.

Science Code : 10103.11

Key words : Alzheimer, A β ₁₋₄₂, Apoptosis, MMP, Omega 3, Omega 6, ROS, SH-SY5Y

Page Number : 115

Supervisor : Prof. Dr. Sevgi AKAYDIN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimleri ile destek olan, yardımını esirgemeyen, tez danışmanım ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sevgi AKAYDIN'a şükran ve saygılarımı sunarım.

Ders aşamam, tez çalışmam ve deneylerim boyunca katkı ve desteklerini esirgemeyen Biyokimya Ana Bilim Dalı Başkanı ile tüm öğretim üyeleri ve yardımcılara çok teşekkür ederim.

Çalışmalar yürütülürken harcadıkları emekten, paylaştıkları tecrübelerinden ve yararlandığım bilgi birikimlerinden dolayı değerli mesai arkadaşlarım Uzm. Biyolog Tuğba FATSA, Uzm. Biyolog Meral SARPER, Uzm. Biyolog Sema ÖREN ve Uzm. Biyolog Ömer Faruk KIRLANGIÇ' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü ARGE Merkez Başkanlığı Laboratuvarlarında çalışmamın yapılmasına olanak sağlaması ve desteği nedeniyle değerli hocam ARGE Merkez Başkanı Prof. Dr. Ali ALBAY'a ve kıymetli amirim Prof. Dr. Cansel KÖSE ÖZKAN' a teşekkürlerimi sunarım.

Desteğini her zaman hissettiğim, emeği ve desteği ile daima yanımda olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ece SALİHOĞLU hocama çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamı destekleyen Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje no: TDK-2023-8380)' ne teşekkür ederim.

Bu zorlu süreçte emek ve sabır göstererek hep benimle oldukları için canım eşim ve canım oğullarıma sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Kendisi de Alzheimer hastası olan anneme ve tüm Alzheimer hastaları ile ailelerine sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Alzheimer Hastalığı.....	7
2.1.1. AH’ nin fizyopatolojisi	8
2.1.2. AH’ de risk faktörleri.....	13
2.1.3. AH’ de nöroinflamasyonun rolü.....	14
2.1.4. AH’ de oksidatif stresin rolü.....	18
2.2. Yağ Asitleri.....	19
2.2.1. Doymuş yağ asitleri	19
2.2.2. Doymamış yağ asitleri	20
2.2.3. ÇDYA’ nin inflamasyon üzerine etkisi ve nörodejeneratif hastalıklardaki rolü	22
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	27
3.1. Kullanılan Cihazlar	27
3.2. Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeleri.....	27
3.3. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücre Hattı Eldesi ve Çoğaltılması	29
3.4. Hücrelerin Pasajlanması	30

	Sayfa
3.5. Hücre Sayısının Belirlenmesi ve Canlılık Ölçümü.....	30
3.6. Hücrelerin Dondurulması	31
3.7. Amiloid β 1-42' nin Hazırlanması	31
3.8. MTT Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi.....	31
3.9. Yağ Asitlerinin Hazırlanması	32
3.9.1. Eikozapentaenoik asit (EPA) hazırlanması.....	32
3.9.2. Linoleik asit (LA) hazırlanması.....	32
3.9.3. Yağ asitlerinin oranlarının belirlenmesi	33
3.10. A β 1-42 ile SH-SY5Y Hücrelerinde Oluşturulan <i>In Vitro</i> AH Modelinin Tespit Edilmesi	33
3.10.1. Kongo red boyaması.....	33
3.10.2. Asetilkolinesteraz (AChE) protein tayini	33
3.11. RT-PCR İçin Hücrelerin Hazırlanması.....	35
3.12. RNA İzolasyonu, Ölçümü, cDNA Sentezi ve RT- PCR Analizi.....	36
3.12.1. RNA izolasyonu	36
3.12.2. Total mRNA izolasyonu kit protokolü.....	36
3.12.3. RNA saflığının belirlenmesi ve konsantrasyon hesaplanması	37
3.12.4. cDNA sentezi	37
3.12.5. RT-PCR analizi	38
3.12.6. RT-PCR uygulamasında kullanılan primerler	40
3.12.7. RT-PCR analiz yöntemi	41
3.13. Akım Sitometri ile Annexin V, MMP, ROT ve Hücre Döngüsü Analizi.....	42
3.13.1. Akım sitometri ile annexin V ölçümü	42
3.13.2. Akım sitometri ile MMP ölçümü	43
3.13.3. Akım sitometri ile ROT ölçümü.....	44
3.14.4. Akım sitometri ile hücre döngüsü analizi.....	45
3.14. Pro ve Antiinflamatuvar Sitokinlerin Ölçümü.....	45

	Sayfa
3.14.1. Nükleer faktör -kappa-B (NFκB) seviyelerinin ölçülmesi	46
3.14.2. Tümör nekrozis faktör alfa (TNF-α) seviyelerinin ölçülmesi	47
3.14.3. İnterlökin-6 (IL-6) seviyelerinin ölçülmesi	49
3.14.4. COX-2 seviyelerinin ölçülmesi	51
3.14.5. Transforming growth faktor beta 1 (TGF-β1) seviyelerinin ölçülmesi	53
3.15. İstatiksel Analiz	56
4. BULGULAR	57
4.1. Hücre Canlılığı Bulguları	57
4.1.1. Amiloid β ₁₋₄₂ 'nin SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı üzerinde 24-48-72 saatlik etkisinin MTT testi sonuçları	57
4.1.2. SH-SY5Y hücre hattı üzerine 48 saat Amiloid β ₁₋₄₂ uygulaması inverted mikroskop görüntüsü	58
4.1.3. SH-SY5Y hücre hattı üzerine 48 saat amiloid β ₁₋₄₂ uygulaması Kongo red boyası inverted mikroskop görüntüsü.....	59
4.1.4. ÇDYA (Ω3/Ω6) 48 saat uygulamalarının Aβ ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki AChE protein miktarı bulguları.....	60
4.1.5. Çeşitli dozlardaki ÇDYA (Ω3 ve Ω6) 48 saat uygulamalarının Aβ ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki hücre canlılığı üzerine etkisinin sonuçları	61
4.1.6. ÇDYA (Ω3/Ω6) oranlarının 48 saat uygulamalarının Aβ ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki etkisinin MTT testi sonuçları	66
4.1.7. ÇDYA (Ω3/Ω6) oranlarının 48 saat uygulamalarının SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı üzerindeki etkisinin inverted mikroskop görüntüsü	67
4.2. ÇDYA (Ω3/Ω6) Oranlarının 48 Saat Uygulamalarının Aβ ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y Hücrelerinde Oluşturulan <i>İn Vitro</i> AH Modelindeki Akım Sitometri Bulguları	68
4.2.1. Apoptoz bulguları	68
4.2.2. ROT bulguları	69
4.2.3. MMP etkisinin bulguları	70

Sayfa

4.2.4. Hücre döngüsü üzerine olan etkisinin bulguları	71
4.3. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) Uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y Hücrelerinde Oluşturulan <i>İn Vitro</i> AH Modelindeki mRNA Expresyonları ve Protein Seviyeleri	73
4.3.1. NF κ B mRNA ekspresyonları ve protein seviyeleri.....	73
4.3.2. TNF- α mRNA ekspresyonları ve protein seviyeleri	75
4.3.3. IL-6 mRNA ekspresyonları ve protein seviyeleri	77
4.3.4. COX-2 mRNA ekspresyonları ve protein seviyeleri.....	80
4.3.5. TGF β 1 mRNA ekspresyonları ve protein seviyeleri.....	82
5. TARTIŞMA.....	85
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	95
KAYNAKLAR.....	97
ÖZGEÇMİŞ.....	113

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Bazı doymuş yağ asitleri	20
Çizelge 2.2. Bazı doymamış yağ asitleri	20
Çizelge 3.1. SH-SY5Y hücre hattına ait künye bilgileri	29
Çizelge 3.2. AChE standart çözeltilerinin konsantrasyon ve absorbens değerleri	35
Çizelge 3.3. RNA saflık ve miktar tayin tablosu.....	37
Çizelge 3.4. cDNA sentez protokolü.....	38
Çizelge 3.5. cDNA sentez protokolü.....	38
Çizelge 3.6. RT-PCR mix bileşimi.....	39
Çizelge 3.7. Kullanılan primer tablosu.....	41
Çizelge 3.8. NFκB standart çözeltilerinin konsantrasyon ve absorbens değerleri	47
Çizelge 3.9. TNF-α standart çözeltilerinin konsantrasyon ve absorbens değerleri	49
Çizelge 3.10. IL-6 standart çözeltilerinin konsantrasyon ve absorbens değerleri.....	51
Çizelge 3.11. PTGS2\COX-2 standart çözeltilerinin konsantrasyon ve absorbens değerleri	53
Çizelge 3.12. TGF-β1 standart çözeltilerinin konsantrasyon ve absorbens değerleri....	55
Çizelge 4.1. Amiloid β ₁₋₄₂ ' nin SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı üzerindeki 24-48-72 saatlik etkisinin MTT testi sonuçları	57
Çizelge 4.2. ÇDYA (Ω3/Ω6) oranlarının Aβ ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki AChE protein seviyeleri.....	60
Çizelge 4.3. Çeşitli dozlardaki ÇDYA SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı üzerindeki 48 saatlik etkisinin MTT Testi.....	62
Çizelge 4.4. Çeşitli dozlardaki Ω6-ÇDYA 48 saat uygulama sonucu	63
Çizelge 4.5. Çeşitli dozlardaki ÇDYA (Ω3 ve Ω6) 48 saat uygulamalarının Aβ ₁₋₄₂ ile SHSY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki hücre canlılığı üzerine etkisinin yüzde (%)Apoptoz düzeyleri	66
Çizelge 4.6. ÇDYA (Ω3 ve Ω6) oranlarının 48 saat uygulama sonucu.....	66

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.7. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki hücre canlılığı üzerine etkisinin yüzde (%) apoptoz düzeyleri.....	69
Çizelge 4.8. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> ah modelindeki hücrelerin ROT seviyeleri.....	70
Çizelge 4.9. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki hücrelerin MMP seviyeleri	71
Çizelge 4.10. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki hücrelerin hücre döngüsü analiz sonuçları	72
Çizelge 4.11. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki NF κ B mRNA ekspresyon seviyeleri	73
Çizelge 4.12. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki NF κ B protein seviyeleri.....	75
Çizelge 4.13. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki TNF- α mRNA ekspresyon seviyeleri	76
Çizelge 4.14. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki TNF- α protein seviyeleri	77
Çizelge 4.15. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki IL-6 mRNA ekspresyon seviyeleri.	78
Çizelge 4.16. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki IL-6 protein seviyeleri	79
Çizelge 4.17. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki COX-2 mRNA ekspresyon seviyeleri	80
Çizelge 4.18. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki COX-2 protein seviyeleri.....	81
Çizelge 4.19. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki TGF β 1 mRNA ekspresyon seviyeleri	82
Çizelge 4.20. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki TGF β 1 protein seviyeleri.....	83

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Hiperfosforile tau hipotezi. Tau proteinleri genellikle amino asitlerin amino kalıntılarına bağlanarak hiperfosforile olur, bu monomerler oligomerik tau protein yumaklarını oluşturur ve bu da nörofibriler yumaklar oluşturarak hücre ölümüyle sonuçlanır	9
Şekil 2.2. APP' nin amiloidojenik ve amiloidojenik olmayan işlenmesi	10
Şekil 2.3. AH' nin patogenezinde ve tedavisinde kolinerjik hipotez.....	11
Şekil 2.4. AH' nin patogenezinde ve tedavisinde metal iyon hipotezi	12
Şekil 2.5. Amiloid- β türlerine mikrogial yanıt.....	15
Şekil 2.6. Eikozapentaaenoik asit.....	21
Şekil 2.7. Linoleik asit.....	22
Şekil 3.1. AChE kalibrasyon grafiği	35
Şekil 3.3. NF κ B kalibrasyon grafiği.....	47
Şekil 3.3. TNF- α kalibrasyon grafiği	49
Şekil 3.4. IL-6 kalibrasyon grafiği	51
Şekil 3.5. PTGS2\COX-2 kalibrasyon grafiği.....	53
Şekil 3.6. TGF- β 1 kalibrasyon grafiği	55
Şekil 4.1. Amiloid β_{1-42} 'nin SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı üzerindeki 24-48-72 saatlik etkisinin MTT testi sonuçları.....	58
Şekil 4.2. 48. saat sonunda SH-SY5Y hücre hatları üzerine Amiloid β_{1-42} uygulanan ve uygulama yapılmayan gruplara ait inverted mikroskop görüntüsü	59
Şekil 4.3. 48. saat sonunda SH-SY5Y hücre hatları üzerine amiloid β_{1-42} uygulanan ve uygulama yapılmayan gruplara ait Kongo red boyaması mikroskop görüntüsü.....	59
Şekil 4.4. ÇDYA (Ω 3/ Ω 6) oranlarının A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki AChE protein seviyeleri arasındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi	61
Şekil 4.5. Çeşitli dozlardaki ÇDYA SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı üzerindeki 48 saatlik etkisinin MTT testi sonuçları.....	62
Şekil 4.6. Çeşitli dozlardaki ÇDYA SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı üzerindeki 48 saatlik etkisinin MTT testi sonuçları.....	64

Şekil	Sayfa
Şekil 4.7. Çeşitli dozlardaki ÇDYA ($\Omega 3$ ve $\Omega 6$) 48 saat uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SHSY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki hücre canlılığı üzerine etkisinin Annexin V görüntüleri.....	65
Şekil 4.8. Çeşitli oranlardaki ÇDYA SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı üzerindeki 48 saatlik etkisinin MTT testi sonuçları.....	67
Şekil 4.9. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı üzerindeki etkisinin inverted mikroskop görüntüsü.....	68
Şekil 4.10. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki hücre canlılığı üzerine etkisinin annexin v analiz görüntüleri	69
Şekil 4.11. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> ah modelindeki hücrelerin ROT seviyeleri analiz görüntüleri	70
Şekil 4.12. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki hücrelerin MMP analiz görüntüleri	71
Şekil 4.13. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki hücrelerin hücre döngüsü analiz görüntüleri	72
Şekil 4.14. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki NF κ B mRNA ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.....	74
Şekil 4.15. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki NF κ B protein seviyeleri arasındaki farklılığı gösteren KruskalWallis testi.....	75
Şekil 4.16. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki TNF- α mRNA ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.....	76
Şekil 4.17. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki TNF- α protein seviyeleri arasındaki farklılığı gösteren Kruskal Wallis testi.....	77
Şekil 4.18. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki IL-6 mRNA ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.....	78
Şekil 4.19. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki IL-6 protein seviyeleri arasındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi	79

Şekil	Sayfa
Şekil 4.20. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki COX-2 mRNA ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.....	80
Şekil 4.21. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki COX-2 protein seviyeleri arasındaki farklılığı gösteren KruskalWallis testi.....	82
Şekil 4.22. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki TGF $\beta 1$ mRNA ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.....	83
Şekil 4.23. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan <i>in vitro</i> AH modelindeki TGF $\beta 1$ protein seviyeleri arasındaki farklılığı gösteren Kruskal Wallis testi.....	84

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. SHSY-5Y hücre hattı görüntüsü	30
Resim 3.2. Real-Time PCR’da gözlenen eşik değeri eğrileri (Ct)	39
Resim 3.3. Erime eğrisi analizi.....	40

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
CT	Eşik Döngüsü
ml	Mililitre
ng	Nanogram
nM	Nanomolar
pg	Pikogram

Kısaltmalar

Açıklamalar

AChE	Asetilkolinesteraz
ALA	α - Linolenik Asit
APP	Amiloid Prekürsör Protein
ATCC	American Type Culture Collection
A β ₁₋₄₂	Amiloid Beta 1-42
cDNA	Komplementer DNA
COX-2	Siklooksijenaz-2
DMEM	Dulbecco's Modified EagleMedium
DMSO	Dimetilsülfoksit
dNTP	Deoksinükleosid Trifosfat
EPA	Eikozapentaenoik Asit
FBS	Fetal Bovine Serum
GAPDH	Gliseraldehit -3-Fosfat Dehidrojenaz
IL-10	İnterlökin 10
IL-6	İnterlökin 6
I κ B	IkappaB kinaz

Kısaltmalar**Açıklamalar****LA**

Linoleik Asit

MDA

Malondialdehit

MMP

Mitokondri Membran Potansiyeli

mRNA

Mesajcı RNA

MTT

Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide

NFT

Nörofibriller Yumaklar

NFκB

Nükleer Faktör Kabba B

PBS

Fosfat Buffered Saline

PCR

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNA

Ribonükleik Asit

ROT

Reaktif oksijen türleri

RT-PCR

Real Time-PCR

SHSY-5Y

Human Neuroblastoma Cells

TGFβ1

Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta

TNF-α

Tümör Nekroz Faktör Alfa

1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH), klinik olarak, hafıza ve mantıklı düşünme süreci dahil olmak üzere bilişsel fonksiyonlarda bozulma ile karakterize ilerleyici, kronik bir hastalıktır [1]. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ, WHO) 2022 verilerine göre dünyada yaklaşık 55 milyon demans hastası bulunmaktadır ve bu hastaların %60-70'i AH'ye sahiptir. Bu veriler, 2030 yılında AH'li hasta sayısının 78 milyona 2050'de ise 139 milyona çıkması beklendiğini göstermektedir [2].

AH ve hastalık semptomlarını tamamen iyileştiren bir tedavi henüz yoktur. AH hastalığı tedavisinde semptomlara yönelik Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (USAFDA) tarafından onaylanmış sadece altı ilaç vardır. Bunlardan dört tanesi

Asetilkolinesteraz inhibitörü (Rivastigmin, galantamin, donepezil, tacrin), bir tanesi Nmetil D-aspartat (NMDA) reseptör agonistidir (Memantin) [3]. 2023 yılında FDA onayı almış altıncı ilaç Lecanemab, Alzheimer hastalığına yol açan amiloid protein plaklarını hedef alan bir insan monoklonal antikorudur. Ancak bu ilaçların, farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerine bağlı olarak toksisiteleri ile bradikardi, senkop, ajitasyon ve diğer kolinerjik etkiler olan kafa karışıklığı, kabızlık, baş ağrısı, baş dönmesi, vücut ağırlığında artış ve hipertansiyon yan etkileri kullanımlarını sınırlandırmaktadır [4]. AH patogenezi, Amiloid beta ($A\beta$) proteinin birikimiyle, amiloid /senil plaklar ve hiperfosforile Tau proteininin birikimi sonucu nörofibriler yumakların (NFT) oluşumuyla karakterizedir. Bu anormal protein birikimi sinapslarda dejenerasyon ve nöronların ölümüyle sonuçlanan bir dizi mekanizmayı başlatmaktadır [5, 6]. Amiloid Prekürsör Proteinini (APP) parçalayan enzimler çalışmadığı ve $A\beta$ proteini metabolize edilemediği için $A\beta$ birikimi başlar. Bu birikim, oksidatif stres, hücre zarı bozulmaları, mitokondriyal metabolizmadaki bozukluklar, hücre döngüsü kusurları, anormal proteinlerin katlanmaları, DNA hasarı gibi birçok hasara sebep olur [7].

Diyetsel faktörlerin metabolizmada anahtar rol üstlendiği ve nörokoruyucu sitokin salınımında etkisi olduğu bilinmektedir. Diyet kompozisyonunun ve dolaşımdaki yağ asidi seviyelerindeki değişikliklerin hipotalamik inflamasyonda rol oynadığı bildirilmiştir. Yağ asitlerinin tüketim miktarları ve aralarındaki dengenin nörolojik hastalıklardan koruyucu olabileceği düşünülmektedir.

Tıptaki ilerlemeler ve teknolojideki gelişmelerle birlikte, biyoaktif lipitler olarak adlandırılan sinyal molekülleri keşfedilmiştir. Biyoaktif lipitler hücre büyümesi, proliferasyonu ve apoptozu gibi çeşitli hücresel süreçlerin ayırt edici araçlardır. Ayrıca bu lipitler inflamasyonu regüle eden siklooksijenaz (COX) yolları üzerinde de düzenleyici faaliyet göstermektedir [8]. Biyoaktif lipitler eikozanoidleri, fosfolipitleri, sfingolipitleri,

endokannabinoidleri ve son yıllarda keşfedilen özelleşmiş ön çözünür lipit araçları (specialized pro-resolving lipit mediators-SPMs) içermektedir. Bu moleküller proinflamatuvar eikozanoidlerin üretimini, nöronal apoptozisi, glial hücre aktivitesinin izlemine ve santral sinir sistemi homeostazısını regüle ederler. Örneğin, sfingolipitler hücre büyümesini, apoptozisi, immün yanıtları düzenlerken; SPM'ler inflamasyonun çözülmesinde rol oynar; eikozanoidler inflamasyon tetikleyicisi olarak işlev görür ve fosfolipitler öncelikle hücre zarı fizyolojisini düzenlerler [8].

Memeli beyninin yaklaşık % 60'ı fosfolipitlerden oluşmaktadır [9]. Beyindeki yağ asitlerinin %25'ini omega 3 ($\Omega 3$) yağ asidi olan dokosaheksaenoik asit (DHA) ve omega 6 ($\Omega 6$) yağ asidi olan araşidonik asit (AA) oluşturmaktadır. Beyindeki toplam $\Omega 3$ miktarının %90'ını da DHA oluşturmaktadır. Bu uzun zincirli yağ asitlerinin vücutta sentezi için diyetle alınan alfa-linolenik asit (ALA) tüketimi önem kazanmaktadır [10]. $\Omega 3$ Eikozapentaenoik asit (EPA) beyindeki inflamasyonun hem şiddetini azaltır hem de inflamasyonun çözülmesinde rol oynar. Beyin için tek EPA ve DHA kaynağı kan dolaşımıdır o yüzden seviyelerini kan dolaşımında değerlendirmek daha mantıklıdır. EPA ve DHA'nın doku seviyelerindeki farklılıklarına ek olarak, beyindeki fosfolipid konumlarında da farklılıklar vardır, DHA baskın olarak fosfatidiletanolamin (PE) ve fosfatidilserin (PS) de bulunurken, EPA çoğunlukla fosfatidilinositolde esterleşmiş yağ asitidir [197].

Beyindeki uzun zincirli $\Omega 3$ seviyeleri, $\Omega 3$ ve uzun zincirli $\Omega 3$ 'ün diyetle alımı ile yüksek oranda ilişkilendirilmiştir. EPA, DHA ve AA inflamasyon mekanizmasında düzenleyici olarak aktif yer alan, dokosanoidler ve eikozanoidler olarak bilinen birçok biyoaktif lipitin de öncülleridirler. Biyoaktif lipitler eikozanoidler, prostaglandinler, prostasiklinler, tromboksanlar, lökotrienler, lipoksinler, hidroksi eikozatetraenoik asitler ve epoksi eikozatrienoik asitler gibi pek çok alt sınıfa ayrılmaktadır. Bu lipitlerin tümü, hem inflamatuvar hem de antiinflamatuvar etkilere sahip oldukları için ve bağışıklık

mekanizmasını da modüle ettikleri için inflamasyonun düzenlenmesinde büyük role sahiptirler [11].

Hayat döngüsü boyunca homeostaz ve sağlıklı gelişim için $\Omega 6$ ve $\Omega 3$ yağ asitlerinin dengesi çok önemlidir. Diyetteki $\Omega 6/\Omega 3$ yağ asitleri arasındaki oranın değişimi farklı metabolik etkilere sebep olur. Yağ asitleri arasındaki denge ve bu dengenin metabolik etkilerini anlamak çeşitli araştırmaların konusu olmaktadır. Farklı beslenme tarzları farklı yağ asidi oranları içerir, $\Omega 6/\Omega 3=15-20/1$ oranı ‘Batı tarzı beslenme’ biçimi olarak adlandırılmaktadır [12]. $\Omega 6/\Omega 3$ oranındaki yükseklik kardiyovasküler hastalık, obezite, diyabet, kanser ve inflamatuvar otoimmün hastalık riski ile ilişkilendirilmektedir.

$\Omega 6/\Omega 3=13/1$ oranı kronik hastalık varlığı ile ilişkilendirilirken, bu oranın 7/1’e düşürülmesinin kanser ve kardiyovasküler hastalıklardan koruduğu bildirilmektedir. Ayrıca, 7/1 olan bu oran sağlıklı beslenme hedeflerinden biri olarak isimlendirilmektedir.

Yapılan çalışmayla $\Omega 6/\Omega 3=4/1$ oranının kardiyovasküler ölümleri %70 oranında azalttığı bildirilmiştir [13]. $\Omega 6/\Omega 3=2/1$ oranının ise inflamatuvar hastalıklarda inflamasyonu baskıladığı gözlenmiştir. İnflamasyonu baskılayan oranın 1-3/1 aralığında olduğu belirten farklı çalışmalar da bildirilmiştir [14, 15].

Farklı yaş grupları ve milletlerden bireylerin beslenmelerindeki ÇDYA günlük alım miktarları ve oranları çalışılmış, ALA’ nın 1,4-2,37 g/gün, LA’ nın 6,1-15,90 g/gün alınımının olduğu gösterilmiştir. Yine bu çalışmada ALA/LA oranlarının ABD’ de 9,9/1-10,07/1, Fransa da 8,60/1-9,33/1 ve balık tüketiminin çok olduğu Japonya da ise bu oranın 3,28/1-5/1 olduğu bildirilmiştir. Yetişkin bir insanın günlük 2000 kcal’ lik diyetle, aldığı enerjinin %2’ sinin LA ve % 0,3’ ünün DHA+ EPA olması tavsiye edilmektedir [198].

Bir makalede $\Omega 6/\Omega 3$ oranının düşüklüğünün; sistemik inflamasyonu baskıladığı, kardiyovasküler hastalıklarda endotel aktivasyonu önlediği bunun yanında akut ve kronik hastalıklarda, kronik böbrek yetmezliğinde ve akut pankreatitteki biyokimyasal parametreleri düzelttiği belirtilmiştir.[16]. Bu çalışmada ayrıca $\Omega 3$ ’ün COX-1 ve COX-2 metabolik yollarını baskılayarak inflamasyonu azalttığı bildirilmiştir. Araştırmacılar yağasitleri oranlarında uygun dengenin bulunması halinde inflamasyonu azaltılabileceğini ve uygun beslenme tedavisinin oral aspirin tedavisinin yerini alabileceğini vurgulamışlardır.

Yapılan deneysel bir hayvan çalışmasında farelerin diyetlerine $\Omega 3$ yağ asitleri ve doymuş yağ asidi olan palm yağı ilave edilmiş, farelerin hipokampusündeki $\Omega 6/\Omega 3$ değişim oranları incelenerek $\Omega 3$ yağ asitlerinin olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir.[17]. Diyetle alınan yağ asitlerinin miktar ve aralarındaki oranın nörolojik hastalıklardan da koruduğu bunu immün düzenleyici ve antiinflamatuvar özelliklerinden dolayı yaptıkları öne sürülmektedir [18]. Cunnane ve arkadaşları çalışmalarında AH grubunda hem plazma hem de beyin dokusu örneklerinde yağ asitlerini ölçmüşler sağlıklı insanlara göre orta frontal ve üst temporal kortekslerdeki fosfatidilserinde düşük DHA düzeyleri bildirmişlerdir [19]. $\Omega 6$ yağ asitleri LA ve AA ile $\Omega 9$ yağ asidi oleik asidin (OA) AH patolojisi üzerindeki etkisini belirlemek için yapılan *in vitro* bir çalışmada yağ sitlerinin üçünün de hem tau hem de A β 'nin polimerizasyonunu indüklediği gösterilmiştir [20]. AH ile yağ asitleri etkilerinin incelendiği çeşitli hayvan çalışmalarında da $\Omega 3$ yağ asitleri DHA ve EPA ile yapılan diyet takviyesinin, hayvanların bilişsel fonksiyonlarını iyileştirdiği ortaya konmuştur [21, 22]. Yapılan insan çalışmalarında da $\Omega 3$ alan AH bireylerin bilişsel fonksiyonlarında umut verici gelişmeler olduğu belirtilmiştir [23, 24]. Yapılan bir çalışmada CVD hastalarında DHA ve EPA kompleksi kullanıldığında tek başına EPA uygulamasına göre tutarsız sonuçlar elde edilmiş ve yalnız EPA kullanımının daha başarılı olduğu rapor edilmiştir [25].

Şu anda, herhangi bir nörodejeneratif hastalık türü için iyileştirici tedavi mevcut değildir ve bu alanda umut verici pek çok yeniliğe rağmen tedavi stratejileri, nöron kaybını önlemede başarısız olmaktadır. Hastalığı değiştiren tedaviler semptomları hafifletmeye ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatmaya odaklıdır. Nörodejeneratif bozukluklarda ÇDYA takviyesinin olası etkinliği hakkında birikmiş bilimsel kanıtlar vardır. Her ne kadar diyet önerileri nörodejeneratif bozuklukların tedavisi olarak kabul edilmekten uzak olsa da, bazı semptomları hafifletebilir ve en önemlisi yaşam kalitesi üzerinde en büyük etkiye sahip olan bilişsel ve fiziksel gerilemeyi yavaşlatabilir [26]. Çok sayıda çalışma, ÇDYA'lerinin anti-inflamatuvar etkilerini ve bunların Parkinson hastalığı, Demans, Alzheimer hastalığı,

Multipl Skleroz, Huntington hastalığı ve Amyotrofik Lateral Skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklarda terapötik ajanlar olarak potansiyel kullanımlarını vurgulamıştır [27]

Santral sinir sisteminin inflamatuvar hastalıklarında, beslenmede alınan gıdaların proinflamatuvar veya antiinflamatuvar etkilerinin bilinmesi hastalığın seyri açısından çok önemlidir. AH gibi nörodejenartif hastalıkların seyrinde olumlu katkıları olabileceği ve

genetik faktörler göz önüne alındığında bireylerde beslenme şeklini değiştirerek hastalığın ilerlemesinin yavaşlatılmasına etkisi olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamız literatürde bu konuyu araştıran bir çalışma bulunmamasından dolayı özgündür.

Tez çalışmamızda $\Omega 3$ Yağ asitlerinden EPA, $\Omega 6$ yağ asitlerinden LA kullanılarak oluşturulan $\Omega 3/\Omega 6$ yağ asitleri oranlarının, A β 1-42 ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki hücre canlılığı, hücre içi ROT miktarı, apoptoz oranları ve azalan mitokondriyal membran potansiyeli üzerine koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca oluşturulan *in vitro* AH modelinde ÇDYA' ların Asetilkolinesteraz (AChE) enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkileri ile antiinflamatuvar ve proinflamatuvar sitokinler [Nükleer faktör -kappa-B (NFkB), tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), İnterlökin-6 (IL-6), Siklooksijenaz2 (COX-2), Transforming Growth Faktor Beta 1 (TGF- β 1)], üzerine etkilerinin belirlenmesi de amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı, demans, bilişsel ve işlevsel davranış bozukluğu ile karakterize ilerleyici nörodejeneratif bir hastalık olarak tanımlanmaktadır [28]. AH, dünya çapındaki toplam demans vakalarının %60 ila %80' ini oluşturmaktadır ayrıca küresel morbidite ve mortalitenin önemli bir nedenidir. Şu anda dünya çapında 46 milyondan fazla kişinin bu hastalığa sahip olduğu ve 2050 yılına kadar hasta sayısının 131,5 milyona yükseleceği tahmin edilmektedir [29]. Türkiye İstatistik Kurumunun 2021 yılında yayınladığı rapora göre, Türkiye’ de AH sebebiyle hayatını kaybedenlerin sayısı 2015 yılında 12 bin 59 iken 2019 yılında 13 bin 498'e yükselmiştir. AH, çözünemeyen β amiloid peptitlerin ($A\beta$) oluşturduğu senil plakların birikimi ve hiperfosforile tau ilişkili fibrin yumaklarla karakterizedir. Bu anormal protein birikimi kaynaklı lezyonlar, sinapslarda dejenerasyon ve nöron ölümüyle sonuçlanan süreci başlatmaktadır [6].

Çok sayıda çalışma, beyindeki çözünür $A\beta$ seviyesinin yükselmesinin sinaptik işlevi bozabileceğini ve sinaptik nöron yoğunluğunu değiştirdiğini göstermektedir [30]. Bununla birlikte, sinaptik plastisite ve yoğunluk, nöro-/sinapto-trofik fonksiyonlara sahip olan çok sayıda endojen faktör tarafından düzenlenmektedir [31]. Bu nedenle, APP'den türetilen nörotoksik peptitler ile nöro-/sinapto-trofik faktörler arasındaki denge, AH'de sinaptik ve bilişsel işlevlerdeki düşüş oranını belirleyebilmektedir. AH'nin hayvan modellerinde sinaps ve hafıza kaybını önlemede endojen nörotrofik faktörlerin etkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [32, 33]. Yapılan araştırmalar, beyindeki trofik faktörleri artırarak mevcut sinapsları korumak ve/veya sinaps oluşumunu/rejenerasyonunu teşvik etmenin, AH'deki bellek kaybını iyileştirmek için alternatif tedavi hedefi olabileceğini ortaya koymuştur [34].

AH beynin hipokampus bölgesinden başlayarak korteksteki frontal, paryetal ve temporal bölgelere de yayılır. Bellek, konuşma, organizasyon ve mekan bilgisinde bozulmalara sebep olur. Hastaların genelinde içe kapanma, depresyon gibi duygu durum bozuklukları gözlenmektedir [35]. AH ve semptomlarını tamamen iyileştiren kesin bir tedavi yoktur. 2023 yılına kadar AH tedavisinde, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (US-FDA) tarafından onaylanmış yalnızca 5 ilaç kullanılmıştır. Bunlardan dört tanesi Asetilkolinesteraz inhibitörü (Rivastigmin, Galantamin, Donepezil, Tacrin, bir tanesi de N-Metil DAspartat (NMDA)

reseptör agonistidir (Memantin) [3] . 2023 yılında amiloid protein plaklarını hedef alan bir insan monoklonal antikoru olan Lecanemab FDA onayı almıştır. Ancak bu ilaçların, farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerine bağlı olarak toksisiteleri ile bradikardi, senkop, ajitasyon ve diğer kolinerjik etkiler olan kafa karışıklığı, kabızlık, baş dönmesi, vücut ağırlığında artış, hipertansiyon, baş ağrısı gibi yan etkileri kullanımlarını sınırlandırmaktadır [4]. Bu nedenlerden dolayı, AH' de kan beyin bariyerini geçebilen, düşük toksisite ve yüksek biyoyararlanıma sahip yan etkisi daha az olan terapötik ilaçlara ihtiyaç vardır. AH' nin son yıllarda sık görülmesinin nedenleri olarak;

- Ortalama yaşam süresinin artması
- Kronik hastalıkların artışı
- Genetik yatkınlık
- Viral ve bakteriyel enfeksiyonlar sayılabilir.

AH evrelerine göre incelendiğinde üçe ayrılır. Erken evrede en temel problemin bilişsel bozukluk olarak ortaya çıktığı gözlenmektedir. Bu evrede hastalar sadece basit rutin işlerini yapabilmektedir. Orta evre afazi ve apraksi gibi kognitif bozuklukların artmasıyla karakterizedir. Alzheimer hastaları bu evrede ev dışı faaliyetlerini yapamazken hem ev içi aktivitelerde hem de günlük yaşam aktivitelerinde zorlanmaktadır. İleri evre AH'de ise inkontinans, motor işlevlerde sorunlar, yürüme ve beslenmede bozulmalar, özbakımda tam bağımlılık gelişerek hastalığın mevcut klinik tablosuna eklenmektedir [36] .

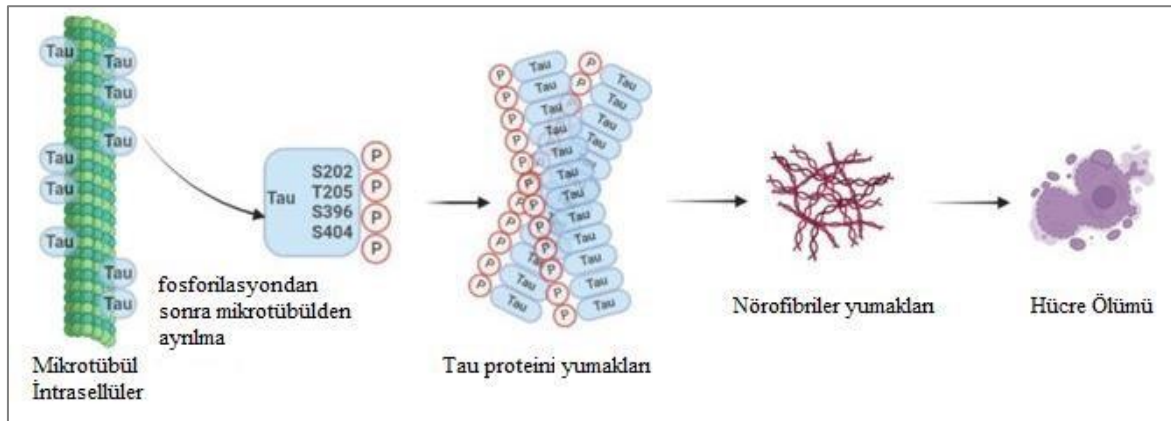
2.1.1. AH' nin fizyopatolojisi

AH' nin patofizyolojisi hakkındaki tartışma, amiloidal plaklar ve hiperfosforile edilmiş NFT'ler dahil olmak üzere hastalığın nöropatolojik özelliklerinin Alois Alzheimer (1907) tarafından gözlemlenmesine kadar uzanır. İlk tanımından bu yana, bu bozukluğu açıklamak için hiperfosforile tau, A β hipotezi, kolinerjik hipotez, nöroinflamasyon hipotezi, oksidatif stres hipotezi ve metal iyon hipotezi gibi bazı farklı hipotezler önerilmiştir [37].

Hiperfosforile tau hipotezi

AH'nin ana semptomları, beyin bazı bölgelerinde yanlış katlanmış A β peptidlerinin yanı sıra hiper fosforile edilmiş tau proteinlerinin birikmesi olarak görülmektedir [38]. Tau, sinir

mikrotübüllerini stabilize eden ve düzenleyen mikrotübül ile ilişkili proteinlerin bir üyesidir. Fakat bazı patolojik durumlarda fosforile edilmiş tau, nöronlar için toksik olan çözünmeyen oluşumlara neden olur [39]. Aşırı ekspresyon ve hiperfosforile tau birikimi aksonal iletimin bozulmasına ve anormal mitokondriyal dağılıma yol açar. Patolojik tau, mitokondriyal fonksiyonu bozar ve mitokondriyal fisyon/füzyon proteinlerini düzenleyerek beyin hasarına sebep olur [40]. (Şekil 2.1)



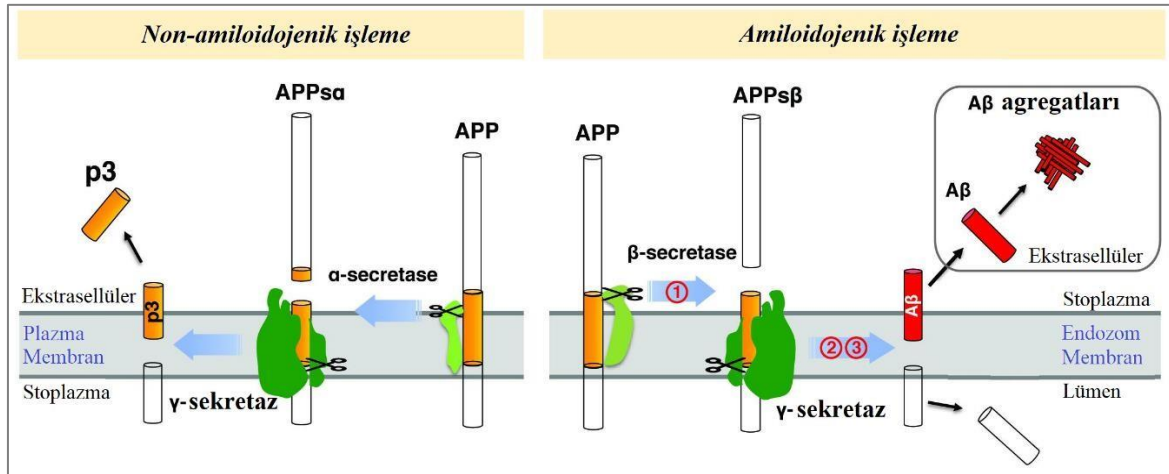
Şekil 2.1. Hiperfosforile tau hipotezi. Tau proteinleri genellikle amino asitlerin amino kalıntılarına bağlanarak hiperfosforile olur, bu monomerler oligomerik tau protein yumaklarını oluşturur ve bu da nörofibriller yumaklar oluşturarak hücre ölümüyle sonuçlanır [40]

A β hipotezi

A β , amiloid öncü proteinlerinin (APP) β ve γ -sekretaz dahil proteazlar tarafından aşamalı olarak bölünmesi yoluyla oluşturulan küçük çözünür peptitlerdir. A β plakları, sinir hasarına, demansa ve ölüme yol açan zararlı fizyolojik değişiklikler döngüsüne neden olan AH'nin unsurlarından biridir. A β peptidlerinin beyin çeşitli alanlarında birikmesi hücre

toksisiteye ve sinaptik fonksiyon bozukluğuna neden olur. Toksisitenin amplifikasyonunun, oligomer yayılımının prion benzeri bir mekanizmayla ilişkili olduğu öne sürülmektedir [41]. A β peptidleri, APP'lerinin bölünmesi yoluyla üretilir. APP'ler beyinde sentezlendikten sonra plazma membranına taşınır ve α -, β - ve γ - sekretazlar tarafından spesifik endoproteolitik bölünmelere uğrar. Genel olarak APP'ler amiloidojenik ve amiloidojenik olmayan iki yoldan biriyle metabolize olur [42] Amiloidojenik olmayan yoldakta, APP'ler α -sekretaz tarafından parçalanır, çözünür N-terminal fragmanı (sAPP α) hücre dışı boşluğa salınır ve C terminal fragmanı (CTF α) membrana bağlı kalır. CTF α , γ sekretaz tarafından intramembranal

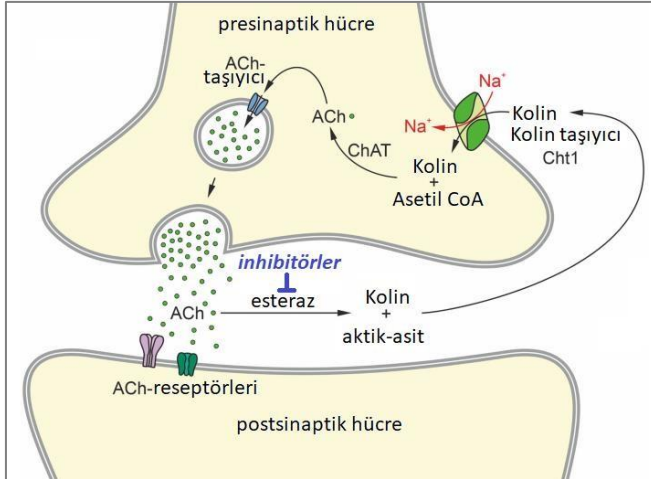
bölünmeye uğrayarak hücre dışı P3 peptidini meydana getirir. APP, sitozole çıkar. Amiloidojenik yolda, APP'ler β -sekretaz tarafından parçalanarak çözünür ve APP β (sAPP β) olarak hücre dışına çıkar. Proteinin geri kalanı (CTF β) plazma membranında kalır. CTF β 'nin γ -sekretaz tarafından daha fazla bölünmesi 40-43 amino asitten oluşan A β peptidlerini oluşturur [43]. Beyin hasarı ve bilişsel bozukluk gibi AH patogenezinde, A β peptitleri anormal şekilde beyinde birikir. Bu nedenle, Alzheimer hastalarının beyinlerindeki bu peptitler AH tedavisi için anahtar hedefler olarak önerilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar birikmiş A β ve tau proteinleri arasında sinerjistik etkilerin olduğunu bildirmiştir [44]. Bu da hücre dışı A β 'nin hücrelere tau alımını arttırdığını düşündürmektedir. (Şekil 2.2)



Şekil 2.2. APP' nin amiloidojenik ve amiloidojenik olmayan işlenmesi [44]

Kolinerjik hipotez

Kolinerjik hipotez, beyin korteks ve hipokampus gibi çeşitli bölgelerindeki kolinerjik fonksiyonların azalması ile ilişkilendirilir. Alzheimer hastalarında kolin asetiltransferaz ve AChE aktivitesindeki değişiklikler, asetilkolin seviyelerinde azalma, beyindeki nikotinik ve muskarinik reseptör seviyelerinde değişiklikler olarak ortaya çıkmaktadır [45]. AH'nin artan klinik belirtileri, beyin ön lobundaki kolinerjik nöronlarda ve Asetilkolin aracılı nörotransmisyonunda azalma ile ilişkilidir. Donepezil gibi kolinesteraz inhibitörleri semptomatik AH tedavisi için 20 yıldan uzun süredir kullanılmaktadır. (Şekil 2.3)



Şekil 2.3. AH' nin patogenezinde ve tedavisinde kolinerjik hipotez [45]

Nöroinflamasyon hipotezi

Nöroinflamasyon erken evrede AH patogenezinde önemli bir faktördür ve nöroinflamasyon hipotezi, AH dahil olmak üzere birçok nörodejeneratif hastalık için yaygın olarak da kullanılmaktadır. Mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres bu hastalıkların patolojileri ile ilişkilidir. Hafif bilişsel bozuklukla birlikte, AH' de beyin ve BOS da yüksek düzeyde pro-inflamatuar araçlar bulunabilir. Akiyama ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, IL-1 β , IL-6 gibi pro-inflamatuar sitokin ve kemokinlerin aşırı salgılanması sonucunda beyinde bulunan makrofajların aktive olduğu ve böylece TNF α , interlökin-8 (IL-8), TGF- β , makrofaj inflamatuvar protein-1 α (MIP-1 α) ile A β plaklarının çözünmeyen formlarının yüksek seviyeleri ile nöroinflamasyonun olduğu gösterilmiştir [200].

Bu nöroinflamasyon, amiloid plakların ve NFT'nin varlığına bağlı olabilir veya bunlara neden olabilir. AH'de kronik proinflamatuvar profil genetik, obezite, hareketsiz yaşam tarzı ve diyabet tarafından indüklenebilir ve sistemik enfeksiyonlar ile şiddetlenir. Kronik inflamasyon, mikrogliaların sitotoksik sitokin salınımına maruz kalmasına neden olarak sinir hasarı ve ölümüne yol açar. Bu da AH semptomlarının ilerlemesine ve bilişsel gerilemeye neden olur [46].

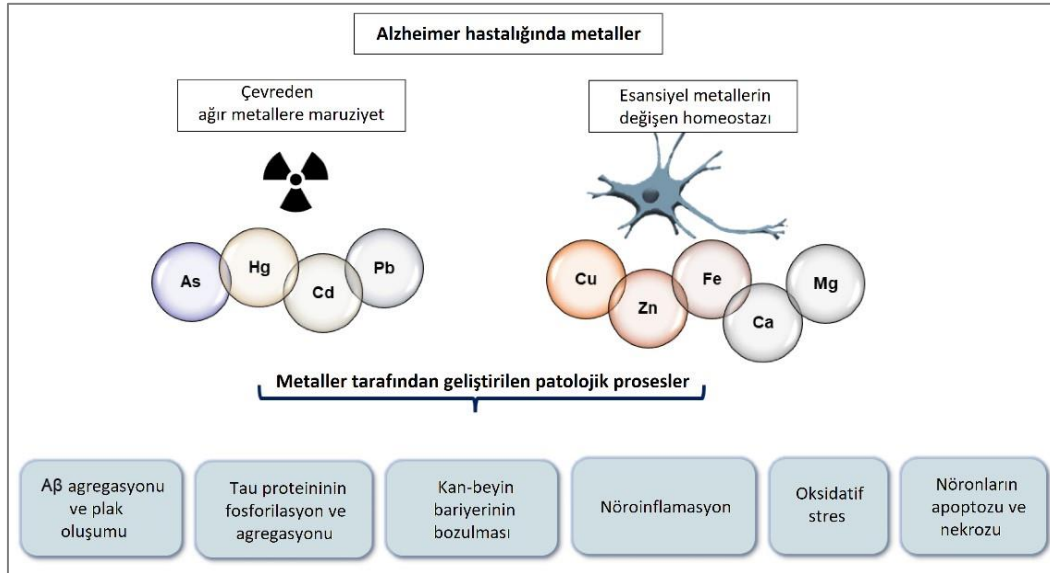
Oksidatif stres hipotezi

Oksidatif metabolik reaksiyonlar ve serbest radikallerin üretimi, AH patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan bazı çalışmaların sonuçları, AH hastalarının beyinde

oksidatif stresin neden olduğu biyolojik belirteçlerde (Lipidler, proteinler, DNA ve RNA gibi biyolojik makromoleküllerin oksidasyonu) artış olduğunu bildirmiştir [47]. Oksidatif stres, esas olarak reaktif oksijen türlerinin (ROT) aşırı üretimi veya antioksidan sistemin işlevsizliğinden kaynaklanan, prooksidan ve antioksidan faktörler arasındaki dengesizliğin neden olduğu bir süreçtir. Bu süreç beyinde yaşla birlikte artar. Yapılan bir çalışmada AH' nin A β birikiminin yanı sıra protein oksidasyonu, protein nitrasyonu, glikol oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu gibi hücresel oksidatif ve nitrozatif stresle son derece ilişkili olduğu gösterilmiştir [48].

Metal iyon hipotezi

Sinir sisteminin bozulmuş metal iyon homeostazı çeşitli dejeneratif nörolojik hastalıklarla ilişkilidir. Beyindeki Cu^{2+} , Zn^{2+} ve Fe^{2+} gibi iyonların homeostazı normal fizyolojik süreçlerin sürdürülmesinde kilit bir rol oynar, dolayısıyla bu iyonların dengesizliği AH'nin başlamasına ve ilerlemesine neden olabilir. Ayrıca bu iyonların dengesizliği, doğrudan ve dolaylı olarak, çeşitli hücresel yolları etkileyerek A β ve tau'nun neden olduğu hasara yol açabilir [49]. (Şekil 2.4)



Şekil 2.4. AH' nin patogenezinde ve tedavisinde metal iyon hipotezi [49]

2.1.2. AH' de risk faktörleri

AH ile ilişkili çeşitli risk faktörlerinin olduğu bilinmektedir. İskemik kalp hastalığı ve/veya felç için bilinen birçok vasküler risk faktörü aynı zamanda AH ile de ilişkilendirilmiştir.

Diyabet, hipertansiyon, sigara ve obezitenin AH riskini arttırdığı bulunmuştur [28].

Serebrovasküler hastalıklar

22 hastane bazlı bir meta-analizde hemorajik enfarktüsler, iskemik kortikal enfarktüsler, ve beyaz cevherdeki farklılaşmalar gibi serebrovasküler değişikliklerin demans riskini arttırdığı belirtilirken, felç geçiren hastaların %7,4'ünde demans geliştiğini bildirilmiştir [50].

Hipertansiyon

Orta yaştaki hipertansiyon, bilişsel bozukluk, demans ve AH riskini arttırdığı buna da kan-beyin bariyerinin vasküler bütünlüğünü bozarak neden olduğu bildirilmiştir [51]. Yapılan bir çalışmada hipertansiyonda görülen protein ekstrasvazasyonunun, hücre hasarına, nöronal veya sinaptik fonksiyonda azalmaya, apoptoza ve A β birikiminde artışa yol açarak bilişsel bozulmaya neden olduğu ilişkilendirilmiştir [52].

Diyabet

Gözlemsel çalışmalarda tip 2 diyabetin AH riskini neredeyse iki katına çıkardığı bulunmuştur [53]. Diyabetin Alzheimer gelişimini etkileyebileceği çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. Diyabete eşlik eden hiperinsülinemi vakalarında insülini yıkan, insülin parçalayıcı enzimin (IDE) A β 'nin beyinden temizlenmesinde azalmayla ilişkili bulunmuştur [54]. Birçok randomize klinik çalışma ile antidiyabetik ilaçların bilişsel bozulma üzerindeki etkileri araştırılmıştır. İntranazal insülin uygulamasının, erken evre AH'li yaşlı hastalarda bilişsel performansı iyi yönde değiştirdiği bildirilmiştir [55]. Tip 2 diyabet hastalarında nöronal insülin seviyesinin azalmasından dolayı meydana gelen serebrovasküler değişimlerin de AH'de etkili olabileceği bildirilmektedir [56]. Diyabetle ilişkili bilişsel işlev bozukluğunun, beyin dokusu atrofisi, hipokampal boyutta azalma, sinir dokusu elektriksel özelliklerinde değişiklik, hipokampal nörogenezde azalma ve nöroprogenitör hücrelerin

(NPC'ler) nöronlara farklılaşması ve çoğalmasında bozulmanın neden olduğu merkezi sinir sistemindeki yapısal değişikliklerin bir sonucu olduğu gösterilmiştir [57, 58].

Obezite

Yüksek vücut ağırlığı olan bireylerin AH ve bilişsel bozukluk riskinin de yüksek olduğunu belirtilmiştir. Dislipidemi, vasküler hastalık riskini artırır ve bu da AH riskinin artmasıyla ilişkilendirilir ve bu ilişkinin obeziteden kaynaklandığı, vücut kitle indeksindeki yüksekliğin AH riskini %59 artırdığı gösterilmiştir [59].

Sigara

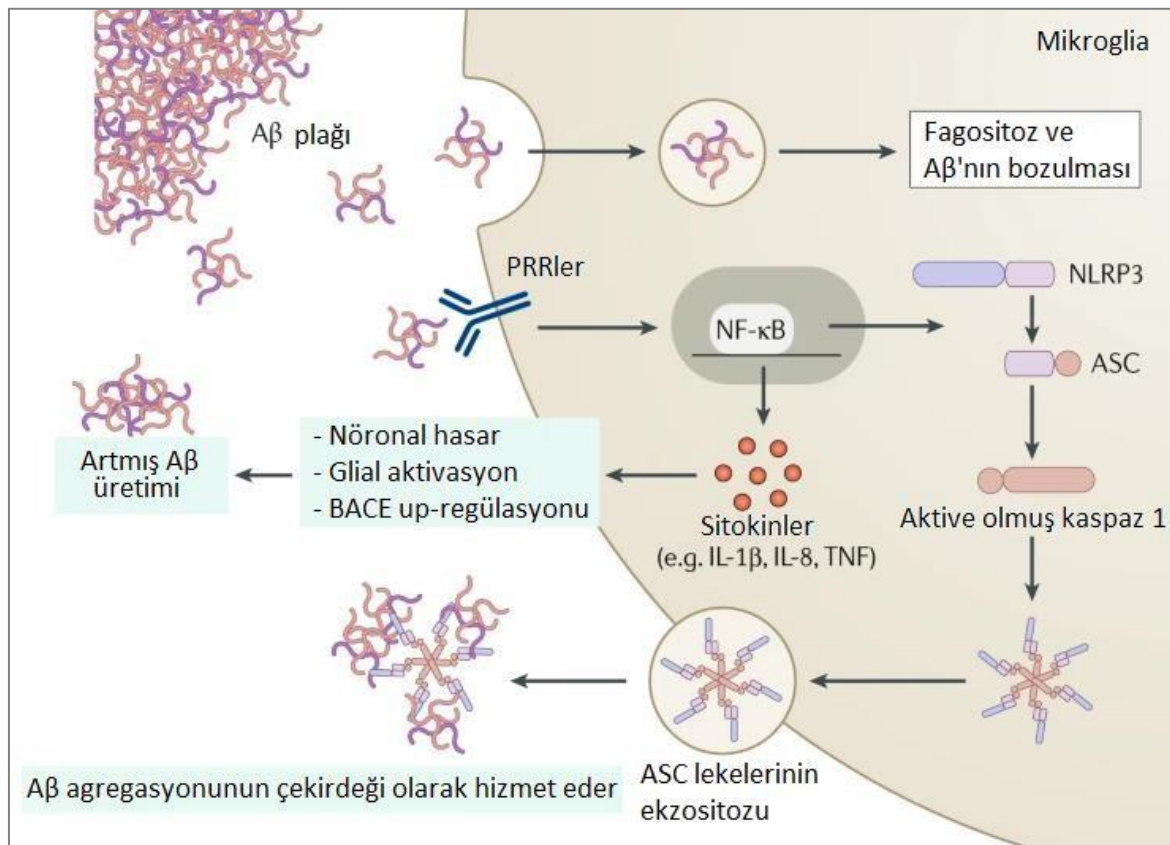
Sigara, hem inflammatuar bağışıklık sistemi hücrelerinde ROT üreten sistemleri aktive eder hem de hücre yüzeyi yapışma moleküllerini uyararak vasküler duvarlarda birikmelerine sebep olur [60]. Bununla birlikte, sigaranın AH'ye karşı koruyucu bir etkiye sahip olabileceğine dair kanıtlar da mevcuttur. Nikotin, nikotinik AChE reseptörlerini aktive ederek hafıza oluşumu ve bilişsel işlev üzerinde etkili olan AChE salınımını ve kalsiyum aktivasyonunu arttırdığı bildirilmiştir [61].

2.1.3. AH' de nöroinflamasyonun rolü

Nöroinflamasyon, glial hücrelerin patolojik koşullara karşı verdiği bir savunma tepkisidir. Otoimmün hastalık ve nörodejeneratif bozukluklardaki rolü nedeniyle terapötik müdahaleler için potansiyel bir hedeftir [62]. Merkezi ve periferik inflamasyon arasında çarpaz bir korelasyon vardır. Bununla birlikte, beyin bağışıklık açısından ayrıcalıklı bir organdır. Patolojik koşullarda, pro-inflamatuar sitokinler kan-beyin bariyerinden transfer olur ve beynin yerleşik makrofajları olan mikrogliya için erken bir uyarıcı görevi görürler[63] . Mikrogliya yanıtları yararlı veya zararlı olabilir. Başlangıçta glial hücreler akut periferik inflamasyona yanıt verir ve fagositoz yoluyla A β yükünü azaltır, daha sonra kronik inflamasyon, inflammatuar sitokinler ve ROT içeren nörotoksik faktörlerin salınmasına neden olur. Bu da MSS'de sinaps kaybından biliş bozukluğuna ve son olarak AH patolojisine kadar etkiler yapabilir [64].

İnflamatuar yanıt, İnterlökin-1 β 'nın (IL-1 β) merkezi bir üye olarak kabul edildiği sitokin sinyal molekülleri tarafından düzenlenir. Bununla birlikte, kronik veya aşırı inflamasyon

doku hasarını şiddetlendirebilir ve hastalığın ilerlemesine neden olur. Nöroinflamasyon öncelikle beyin yerleşik bağışıklık hücreleri olan mikroglialar tarafından düzenlenir. Bu hücreler beyin hücrelerinin %10-15'ini oluşturur ve dinlenme durumunda, hücre dışı ortamı homeostazis, doku hasarı veya enfeksiyona karşı kontrol altında tutarlar. Hücre dışı ortamda bir değişiklik algılandığında mikroglia aktive olur ve amip benzeri bir morfoloji geliştirir. Aktive edilmiş bir mikroglia, uyarılara bağlı olarak anti- veya pro-inflamatuar bir şekilde hareket edebilir. Anti-inflamatuar etkinleştirilmiş mikroglia, fagositoz yoluyla kalıntıları temizler ve IL-4 gibi anti-inflamatuar sitokinleri ve beyinden türetilmiş nörotrofik faktör (BDNF) gibi büyüme faktörlerini salgılar. Proinflamatuar olarak aktive edilmiş bir mikroglia, nörotoksik ROT ve inflammatuar sitokinleri serbest bırakarak potansiyel olarak zarar verici bir immün-vasküler yanıtı başlatır [65, 66]. Periferik inflammatuar biyobelirteçleri olan hastalarla yapılan bir meta-analizi sonuçları, artmış proinflamatuar sitokinlerin demans riski ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur [67]. (Şekil 2.5)



Şekil 2.5. Amiloid-β türlerine mikrogliyal yanıt [67]

NFκB

Son yıllarda yapılan çalışmalar TNF- α 'nın tümör nekroz faktörü reseptörü 1'e (TNFR1) bağlanıp hücre ölümünü indükleyerek inflamasyona neden olabileceğini göstermiştir. Bu, IκB kompleksini aktive edebilir ve ardından NFκB 'nin çekirdeğe translokasyonu ile sonuçlanan IκB kinazın fosforilasyonu ve ubiquitinasyonuna neden olur. Bununla birlikte, NFκB'nin nöronların hayatta kalması ve plastisitesindeki rolleri karmaşıktır. NFκB'nin pro-apoptotik veya anti-apoptotik bir faktör olarak hareket edip etmediği hücre tipine ve uyarana bağlıdır. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmada, NFκB' nin nöronlardaki proapoptotik rolünü bildirmiştir [68]. Buna karşılık, birçok çalışma NFκB' nin nöronal sağkalımda anti-apoptotik rolünü gösteren de birçok çalışma mevcuttur. [69, 70].

TNF- α

TNF- α , AH'deki en önemli pro-inflamatuar sitokinlerden biridir. Nöronlar üzerinde faydalı veya zararlı fonksiyonlara sahiptir. A β , transkripsiyon faktörü NFκB'nin aktivasyonu yoluyla mikrogial hücrelerden TNF- α üretimini doğrudan uyarır. TNF- α aynı zamanda AH gelişiminde APP' den A β 'nin üretilmesinde rol oynayan bir enzim olan β - ve γ -sekretazın ekspresyonunu da artırır [75]. Transgenik TNFR1'den yoksun farelerle yapılan bir çalışmada, bilişsel işlevlerde iyileşmenin yanı sıra A β agregasyonunda ve mikrogial aktivasyonda azalma gösterilmiştir [76]. Sitokinler esas olarak MSS'deki mikrogia ve astrositler tarafından üretilir ve MSS'nin gelişiminde çok önemli bir rol oynar. Sitokinler, nörodejeneratif hastalıklarda da çok sayıda inflammatuar yanıtta rol oynar. Alzheimer hastaları üzerinde yapılan birçok çalışma, TNF- α ve IL-6 dahil olmak üzere pro-inflamatuar sitokinlerin düzeylerinde artış olduğunu ortaya çıkarmıştır [71, 72]. Yapılan *in vivo* çalışmalar, yüksek sitokin seviyelerinin mikrogial aktivasyonla önemli ölçüde ilişkili olduğunu ve A β üretimi, nörodejenerasyon ve bilişsel faaliyetler üzerinde etkileri olduğunu ortaya koymuştur [73, 74].

IL-1

IL-1, AH gelişimi sırasında A β birikiminin erken aşamasında eksprese edilen majör bir proinflammatuar sitokindir. A β plaklarını çevreleyen mikrogial hücreler tarafından üretilir. IL-1 ailesi içinde, Alzheimer hastalarının beyin dokusunda IL-1 β üretimi güçlü bir şekilde

gözlenmektedir. IL-1 β , APP sentezini ve APP'nin glial hücrelerden salgılanmasını düzenler [77]. Ayrıca bu hastalarda yüksek IL-1 β seviyeleri, mitojenle aktiveleşen protein kinaz sinyalleşmesinin aktivasyonunu teşvik eder bu da tau proteininin hiperfosforilasyonuna yol açar [78, 79].

IL-6

IL-6, beyin dokusunun normal homeostazisi için önemlidir. IL-6'nın inhibisyonu mikrogial aktivasyonun azalmasına neden olurken, aşırı ekspresyonu kronik nöroinflamasyona yol açar [80]. IL-1 β 'ya benzer şekilde, IL-6 da mikrogial hücreler tarafından üretilir ve APP geninin mRNA seviyelerinin yükselmesine neden olur. IL-6'nın ayrıca CDK5 aktivatörü p53'ü artırarak tau proteininin hiperfosforilasyonunu indüklediği ve bunun AH patolojisinde önemli bir rol oynayan nörofibriler yumakların oluşumuyla sonuçlandığı bildirilmiştir [81].

COX-2

İnflamatuvar medyatörlerin AH patolojisi ile yakından ilişkili olduğu göz önüne alındığında, epidemiyolojik çalışmalar, COX' in ana inhibitörleri olan steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaçların (NSAID'ler), AH ilaç gelişimi için umut verici olabileceğini öne sürmektedir [89]. COX, prostaglandin sentezi sürecinde araşidonik asidin dönüştürülmesinden sorumlu olan bir enzimdir. 2 tip COX vardır: COX-1 ve COX-2. COX-1 birçok hücre tipinde eksprese edilir ve prostanoidlerin fizyolojik üretiminde yer alırken, COX-2 inflamasyon sırasında üretilir ve proinflamatuvar prostanoid senteziyle sonuçlanır. COX-1 ve COX2, AH patolojisinin çeşitli aşamalarında farklı şekilde eksprese edilir. COX-1 birincil olarak AH nin geç evresinde A β agregatlarında yer alan mikrogiallarda eksprese edilirken, COX-2 nöronlarda yüksek oranda eksprese edilir ve düşük A β birikimi ve tau dolaşması koşulları altında hücre döngüsü proteinlerinin ekspresyonu ile aynı yerde bulunur [89]. *In vivo* AH

modellerinde yapılan çalışmalarda, nöronlarda COX-2'nin aşırı ekspresyonun, A β plaklarının oluşumuna sebep olduğu ve serbest radikallerin üretimi yoluyla nöronal hücre ölümünün artmasına neden olduğu gösterilmiştir [89, 90]. Bu nedenle birçok bilim insanı, COX aracılı nöronal hücre ölümünü hedeflemek için NSİİ' leri kullanan ilaç geliştirmenin, AH'nin tedavisi için strateji olabileceğini öne sürmektedir.

TGF- β 1

Pleiotropik bir sitokin olan TGF- β , hücresel düzeyde nöroproteksiyon, immünregülasyon ve büyüme-farklılaşma-hayatta kalma modülasyonu ile ilişkilidir. Merkezi sinir sisteminde yapısal olarak ifade edilen üç izoformu TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 bulunur. En çok incelenen izoform olan TGF- β 1, beyin homeostazisinin, sinaptik plastisitenin, nöronal farklılaşmanın başlatılmasında ve sürdürülmesinde nörotrofik faktör olarak görev yapar[82]. Yapılan çalışmalarla sağlıklı yaşlı bireylerle karşılaştırıldığında, AH 'da plazma ve serumlarında periferik kandan salınan TGF- β 1'de azalma gösterilmiştir [83, 84]. Çeşitli raporlar, TGF- β 1 sinyallemedeki azalmanın AH hayvan modellerinde artan A β ve NFT birikimi ile yakından bağlantılı olduğunu ileri sürmektedir. Hafif bilişsel bozukluğu olan hastalarda, anti-inflamatuar TGF- β üretiminin azalması ve proinflamatuar TNF- α üretiminin artması nedeniyle AH geliştirme riskinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir [85]. Buna karşılık, AH beyin omirilik sıvılarında TGF- β 1 oranının arttığının gösterildiği ve AH bireylerin MSS' sinde TGF- β 1' in arttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur [86, 87]. İn vitro yapılan bir çalışmada TGF- β 1 seviyelerindeki azalmanın A β birikiminin ve nörodejenerasyonun artmasına katkıda bulunduğunu gösterilmiştir [87, 88].

2.1.4. AH' de oksidatif stresin rolü

Oksidatif stres, 'redoks devrelerinin bozulması ve makromoleküler hasarla ilişkili prooksidanlar ve antioksidanlardaki dengesizlik' olarak tanımlanır [91]. Bu da O₂•⁻ (süperoksit radikal anyonu), OH • (hidroksil radikali), H₂O₂ (hidrojen peroksit), • NO (nitrik oksit) ve ONOO⁻ (peroksinitrit) gibi reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin (RNT) yükselmesine neden olur. ROT, fizyolojik olarak mitokondriyal elektron taşıma zincirinden ve elektronları hücresel membranlar boyunca moleküler oksijene aktaran NADPH oksidazların (NOX'ler) aktivitesinden türetilir. ROT seviyesini, ROT üretiminin hücresel oranı ve SOD'lar, glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz gibi antioksidan enzimler tarafından yapılan detoksifikasyon belirler [92]. Hücre içi oksidatif stres, ROT üretimi ve birikimi ile hücresel antioksidan savunma kapasitesindeki dengesizlikten kaynaklanır ve lipid peroksidasyonu, DNA hasarı ve protein yıkımı ile sonuçlanır [93]. Oksidatif stres APP gen ekspresyonunu uyararak veya α - ve γ -sekretaz ekspresyonunu modüle ederek A β patolojisini artırabilir [94]. Proteinlerin, lipidlerin ve nükleik asitlerin oksidatif hasarı sonuçta hücresel dejenerasyon, fonksiyonel düşüş ve hücre ölümüyle sonuçlanabilir. Beyin,

sınırlı antioksidan kapasitesi, yüksek enerji talebi ve yüksek ÇDYA içeriği nedeniyle oksidatif hasarlara karşı özellikle hassastır. Artan oksidatif stresin, Alzheimer hastalığı patogenezinde katkıda bulunan bir faktör olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla serebral ROT seviyesinin azaltılması bu hastalıkların ilerlemesinin yavaşlatılmasına yardımcı olabilir [95, 96].

2.2. Yağ Asitleri

Yağ asitleri, hidrokarbon zincirli monokarboksilik organik asitlerdir. Doğadaki yağ asitleri lipojenezde çift karbon atomundan sentezlendiklerinden çoğunlukla çift sayıda karbon atomu içermektedirler. En sık rastlanılan yağ asitleri 14-22 karbon atomu içerenlerdir. Yağ asitlerinde yer alan karbonlar, -COOH karbonundan itibaren isimlendirilir. -COOH karbonuna komşu olan ilk karbon atomu α -karbon, ikincisi β -karbon, üçüncü ise γ -karbon olarak isimlendirilir. En sonda yer alan metil grubunun karbonu ise Ω karbon olarak isimlendirilir [97]. Yağ asitleri doymuş yağ asitleri ve doymamış yağ asitleri olmak üzere 2 ana gruba ayrılır.

2.2.1. Doymuş yağ asitleri

Hidrokarbon zincirleri çift bağ içermeyen, oda sıcaklığında katı halde bulunan ve dallanmamış olan yağ asitleridirler. Hidrokarbon.zincirindeki tüm karbonlar hidrojenle doyurulmuştur. Bağ yapmayan karbon atomu olmadığı için çift bağ oluşturamazlar. Karbon sayısı 10'a kadar olan doymuş yağ asitleri oda sıcaklığında sıvı ve uçucu özelliktedir. Bazı bitkisel kaynaklı yağlarla hayvansal yağların çoğu bu grupta yer almaktadır Çizelge 2.1. [98].

Çizelge 2.1. Bazı doymuş yağ asitleri

Yağ Asidinin Adı	Karbon Sayısı	Gıda Kaynakları
Formik asit	1	
Asetik Asit	2:0	
Propiyonik asit	3:0	
Bütirik asit	4:0	Süt, tereyağı
Valerik asit	5:0	
Kaproik asit	6:0	Süt, tereyağı
Kaprilik asit	8:0	Hindistan cevizi yağı
Kaprik asit	10:0	Hindistan cevizi yağı
Laurik asit	12:0	Hindistan cevizi yağı, tereyağı
Miristik asit	14:0	Tereyağı
Palmitik asit	16:0	Palm yağı
Stearik asit	18:0	

2.2.2. Doymamış yağ asitleri

Hidrokarbon zincirinde bir ya da daha fazla sayıda çift bağ içeren yağ asitleri doymamış yağ asitleri olarak isimlendirilir. Doymamış yağ asitleri oda sıcaklığında genellikle sıvı halde bulunurlar ve uçucu değildirler. Hayvansal yağlarda en çok bulunan doymamış yağ asitleri, palmitoleik asit, oleik asit, linoleik asit, araşidonik asittir. Linoleik asit ve linolenik asit insanlar için esansiyeldir, vücutta sentez edilmez, besinlerle dışarıdan alınmaları gereklidir. Araşidonik asit yarı esansiyeldir [97]. Bitkisel kaynaklı yağların çoğu bu gruba girmektedir Çizelge 2.2 [98].

Çizelge 2.2. Bazı doymamış yağ asitleri

Yağ Asidinin Adı	Karbon Sayısı	Gıda Kaynakları
Palmitoleik asit	16:1	Balık, sığır eti
Oleik asit	18:1	Zeytinyağı, kanola yağı
Vakseneik asit	18:1	Tereyağı
Linoleik asit	18:2	Bitkisel yağlar
Gamma linolenik asit	18:3	Bitkisel yağlar
Alfa linolenik asit	18:3	Balık yağı, kanola yağı
Araşidonik asit	20:4	Et
Eikozapentaenoik asit	20:5	Balık yağı, kanola yağı, ceviz yağı
Dokosatetraenoik asit	22:4	Bitkisel yağlar
Dokosapentaenoik asit	22:5	Balık yağı, kanola yağı, ceviz yağı
Dokosaheksaenoik asit	22:6	Balık yağı, kanola yağı, ceviz yağı
Nervonik asit	24:1	

Tekli doymamış yağ asitleri (TDYA)

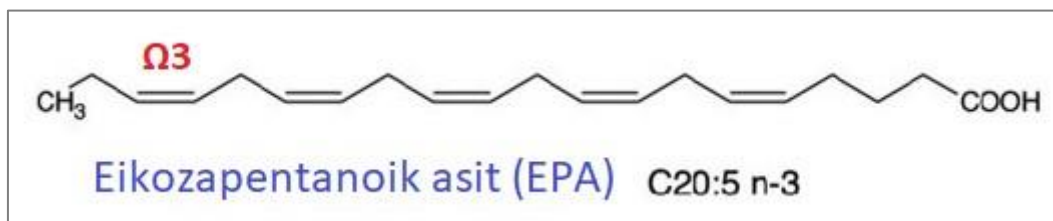
Doymuş yağ asitleri gibi insan vücudu tarafından sentezlenebilen TDYA yapılarında bir çift bağ içeren yağ asitleridir. Doğada tanımlanmış olan 100'e yakın tekli doymamış yağ asidi bulunur. TDYA'nın LDL kolesterol üzerindeki etkilerinin nötral olduğu bilinirken, yüksek yoğunluklu lipoproteini artırıcı etkileri vardır. Buna rağmen tüketilen TDYA miktarının toplam enerjinin %20'sini geçmemesi tavsiye edilmektedir [99]. En çok tüketilen TDYA'lar oleik asit, vaksenik asit ve palmitoleik asittir. TDYA'nın bitkisel gıda kaynakları zeytin, kanola, yer fıstığı, ayçiçeği, aspir yağı, avokado, fıstık ezmesi ve fındıktır. Ayrıca tavuk, domuz, sığır eti gibi hayvansal kaynaklardan da elde edilebilir [100].

Çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA)

Sinir membranının yaklaşık %50'si, miyelin kılıfının da %70'i çoklu doymamış yağ asitlerinden oluşmaktadır. En önemli çoklu doymamış yağ asitleri $\Omega 3$ ve $\Omega 6$ grubu yağ asitleridir. $\Omega 3$ yağ asitleri nöronal fosfolipidlerin ve retina pigment epitellerinin yapısına katılır. Asetil-KoA formunda Krebs döngüsünde bir substrat haline gelirler, çoğunlukla hücre zarı fosfolipidlerinin sn -2 pozisyonunda bulunurlar, hücre membranlarının fizyokimyasal özelliklerini değiştirip membran geçirgenliğini etkilerler [101].

Eikozapentaenoik Asit (EPA)

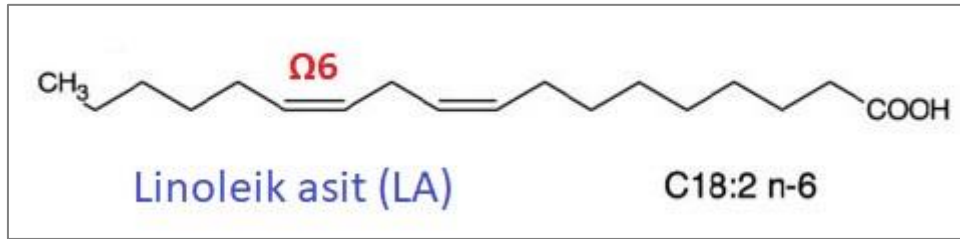
İnsan beslenmesinde önemli olan $\Omega 3$ grubu yağ asitleri şunlardır: alfa-linolenik asit (18:3, ALA), eikozapentaenoik asit (20:5, EPA) ve dokosaheksaenoik asit (22:6, DHA). Balık yağında bulunan ve antihiperlipidemik, antihiperglisemik, antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklere sahip çoklu doymamış bir yağ asitidir. İlk çift bağı, metil grubuna en yakın 3. karbondadır. Bu nedenle omega-3 adı verilir. (Şekil 2.6.)



Şekil 2.6. Eikozapentanoik asit

Linoleik Asit (LA)

Linoleik asit çoklu doymamış bir $\Omega 6$ grubu yağ asididir. Suda çözünürlüğü çok düşük ancak birçok organik çözücünde çözünebilen bir yağ asididir. Doğada serbest yağ asidi yerine trigliserit olarak bulunur. İnsanların diyet yoluyla alması gereken üç temel yağ asidinden biridir. $\Omega 6$ yağ asitleri kaynağını linoleik asitten almaktadır. İlk çift bağı, metil grubuna en yakın 6. karbondadır. Bu nedenle omega-6 adı verilir [201]. (Şekil 2.7.)



Şekil 2.7. Linoleik asit

2.2.3. ÇDYA' nin inflamasyon üzerine etkisi ve nörodejeneratif hastalıklardaki rolü

İnflamasyon, nörodejeneratif bozukluklarda ve bilişsel gerilemede rol oynar. İnflamasyon ve oksidatif stres arasındaki ilişki iki yönlüdür: oksidatif stres inflamasyonu ve inflamasyon da oksidatif stresi tetikler. Bu nedenle oksidatif stresi azaltıcı etki gösteren ajanlar aynı zamanda antiinflamatuvar olarak da değerlendirilebilir. İnflamasyonun çözülmesi daha önceleri lökotrienler ve prostaglandinler gibi lipid medyatörlerini de içeren proinflamatuvar sinyallerin geri çekilmesi nedeniyle oluşan pasif bir süreç olarak görülse de son zamanlarda, inflamasyonun çözülmesinin, ÇDYA'lar da dahil olmak üzere farklı bir dizi kimyasal aracı ile aktif bir süreç olduğu tespit edilmiştir. Resolvinler ve koruyucular gibi moleküller günümüzde $\Omega 3$ öncüllerinden üretilen ve model sistemlerde inflamasyonun zamanında çözülmesini yönetebilen moleküller olarak tanımlanmaktadır [102]. Sağlıklı beslenmede diyet önerisi, metabolik rahatsızlık riskini azaltmak için alınan doymuş yağ asitlerinin azaltılmasını ve bunların ÇDYA $\Omega 3$ ve $\Omega 6$ ile değiştirilmesini teşvik eder. Kronik hastalıkları önlemek için diyetle $\Omega 6/\Omega 3$ oranının önemi, linolenik asitin ve daha uzun zincirli $\Omega 3$ ÇDYA 'ların antiinflamatuvar işlevleriyle bağlantılıdır. İn vitro çalışmalar, hayvan kanser modelleri ve epidemiyolojik çalışmalar, bu iki ÇDYA grubunun hücre büyümesi, proliferasyonu ve neoplastik lezyonların ilerlemesi üzerinde farklı etkileri olduğunu göstermektedir. ÇDYA vücutta birçok temel fizyolojik işlevleri yerine getirir. Asetil-KoA

formunda Krebs döngüsünde bir substrat haline gelirler, çoğunlukla hücre zarı fosfolipidlerinin sn -2 pozisyonunda bulunurlar, hücre membranlarının fizyokimyasal özelliklerini değiştirip membran geçirgenliğini etkilerler [101]. Tek iyon kanallarında beş olası ÇDYA bağlanma bölgesi gösterilmiştir. ÇDYA, özellikle nöronlarda ve kas hücrelerinde potasyum, sodyum ve kalsiyum kanallarının işleyişini etkiler [103, 104].

Nooyens ve ark, balık ve farklı yağ alımları arasındaki ilişkinin yanı sıra bilişsel işlevlerde 5 yıllık bir değişiklik arasındaki ilişkiyi test etmek için Doetinchem Kohort Çalışmasına katılan 2612 bireyde bilişsel işlev üzerinde çalışmıştır. Çalışma sonucu ÇDYA'lerinden Ω -

3 daha yüksek alımını, genel bilişsel işlev ve hafızada daha yavaş bir düşüşle ilişkilendirmiştir [105]. 2015 yılında Wu ve arkadaşları Ω 3 yağ asitleri alımı ile demans ve Alzheimer hastalığının (AH) görülme sıklığı arasındaki ilişkiyi incelemek için ileriye dönük kohort çalışmalarının bir meta-analizini gerçekleştirmiş, araştırmacılar, daha yüksek balık tüketiminin AH riskinin azalmasıyla ilişkili olduğu sonucunu ortaya koymuşlardır [106]. AlAmmar ve arkadaşları, Ω 3 takviyesinin MS hastalarında proinflamatuvar sitokin ve serbest radikal seviyelerinin azalmasına ve yaşam kalitesinin iyileşmesine katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir [107]. Yapılan çalışmalar Ω 3/ Ω 6 oranının 1/1 olması gerektiğini öne sürmektedir, ancak sanayileşmiş ülkelerde günlük beslenmede, fast food yiyeceklerde ve özellikle de Ω 6 'nın yüksek miktarları nedeniyle bu oran 1:20 civarındadır. Dengesiz bir Ω 3/ Ω 6 oranı, beynin sito mimarisi ve işleyişini, hücresel bütünlüğünü ve bağışıklık hücrelerinin fizyolojik durumunu da tehlikeye atar [108].

Ω 6 açısından yüksek bir diyet, çeşitli hastalıkların patogenezi teşvik ettiğinden sağlık üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir. Buna karşılık, Ω 3 yağ asitlerinin fosfolipit kompozisyonunu değiştirerek nöronal iletimi etkileyebildiği ve merkezi sinir sistemi hücresel membranlarının akışkanlığına olumlu katkıda bulunabileceğini desteklemektedir [109]. Bu nedenle, ÇDYA durumu ile nörotransmisyon ve davranış gibi beyin fonksiyonları arasındaki güçlü ilişki vurgulanırken, Ω 3 yağ asitlerinden fakir bir diyetin sağlığa zararlı olduğu kabul edilir [110]. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar Ω 3 yağ asitlerinin hücre ölümlerini ve nöronal inflamasyonu azalttığı bunu da eikozanoid sentezine katılarak proinflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyonlarını azaltarak yaptığını ortaya koymaktadır [111, 112]. Ω 3 yağ asitlerinin nöroinflamasyondan kaynaklanan kronik nörolojik hastalıklarda ümit verici bir ajan olabileceği bildirilmiştir [107]. Literatürdeki çalışmalarda

daha ayrıntılı bir şekilde $\Omega 3$ yağ asitlerinin antiinflamatuvar etkisi üzerinde durulsa da ESPEN'in kılavuz önerisi, $\Omega 6$ yağ asitlerinin diyetteki total yağ asitlerine orana dikkat çekmiştir. Diyetteki $\Omega 6/\Omega 3$ oranı ile ilgili bilinmezliğe işaret edilmiştir. Literatürde ideal $\Omega 6/\Omega 3$ oranının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modeli hücresi üzerindeki etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalar LA içeriği yüksek tohum yağlarının tüketiminin, düşük dereceli inflamasyona, oksidatif strese, endotel disfonksiyonuna ve ateroskleroza sebep olduğunu ortaya koymaktadır [113]. Ayrıca, diyetteki LA' nın aorttaki COX-2 ekspresyonunu önemli ölçüde arttırarak araşidonik asidi (AA) proinflamatuvar eikozanoidlere dönüştürdüğü bildirilmiştir. Ayrıca AA'dan bağımsız bir inflamasyon yolu daha vardır. LA' dan oluşan okside linoleik asit metabolitleri (OXLAM), NF κ B' yi aktive ederek hepsi ateroskleroz oluşumunda çok önemli olan proinflamatuvar sitokinleri, endotelial adezyon moleküllerini ve kemokinleri arttırır [114, 115].

LA aynı zamanda endotel hücrelerinde koroner kalp hastalığı (KKH) riskini artırabilecek inflamatuvar bir ortamı da indükler. Diyetteki LA oranının düşürülmesi OXLAM'nin azaltılmasına dolayısıyla inflamasyonun azaltılmasına yardımcı olacaktır [116].

Bir çalışmada, 60 yaşın üzerindeki kişilerde haftalık düzenli alınan $\Omega 3$ içeren balık yağlarının CRP ve IL6 salınımını azaltarak inflamasyonu engellediğini ve insülin duyarlılığını iyileştirdiğini ortaya konmuştur [117]. $\Omega 6/ \Omega 3$ oranları ile yapılan bir çalışmada, metabolik sendromu olan erkeklerin, oral yağ tolerans testine verdikleri tepkiler incelenmiş, hastalar yüksek $\Omega 6/ \Omega 3$ (18/1) ve düşük $\Omega 6/ \Omega 3$ oranına (3/1) sahip iki gruba alınmıştır. $\Omega 6/ \Omega 3$ oranının azaltılmasının, proinflamatuvar sitokin IL-6' nın 6. ve 8. saatlerde daha düşük salınmasına neden olduğu bulunmuştur [118]. Başka bir çalışma ise yalnızca 4 gün boyunca LA'nın izokalorik olarak ALA ile değiştirilmesinin, çözünür IL-6 reseptöründe azalmaya neden olduğunu göstermektedir [119]. Tüm bu çalışmalar, $\Omega 6$ ' nın $\Omega 3$ ile değiştirilmesinin inflamasyonu azalttığını ortaya koymaktadır. Yapılan bir hayvan çalışmasında farelerin hipokampusündeki $\Omega 6/\Omega 3$ değişim oranları incelenmiştir. Yağ asitlerinin beyinin belirli bir bölgesi üzerine etkisi araştırılmış olup, $\Omega 3$ yağ asitlerinin olumlu etkisi ortaya konmuştur [120].

Glioblastoma hücre hatları ile yapılan bir çalışmada $\Omega 3$ ilavesinin, apoptoz ve otofajik aktiviteyi gösteren hücrelerde önemli bir artışla sonuçlandığını bunun da azalan fosforile Akt seviyelerinin ve azalan mTOR aktivitesinin etkisiyle olduğunu ortaya koymuştur

[121]. Ayrıca, $\Omega 3$ yağ asitlerini endojen olarak sentezleme yeteneğine sahip olan yağ -1 transgenik fare modeli üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalar, vahşi tip ile karşılaştırıldığında fare glioma hücrelerinin implantasyonunu takiben tümör hacminde önemli bir küçülme sağladığını göstermiştir [121]. $\Omega 3$ DHA ve EPA' nın, insan beyin kanseri olan nöroblastoma LA-N-1 hücreleri üzerinde zamana ve konsantrasyona bağlı anti-proliferatif etkiler sergilediği gösterilmiştir. Bu etkileri, G0/G1 hücre döngüsünü durdurarak ve apoptozu indükleyerek yaptığı bildirilmiştir [122].

Şu anda, herhangi bir nörodejeneratif hastalık türü için iyileştirici tedavi mevcut değildir ve bu alanda umut verici pek çok yeniliğe rağmen tedavi stratejileri, nöron kaybını önlemede başarısız olmaktadır. Çok sayıda çalışma, ÇDYA'lerinin anti-inflamatuar etkilerini ve bunların Parkinson hastalığı, Demans, Alzheimer hastalığı, Multipl Skleroz, Huntington hastalığı ve Amyotrofik Lateral Skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklarda terapötik ajanlar olarak potansiyel kullanımlarını vurgulamıştır [27].

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız *in vitro* koşullarda yapılmış deneysel bir çalışma olup, deneyler Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü ARGE Merkez Başkanlığı Laboratuvarları ve Gazi Üniversitesi Eczacılık Biyokimya AD. Laboratuvarları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Cihazlar

- +4 °C Buzdolabı (Nüve, Türkiye)
- -20 °C Buzdolabı (Electrolux MF280, İsveç)
- -80 °C Buzdolabı (Sanyo, Japonya)
- İnvert Mikroskop (Nikon F-12, Japonya)
- Biyogüvenlik Kabini (Seviye II) (Nüve MN120, Türkiye)
- Su Banyosu (Nüve, Türkiye)
- Santrifüj (Hermle, Almanya)
- CO₂ 'li inkübatör (Sanyo MCO-18AIC, Japonya)
- Vorteks (Nüve NM10, Türkiye)
- Otomatik Pipetler (Eppendorf, Almanya)
- BD Accuri C6 (BD Biosciences, Amerika)
- Hassas Terazî (Nüve, Türkiye)
- Eliza Plak Okuyucu (Biotek Synergy HT, Amerika)
- RT-PCR Cihazı (ABI 7500, Amerika)
- Thermal Cycler (BioRad T100, Amerika) □ Santrifüj (Sigma 2-16 KL, Almanya)
- Serolojik Pipet Tabancası (Biologix, Çin)

3.2. Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeleri

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Capricorn Scientific, Almanya)
- Fetal bovine serum (FBS) (Capricorn Scientific, FBS-HI11B, Almanya)
- L-Glutamine (Capricorn Scientific, GLN-B, Almanya)
- Amiloid β_{1-42} (Cayman, Amerika)
- Penicilin –Streptomycine (Capricorn Scientific, PS-B, Almanya)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma, Almanya)

- Eikozapentaenoik Asit (EPA) (Cayman, Amerika)
- Linoleik Asit (LA) (Sigma, Amerika)
- Tripan mavi solüsyonu (Sigma, Almanya)
- Tripsin (Capricorn Scientific, Almanya)
- Dimetilsülfoksit (DMSO) (Applichem)
- Hücre sayım lamı (Neubauer Haemocytometry)
- 6 ve 12 kuyulu well plate (Costar, Amerika)
- 96 kuyulu well plate (Costar, Amerika)
- 75 cm² hücre kültür kapları (Thermo Scientific, Amerika)
- Dondurma tüpleri (Croyogenic Vial Corning)
- 15 ml santrifüj tüpü kapaklı (Costar, Amerika)
- 2 ml Eppendorf tüp kapaklı (Costar, Amerika)
- Serolojik pipetler (5ml), tek kullanımlık (Greiner Cellstar, Amerika)
- Serolojik pipetler (10ml), tek kullanımlık (Greiner Cellstar, Amerika)
- Pipet ucu 1-200 µL (Ependorf, Almanya)
- Pipet ucu 100-1000 µL (Ependorf, Almanya)
- Şırınga filtreleri (0.22 µm) (Sartorius Minisart)
- Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (Sigma Almanya)
- RNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya)
- cDNA sentez kiti (Transcriptor First Strand Cdna Synthesis Kit, Roche)
- Sybr Green Master Mix (TONBO Sybrgreen PCR mix, Amerika)
- Primerler
- CongoRed boyama kiti (Atom Scientific, UK)
- BD Pharmingen™ FITC and PE Annexin V Apoptosis Detection Kits(Cat. Nos. 556570)
- ROS Detection Kit (THORVACS Biyoteknoloji, Kat#; ROS-100T)
- MMP Analiz Kit (THORVACS Biyoteknoloji, Kat#; MMPAK-100T)
- Cell Cycle Kit (THORVACS Biyoteknoloji, Kat#; CCK-100T)
- Human PTGS2/COX-2(Prostaglandin Endoperoxide Synthase 2) ELISA Kit_96T (Elabscience, Amerika)
- Human TNF-α(Tumor Necrosis Factor Alpha) ELISA Kit_20 Plate (Biolegends, Amerika)
- Human IL-10(Interleukin 10)ELISA Kit_96T (Elabscience, Amerika)

- TGF- β 1(Transforming Growth Factor Beta 1) ELISA Kit_96T (Elabscience, Amerika) □ Human IL-6(Interleukin 6) ELISA Kit_20plates (Biolegends, Amerika)

3.3. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücre Hattı Eldesi ve Çoğaltılması

Çalışmamızda American Type Culture Collection (ATCC) standart Human SH-SY5Y Nöroblastoma hücre hattı kullanıldı. SHSY-5Y hücre hattına ait künye bilgileri Çizelge 3.1. verilmiştir. Bu hücre hattı 1970 yılında 4 yaşındaki bir hastanın kemik iliğine metastaz yapmış hücrelerinden elde edilmiş bir alt soydur [123]. SH-SY5Y hücre hattı dopaminerjik nöronlara farklılaşabilme özelliklerinden dolayı nöronal hücre modeli olarak kullanılan insan hücre hattıdır. ATCC' den temin edilmiştir. SH-SY5Y hücre hattı

Dulbecco's Modified Eagle Medium (Capricorn Scientific, Germany) besiyeri içerisinde %10 fetal bovine serum (FBS) (Capricorn Scientific, FBS-HI11B, Germany), %1 Lglutamin (Capricorn Scientific, GLN-B, Germany) ve %1 penisilin-streptomisin

(Capricorn Scientific, PS-B, Germany) eklenerek çoğaltıldı. Hücreler hücre kültür kaplarında, %5 CO₂, %95 bağıl nem içeren 37°C olan inkübatör içinde tutularak 3 günde bir besiyeri değiştirilerek üretildi. Hücre kültür kaplarını incelemek için inverted mikroskop, stokların depolanması için -196°C sıvı azot tankı kullanıldı. Her çalışmada 5. Pasaj olarak yedeklenip dondurulmuş hücreler kullanıldı (Resim 3.1)

Çizelge 3.1. SH-SY5Y hücre hattına ait künye bilgileri

ATTC®kodu	CRL-2266™
Adı	SHSY-5Y
Büyüme özelliği	Adherent (Yapışarak Çoğalır)
Organizma	Human (İnsan)
Morfolojisi	Epitelyal
Doku	Kemik iliği
Hücre tipi	Epitelyal



Resim 3.1. SHSY-5Y hücre hattı görüntüsü

3.4. Hücrelerin Pasajlanması

%80-90 doluluk seviyesine ulaşan hücrelerin içerisinde bulunduğu besiyeri pipet ile çekilerek uzaklaştırıldı. Flasklara %0,05'lik tripsinden 3-5 ml eklenerek, 37°C'lik %5'lik CO₂'li etüvde 2-3 dakika bekletildi ve zeminden ayrılması sağlandı. Yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine FBS ilave ederek tripsinin etkisi durduruldu ve 15 ml' lik santrifüj tüpüne toplanan hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. 6-7 ml besiyeri ile resüspanse edilen hücreler yeni kültür kaplarına transfer edilerek

37°C'lik %5 CO₂'li inkübatörde bekletildi. Hücreler inverted mikroskop ile takip edilerek, 3 günde bir besiyerleri taze besiyerleri ile değiştirildi. %70-80 doluluk seviyesine ulaşıldığında pasajlama işlemi tekrarlandı.

3.5. Hücre Sayısının Belirlenmesi ve Canlılık Ölçümü

Çalışmamızın her aşamasında canlı hücreler sayılarak, kullanılacak hücre miktarı belirlendi. Hücre sayımı için tripan mavisi kullanıldı. Ölü hücrelerin membran bütünlüğü bozulduğu için sitoplazmaları maviye boyanırken canlı hücreler boyayı hücre içine almadığından boyanmadı. 10 µL tripan mavisi ve 10 µL hücre süspansiyonunu karıştırıldı ve Thoma lamının her iki bölmesine 10 µL olacak şekilde eklendi. Inverted mikroskop kullanılarak 16 eşit kareden oluşan Thoma lamının 4 bölmesinde bulunan hücreler sayılarak ortalaması alındı.

$$\text{Canlı Hücre Sayısı Mililitrede} = \frac{\text{Ortalama Hücre Sayısı} \times (10^4)}{\text{Dilüsyon Oranı}} \quad (3.1)$$

9

formülü kullanılarak hesaplandı.

3.6. Hücrelerin Dondurulması

Hücre dondurulması işlemi DMSO kullanılarak yapıldı. DMSO kullanımı hücre için toksik olmakla birlikte, yeterli miktarda kullanıldığında hücreleri çok hızlı ya da çok yavaş şekilde dondurulurken oluşabilecek ani ısı değişimlerine karşı korumaktadır. Tripsinizasyon ile kaldırılan hücreler santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Elde edilen pellet, %90 FBS ve %10 DMSO içeren dondurma solüsyonunda, 2ml' lik -196 °C' ye dayanıklı hücre dondurma tüplerine alınarak saklandı.

3.7. Amiloid β_{1-42} ' nin Hazırlanması

Amiloid β_{1-42} (Item no:20574, Cayman) 500 μg , 27,7 ml DMSO ile kit protokolüne uygun olarak sulandırılarak 4 mM' lık stok solüsyon elde edildi. Elde ettiğimiz stok solüsyon DMEM besiyeri içerisinde seri dilüsyon yapılarak 2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM , 400 μM lık dozlar halinde hücreler üzerine 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulandı.

Amiloid β_{1-42} nin yarı maksimum inhibitör konsantrasyon değeri(IC50) 100 Mm olarak hesaplanmıştır.

3.8. MTT Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

3-[4,5-Dimetiltiyazol-2-il]-2,5-Difeniltetrazolium Bromid; Tiazol Blue (MTT) testi hücre proliferasyonu ve sitotoksitesinin kantitasyonunu belirlemede kullanılır. Metabolik aktivitesi olan hücreler tetrazolium tuzunu renkli formazanlara hücre sitozolündeki NADPH bağımlı oksidoredüktaz enzimleri ile indirgediği için MTT testiyle sadece canlı hücreler belirlenebilir [124]. Canlı hücrelerin mitokondrileri MTT' yi mor renkli çözünmez formazana dönüştürür. Oluşan çözünmez formazan izopropanol veya DMSO ile çözünerek meydana gelen renk değişimi spektrofotometrik olarak $A_{570\text{ nm}}-A_{630\text{ nm}}$ de ölçülür [1, 125]. Çalışmaya tripsinizasyon yöntemi ile kaldırılan hücreler sayılarak başlandı. 96 kuyucuklu

mikroplakanın her bir kuyucuğuna 100 µl içerisinde 1×10^4 olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi ve 24 saat boyunca 37°C'lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. 24. saatin sonunda besiyeri içerisinde dilüe edilmiş olan Amiloid β_{1-42} dozları uygulandı (Şekil 3.2). Plakalar 24, 48 ve 72 saat boyunca 37°C'lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Kontrol grubu olarak kullandığımız kuyucuklara sadece %10 FBS + medya içeren hücreli DMEM besiyeri, vehicle kontrol olarak kullandığımız kuyucuğa ise DMSO içeren besiyeri uygulanarak hücre canlılıkları üzerindeki etkisi hesaplandı. 24, 48 ve 72 saat Amiloid β_{1-42} ile inkübasyon sonrası, MTT solüsyonu (Sigma, USA) besiyeri içerisinde 5 mg/ml olacak şekilde çözüldü. Tüm kuyucuklara 20 µl olacak şekilde dağıtıldı ve 3-4 saat boyunca 37°C'lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda tüm kuyucukların içerikleri çok kanallı pipetle uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 100 µl isopropil alkol eklenerek reaksiyon sonucu oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı. Hücreler bir saat boyunca karanlıkta ve oda ısısında inkübasyona bırakıldı. İşlem sonunda plaka 570 nm dalga boyunda (Biotek Synergy HTX, USA) spektrofotometrik olarak plaka okuyucuda okutuldu.

MTT testi, Amiloid β_{1-42} nin hücre canlılığı üzerindeki etkisinin belirlenmesinin yanı sıra farklı ÇDYA dozları uygulamalarının A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki etkisinin belirlenmesi ve uygun ÇDYA oranlarının etkisinin belirlenmesinde de uygulanmıştır.

3.9. Yağ Asitlerinin Hazırlanması

3.9.1. Eikozapentaenoik asit (EPA) hazırlanması

EPA (Item no:90110, Cayman) 200 µl, kit protokolüne uygun olarak DMEM ile dilüe edilerek 4 mM' lık stok solüsyon elde edildi. Elde ettiğimiz stok solüsyon DMEM besiyeri içerisinde seri dilüsyon yapılarak 5 µM, 10µM, 25 µM, 40µM, 50µM' lık dozlar halinde hücre üzerine 48 ve 72 saat boyunca uygulandı.

3.9.2. Linoleik asit (LA) hazırlanması

LA (PC1003367601, Sigma) 3,241 M olan mevcut stok kit protokolüne uygun olarak DMEM ile dilüe edilerek 4 mM' lık stok solüsyon elde edildi. Elde ettiğimiz stok solüsyon

DMEM besiyeri içerisinde seri dilüsyon yapılarak 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 40 μ M, 50 μ M'lık dozlar halinde hücre üzerine 48 ve 72 saat boyunca uygulandı.

3.9.3. Yağ asitlerinin oranlarının belirlenmesi

Ω 3 ve Ω 6 yağ asitleri uygulamasından sonra MTT ve Annexin V verilerine bakılarak çalışma dozu olarak 50 μ M olarak belirlendi. Ω 3/ Ω 6 oranları; 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16 olarak belirlenerek çalışılan dozlar stok solüsyonların DMEM besi yeri ile dilüe edilmesinden sonra kültür ortamlarına eklendi.

3.10. A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y Hücrelerinde Oluşturulan *İn Vitro* AH Modelinin Tespit Edilmesi

A β ₁₋₄₂ uygulamasının ardından hücrelerde Alzheimer modelinin oluştuğunun tespit edilmesi amacıyla Kongo red boyaması ve AChE aktivitesi tayini çalışılmıştır.

3.10.1. Kongo red boyaması

Kongo red boyası, A β ₁₋₄₂ proteinin tayini için kullanılan yöntemlerden biridir. *İn vitro* AH modelinin oluştuğunu göstermek için hücreler lam üzerinde kültüre edildi. 24 saat A β ₁₋₄₂ uygulaması sonucunda lamalar inkübatörden alınarak mediumları uzaklaştırıldı. PBS ile yıkanan lamalar absolüt etanol ile fiks edildi. 5-6 dakika oda ısısında inkübe edilen hücrelere Kongo red boyası eklendi. 5-6 dakika oda ısısında inkübasyon sonrasında potasyum hidroksit eklenen hücreler 15 saniye sonra yıkandı. Üzerlerine Haemalum mayer çözeltisi eklenen hücreler 5-6 dakika oda ısısında bekletildikten sonra yıkanarak kurumaya bırakıldı. İnverted mikroskopta görüntüleri alındı.

3.10.2. Asetilkolinesteraz (AChE) protein tayini

AChE miktarı ölçümü (Elabscience Biotechnology Inc. Texas, USA) sandviç ELİSA yöntemine dayanmaktadır. Kuyucuklar AChE antikorlarıyla kaplıdır. Antikora örnekler içindeki AChE bağlanır. İmmün kompleks oluşumu için streptavidin-HRP ilave edilerek antijen-antikor kompleksi kuyucuklara tutunur. Kromojen ilavesi ile oluşan renkli kompleksin absorbanı 450 nm' de ölçülür.

Örneklerin hazırlanması

Hücre kültür flaskalarında yapışarak üreyen SH-SY5Y hücreleri PBS ile hafifçe yıkandı ve tripsinizasyon ile santrifüj tüpüne toplandı. $1000\times g$ 'de 5 dakika santrifüjlenerek PBS ile 3 kez yıkandı. Her 1×10^6 hücre için 150-250 μL önceden soğutulmuş PBS (0.01M, pH=7.4) eklenerek hücrelerin yeniden süspansiyon haline gelmesini sağlandı. Süspansiyon 5 saniye ultrasonik hücre parçalayıcı ile sonikasyona tabi tutuldu. $2 - 8^{\circ}C$ 'de $1500\times g$ 'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Deneyi gerçekleştirmek için süpernatant alikotlanarak $-20^{\circ}C$ de saklandı.

Standartların hazırlanması

Referans AChE Standartı, 1 dakika boyunca $10.000 \times g$ 'de santrifüj edildikten sonra 1 ml referans standart diluent solüsyonu eklendi. Tamamen çözülmesi için 10 dakika bekletildi iyice pipetaj yapıldı. Böylelikle 1000 IU/ml' lik stok standart çalışma çözeltisi elde edildi. 1000 IU/ml stok standart çözeltisi ve standart diluent solüsyonu kullanılarak seri seyreltme yöntemiyle 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63 ve 0 IU/ml konsantrasyonlarında gradyanlar hazırlandı. Son tüp boş olarak kabul edildi.

Deney protokolü

Kuyucuklara çift tekrar olarak 100 μl standartlar ve örnekler eklendi. Kuyucuklar plate örtücü ile kaplanıp $37^{\circ}C$ 'de 90 dakika boyunca inkübe edildi.

Her bir kuyucuğun içeriği dikkatlice aspire edilerek tüm kuyucuklara 100 μL Biotinylated Detection Ab eklendi. Kapatılan plaka yavaşça karıştırıldı. $37^{\circ}C$ 'de 1 saat inkübe edildi.

Her bir kuyucuğun içeriği dikkatlice aspire edilerek, tüm kuyucuklar yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı.

Her kuyucuğa 100 μL HRP konjugat çalışma solüsyonu eklendi. Plate örtücü ile kaplandı, 30 dakika boyunca $37^{\circ}C$ 'de inkübe edildi, ardından yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.

Her bir kuyucuğa 90 μL substrat reaktifi eklenerek yeni bir plaka örtücü ile kapatıldı. $37^{\circ}C$ 'de yaklaşık 15 dakika inkübe edildi.

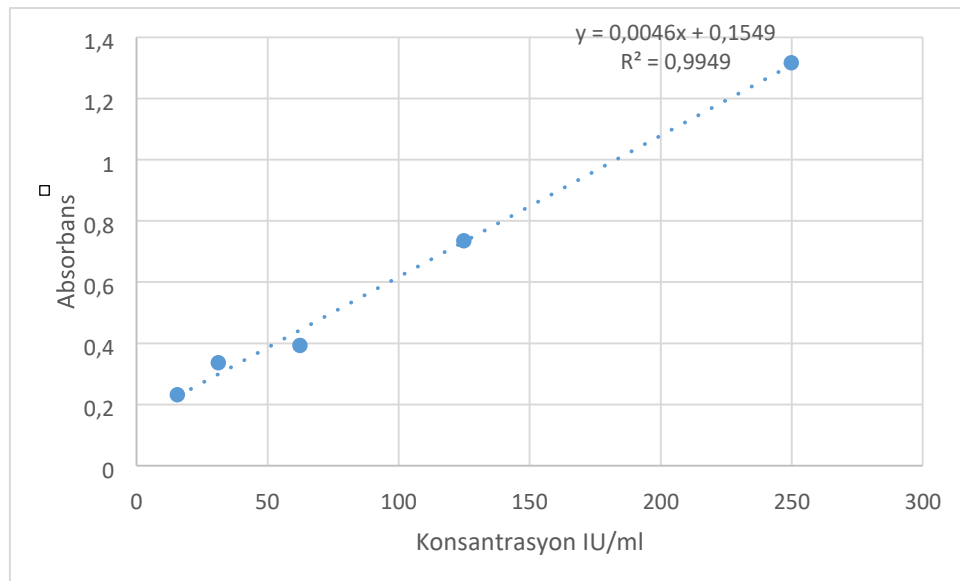
Her kuyucuğa 50 µL Durdurma Solüsyonu eklendi ve optik dansitesi (OD değeri) plaka okuyucuda 450 nm' de ölçüldü.

Standart çözeltilerinin konsantrasyon ve absorbans değerleri çizelge 3.2. de kalibrasyon grafiği Şekil 3.1. de verilmiştir.

Çizelge 3.2. AChE standart çözeltilerinin konsantrasyon ve absorbans değerleri

Konsantrasyon (IU/ml)	Absorbans
250	1,316
125	0,734
62,5	0,393
31,25	0,336
15,63	0,232

*Kör değeri çıkarılarak elde edilen sonuçlar



Şekil 3.1. AChE kalibrasyon grafiği

3.11. RT-PCR İçin Hücrelerin Hazırlanması

MTT testi ile IC₅₀ oranı belirlenen Amiloid β₁₋₄₂ uygun dozu 25 cm² hücre kültür kaplarında üretilen hücre hatlarının üzerine 24 saat uygulandı. 48 saat ÇDYA maruziyeti sonunda hücreler tripsinizasyon yöntemi ile hücre kültür kaplarından alınarak, 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre pelleti 1ml PBS içerisinde RNA izolasyonu için hazırlandı.

3.12. RNA İzolasyonu, Ölçümü, cDNA Sentezi ve RT- PCR Analizi

3.12.1. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu için (Qiagen, Almanya) kiti kullanılarak, total mRNA izolasyonu gerçekleştirildi.

3.12.2. Total mRNA izolasyonu kit protokolü

-20 °C'de saklanan örnekler oda ısısında çözündükten sonra 300g'de 5 dakika santrifüj edildi. Total RNA izolasyonu aşağıdaki basamaklar takip edilerek gerçekleştirildi.

1. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 1,5 ml'lik mikrotüp içerisindeki hücre pelletine 300 µL REL lizat ilave edildi.
2. Örneklerin üzerine 590 µL RNase-Free ddH₂O ve 10 µL Proteinaz K eklenip çalkalamalı su banyosunda 56 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
3. 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenen örneklerin süpernatantı yeni bir 1,5 ml' lik mikrotübe alındı.
4. Süpernatantın üzerine hacminin yarısı kadar etanol eklendi. Tüm içerik toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş R kolona aktarıldı. 10 000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra, toplama tüpü içindeki sıvı ile birlikte atıldı.
5. Yeni bir toplama tüpüne aktarılan R kolon üzerine 500 µL de proteinize RRPB eklenerek 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
6. R kolonuna hazırlanan DNaseI çalışma solüsyonundan 80 µl eklenerek oda ısısında 10 dakika bekletildi.
7. R kolon üzerine 500 µl deproteinize solüsyon RRPB ilave edilerek 10000 rpm' de 1 dakika santrifüj yapıldı.
8. R kolonuna 500 µl RWB yıkama solüsyonu konularak oda ısısında 2 dakika bekletildi.

12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilen R kolon yeni bir toplama tüpüne alındı.

9. R kolonuna 500 µl RWB yıkama solüsyonu eklenerek odaaısısında 2 dakika bekletildi.

12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek yeni bir toplama tüpüne alındı.

10. 2 dakika boyunca 12000 rpm' de santrifüjden sonra toplama tüpü atıldı. R kolon temiz bir zeminde kuruması için bekletildi.
11. R kolonunu yeni bir RNase-Free ependorfa aktarılıp membranın ortasına 30 µl RNasefree ddH₂O ilave edildi. 2 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 12000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilen örnekler saflık ve miktar ölçümü yapıldıktan sonra, -20⁰ C derin dondurucuda saklandı.

3.12.3. RNA saflığının belirlenmesi ve konsantrasyon hesaplanması

Çok modlu mikropalak okuyucu (Biotek Synergy HTX, ABD) kullanılarak 260nm/280nm dalga boyunda elde edilen RNA'nın saflığı ve miktarı ölçüldü. Saflık oranları 1,9 civarında olan RNA'lar çalışmada kullanıldı (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. RNA saflık ve miktar tayin tablosu

Örnek	Grup	260/280	ng /µL
1	SHSY-5Y Kontrol	1.921	83.935
1	SHSY-5Y Aβ Kontrol	1.991	73.889
1	SHSY-5Y Aβ 1/1	1.914	55.818
1	SHSY-5Y Aβ 1/2	1.995	44.875
1	SHSY-5Y Aβ 1/4	1.896	76.067
1	SHSY-5Y Aβ 1/8	1.985	63.971
1	SHSY-5Y Aβ 1/16	1.816	55.015

3.12.4. cDNA sentezi

Hücrelerden elde edilen total RNA miktarları spektrofotometre kullanılarak 260/280 nm oranına göre hesaplanarak sonuçlar ng/µl olarak bulundu. RNA örnekleri -80⁰ C derin dondurucuda saklandı. Çıkarılıp çözünen örneklerden Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) ve T100 PCR System (Bio- Rad, Hercules, CA, USA) termal döngü cihazı kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi.

1.Aşama:

Çizelge 3.4. cDNA sentez protokolü

Total RNA	5 µg
10mm dNTP karışımı	1µL
Oligo dT	1 µl
Primer	2 µl
RNA içermeyen su	10,0 µL

Tüm örnekler için Çizelge 3.4 de miktarları belirtilen reaktifler ısıya dayanıklı 0,5 µl' lik termal tüpler içerisinde 65°C' de 10 dakika boyunca T100 PCR sistem (Bio- Rad, Hercules, CA, USA) kullanılarak inkübasyona bırakıldı.

2.Aşama:

Çizelge 3.5. cDNA sentez protokolü

5XRT Tampon	4 µL
RNaz inhibitörü 40U/ µL	0,5 µL
Deoksinükleotid Karışımı 10 mM	2,0 µL
Ters Transkriptaz 20U/ µL	0,5 µL

Bu karışım (Çizelge 3.5) 1. aşamadaki reaktiflerin üzerine eklenerek 55°C' de 30 dakika, 85°C' de 5 dakika boyunca T100 PCR sisteminde (Bio- Rad, Hercules, CA, USA) inkübe edildi. İşlem sona erdiğinde tüpler hızla buz üzerine alındı. Örnekler RT-PCR için -80° C' de saklandı

3.12.5. RT-PCR analizi

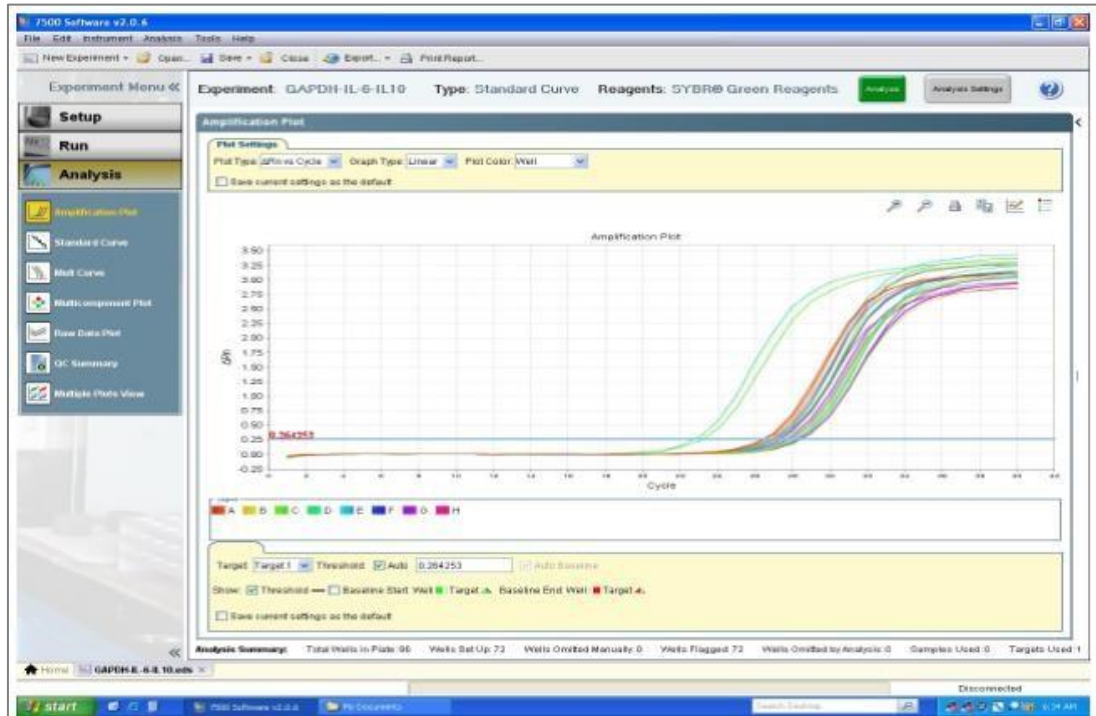
cDNA sentezi yapılan örnekler çalışmadan 10 dakika önce oda ısısında bekletildi.

Çalışmada GAPDH geni kontrol (housekeeping) gen olarak kullanıldı. SYBR Green Master Mix, Primer F, Primer R PCR Grade H₂O ve cDNA reaktifleri (Çizelge 3.6) her bir örnek için aşağıdaki miktarlarda olmak üzere 8' li PCR strip tüpler içerisine alındı. ABI 7500 Real-Time PCR cihazı ile örnekler: 95°C'de 3 dakika, 95°C'de 5 sn 60°C'de 30 sn 72°C'de 30 sn, 40 siklus olacak şekilde amplifiye edildi. Erime ısısı analizi; 70°C ve 95°C arasındaki

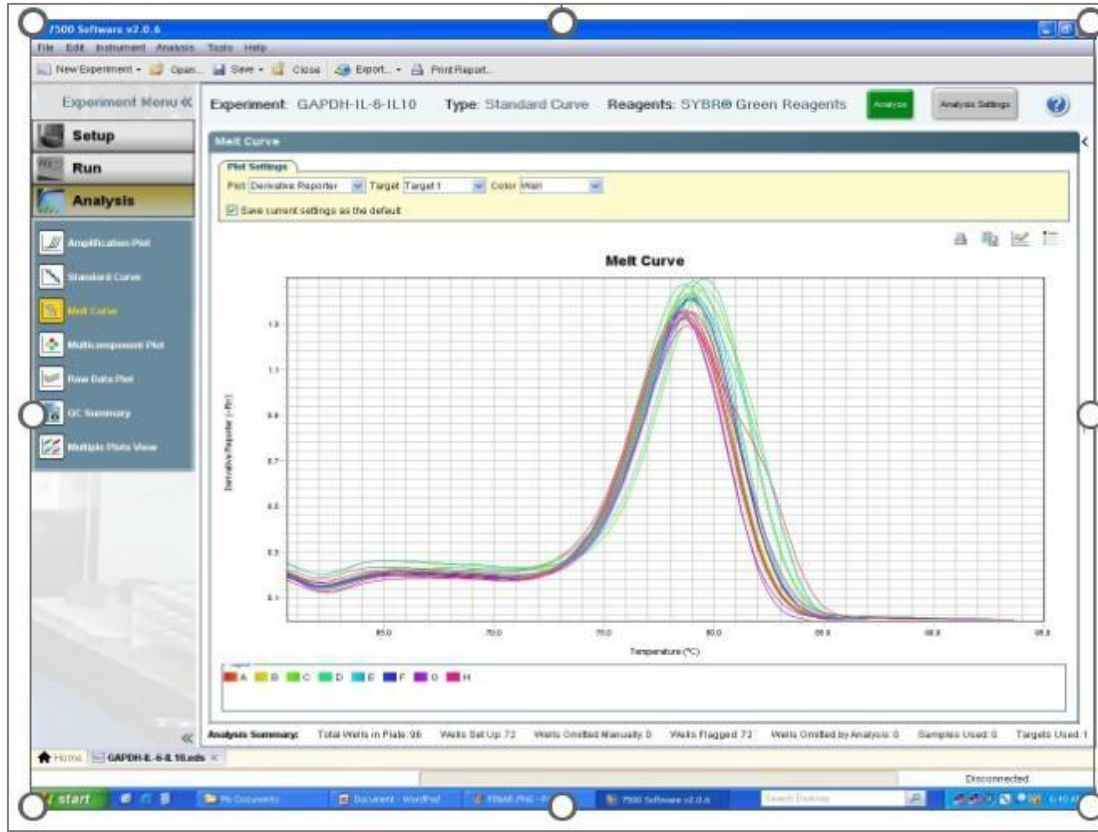
sıcaklıklarda, ısı miktarı 2 saniyede 0,1°C artırılarak ve zamana bağlı olarak oluşan floresan miktarının erime eğrisi değerlendirilerek yapıldı (Resim 3.2).

Çizelge 3.6. RT-PCR mix bileşimi

SYBR Green Master Mix (10X)	10,0 µL
Primer F (10 pM):	0,8 µL
Primer R (10 pM):	0,8µL
PCR Grade H ₂ O	10 µL
cDNA (500ng / µl) :	2µL



Resim 3.2. Real-Time PCR’da gözlenen eşik değeri eğrileri (Ct)



Resim 3.3. Erime eğrisi analizi

3.12.6. RT-PCR uygulamasında kullanılan primerler

Primer tasarımları Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi [National Center for Biotechnology Information Gen-Bank (NCBI-Gen Bankası)] veri tabanı üzerinde bulunan primer BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) dizi eşleştirme analizi ile tasarlandı. Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>) programı ile değerlendirildi (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Kullanılan primer tablosu

Gen (Transkript)	Primer Sekansları (5'-3')
TNF- α	F: AAAACAACCCTCAGACGCCA
TNF- α	R: TCCTTTCCAGGGGAGAGAGG
NF κ B	F: AACAGCAGATGGCCCATACC
NF κ B	R: AATAGGCAAGGTCAGGGTGC
TGFB1	F: ACCTGCCACAGATCCCCTAT
TGFB1	R: GAGCAACACGGGTTTCAGGTA
IL-6	F: CTTTCGGTCCAGTTGCCTTCTC
IL-6	R: GGCATTTGTGGTTGGGTCAG
COX-2 (PGES2)	F: TTGCATTCTTTGCCCAGCAC
COX-2 (PGES2)	R: ACCGTAGATGCTCAGGGACT
GAPDH	F: TTTTGCGTCGCCAGCC
GAPDH	R: ATGGAATTGCCATGGGTGGA

3.12.7. RT-PCR analiz yöntemi

Çalışmamızda referans gen olarak GAPDH kullanıldı. Böylece farklı örnekler arasında genlerin ifadesinin karşılaştırılması sağlandı. Gen ifadesini ölçmek için standardize Ct değeri (amplifikasyon eğrisinin eşik değeri aştığı döngü sayısı) , Δ Ct değeri hesaplandı (Resim 3.3). ÇDYA uygulanan örneklerin Ct değerlerinden referans gen Ct değerleri çıkarılarak, doz uygulaması yapılan örneklerin Δ Ct değerleri hesaplandı. Kontrol örneklerinin Ct değerlerinden, referans gen Ct değerleri çıkarılarak kontrol örneklerinin Δ Ct değerleri hesaplandı. ÇDYA uygulanan örneklerin, kontrol örneklerine göre ekspresyon seviyesini belirlemek için Δ Ct değerleri kullanılarak $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ değeri hesaplandı. $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ değeri hesaplamaları sonucunda çıkan 2 üzerindeki değer anlamlı ve kontrole göre artmış regülasyonu ifade ederken, 1 ve 2 arası değer anlamsız regülasyonu, 0 ve 1 arası değer ise azalmış regülasyonu ifade etmektedir. İfadesi azalmış regülasyonun anlamlı veya anlamsız olduğunu belirlemek amacıyla $-1/2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ yapıldı. -1 ile -2 arası anlamsız-düşük regülasyonu ifade ederken, -2 veya -2' den küçük değerler anlamlı -azalmış regülasyonu ifade etmektedir [126]. ÇDYA uyguladığımız hücre örneklerinin RT-PCR uygulamasında elde edilen amplifikasyon eğrilerinin Ct değerlerinden, $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ değerleri hesaplandı.

3.13. Akım Sitometri ile Annexin V, MMP, ROT ve Hücre Döngüsü Analizi

3.13.1. Akım sitometri ile annexin V ölçümü

İn vitro kültür koşullarında hücre apoptozunun ölçümü için en duyarlı, en spesifik ve en çok kullanılan test olarak Floresein İzotiyosiyanat (FITC) etiketli Annexin V/Propidium iyodür akış sitometrisi kabul edilmektedir [127]. Apoptozun erken evrelerinde hücre yüzeyinde değişiklikler meydana gelir. Plazma zarındaki değişikliklerinden biri, fosfatidilserinin (PS) plazma zarının iç yüzeyinden dış yüzeye translokasyonudur. Annexin V, fosfatidil serine yüksek afiniteli, Ca^{+2} bağımlı fosfolipid bağlayıcı bir protein olduğu için hassas bir ölçüt olarak kullanılabilir. PS'nin membranın dış yüzeyine translokasyonu apoptoza özgü değildir, hücre nekrozu sırasında da meydana gelir. Bu iki hücre ölümünün farkı, apoptozun ilk aşamalarında hücre zarının bozulmadan kalmasından dolayıdır. Nekroz meydana geldiği anda hücre zarı bütünlüğünü kaybeder. Bu nedenle, apoptozun göstergesi olarak hücre yüzeyine bağlanan Annexin V' in ölçümü, hücre zarının bütünlüğünü belirlemek için bir boyama testi ile birlikte gerçekleştirilmelidir. Bütün hücreleri (FITC/PI-), apoptotik hücreleri (FITC+/PI-) ve nekrotik hücreleri (FITC+/PI+) ayırt eder. Mevcut testlerle karşılaştırıldığında, Annexin V testi hassas ve uygulanması kolaydır [128]. Annexin V analizi, hücre zarı bütünlüğünün kaybından önce apoptozun erken evrelerinin saptanmasına ve hücre döngüsüyle ilişkili olarak apoptotik ölümün kinetiğinin ölçülmesine izin verir [128].

Reaktifler

Çalışmamızda BD Pharmingen™ FITC and PE Annexin V Apoptosis Detection Kits (Cat.

Nos. 556570) aşağıdaki basamaklar uygulanarak kullanıldı.

1. FITC Ek V (bileşen no. 51-65874X): Test başına 5 µl kullanıldı.
2. Nükleik asit boyası olan Propidium İyodür (PI) (bileşen no. 51-66211E), örnek başına 5 µl kullanıldı.
3. 10X Annexin V Bağlama Tamponu (bileşen no. 51-66121E): 0,1 M Hepes/NaOH (pH 7,4), 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl₂.

1X çalışma solüsyonu için, 10X Annexin V Bağlama Tamponunu 9 kat saf su ile seyreltilerek kullanıldı.

Boyama

1. İki kez soğuk PBS ile yıkanan 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde hazırlanan hücreler 1X Bağlama Tamponu içinde süspanse edildi.
2. 1×10^5 hücre için uygulanacak 100 μ l solüsyon 5 ml' lik tüpe aktarıldı.
3. 5 μ l FITC Annexin V ve 5 μ l PI ilave edildi.
4. Tüpler hafifçe karıştırılarak karanlıkta ve oda sıcaklığında (25°C) 10-15 dakika bekletildi.
5. Her tüpe 400 μ l 1X Bağlama Tamponu eklenerek 30 dakika içinde akış sitometrisi ile analizleri yapıldı.

3.13.2. Akım sitometri ile MMP ölçümü

Mitokondri, hücre sinyalizasyonu, hücre döngüsünün kontrolü, hücre büyüme, hücre farklılaşması, metabolitlerin taşınması ve hücre ölümü gibi birçok süreçte yer almaktadır.

Besinleri adenosin trifosfat (ATP) enerjisine dönüştürürler ve hücrenin güç jeneratörleri olarak kabul edilirler. Bu işlem, iç zar boyunca elektrokimyasal bir fark oluşturmaktadır. Oksidasyon ve indirgeme reaksiyonları sırasında elektronlar tarafından salınan enerji, protonları (H^+ iyonları) matristen zarlar arası boşluğa pompalamakta ve burada bir proton konsantrasyon gradientine neden olmaktadır. Sonuç olarak, mitokondrinin iç zarı boyunca negatif potansiyel farkı üretilmektedir. Elde edilen elektrokimyasal potansiyel ($\Delta \mu H^+$): $\Delta \mu H^+ = -2.3 RT \Delta pH^+ F$ olarak tanımlanmaktadır. ΔpH , pH farkı ve $\Delta \Psi_m$ mitokondriyal membran potansiyelidir. $\Delta \Psi_m$ genellikle -120 mV' den düşüktür (hücre dışı boşluktan daha negatiftir). $\Delta \Psi_m$, hücre canlılığının bir göstergesi olarak kullanılan mitokondriyal fonksiyonun önemli bir parametresidir. Mitokondriyal transmembran potansiyelinin bozulması, apoptoz indüksiyonunda meydana gelen en erken hücre içi olaylardan biridir. Mitokondriyal membran potansiyelinin analizi MMP Kit (THORVACS Biyoteknoloji,

Kat#; MMPAK-100T) kullanılarak yapıldı. SH-SY5Y hücre dizisinde oluşturulan deney gruplarında hazırlanan hücreler tripsinizasyon yöntemi ile bir araya toplandı.

Boyama

1. İki kez soğuk PBS ile 500 xg de 5 dakika santrifüj edilerek yıkanan hücreler, 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde hazırlandı.
2. Hücreler 1X PBS içinde süspanse edildi.
3. 1×10^6 hücre için uygulanacak 10µl boyama solüsyon eklendi ve 37°C' de 30 dakika inkübe edildi.
4. JC-1 boyası ile işaretlenip BD Accuri C6 (BD Biosciences) akım sitometri cihazında analiz edildi.

3.13.3. Akım sitometri ile ROT ölçümü

Reaktif oksijen türleri, oksijen metabolizmasının doğal bir yan ürünü olarak üretilen kimyasal olarak reaktif oksijen içeren moleküllerdir. ROT, normal fizyolojik koşullar altında sürekli olarak üretilir ve ortadan kaldırılır. Hücre sinyalizasyonunda, homeostazda ve mikrobiyal enfeksiyonların temizlenmesinde önemli işlevlere sahiptir. UV, ısı maruziyeti, çevresel stres veya enfeksiyon sırasında, ROT seviyeleri oksidatif strese yol açacak şekilde önemli ölçüde artabilir. Oksidatif stres hücresel proteinlere, lipidlere ve DNA' ya zarar vererek kardiyovasküler hastalık, kanser, diyabet ve inflamasyon riskini artırır. ROT örnekleri arasında süperoksit iyonları ve peroksitler bulunur. Hücre içi reaktif oksijen türlerinin tayini ROS Detection Kit (THORVACS Biyoteknoloji, Kat#; ROS-

100T) kullanılarak yapıldı. SH-SY5Y hücre dizisinde oluşturulan deney gruplarında hazırlanan hücreler tripsinizasyon yöntemiyle toplandı.

Boyama

1. İki kez soğuk PBS ile 500 xg de 5 dakika santrifüj edilerek yıkanan hücreler, 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde hazırlandı.
2. Hücreler 1X PBS içinde süspanse edildi.
3. 1×10^6 hücre için uygulanacak 10µl ROS boyama solüsyonu eklendi ve 37°C de 30 dakika inkübe edildi.
4. Boyanan hücreler BD Accuri C6 (BD Biosciences) akım sitometri cihazında FL1 kanalı kullanılarak analiz edildi.

3.14.4. Akım sitometri ile hücre döngüsü analizi

Bir hücre popülasyonundaki hücre döngüsünün belirli aşamalarında olan hücre sayısını tespit etmek, hücre büyümesini ve bölünmesini etkileyen bileşiklerin taranması için çok önemlidir. Hücredeki nükleik asitlere bağlanan, hücresel DNA içeriğiyle orantılı olarak floresans sinyali veren nükleer boyalar kullanılarak ölçüm yapılabilir. Hücre döngüsünün farklı aşamalarındaki (G0/G1, S ve G2/M) hücrelerin yüzdeleri ölçülebilir. Hücre döngüsü analizi Cell Cycle Kit (THORVACS Biyoteknoloji, Kat#; CCK-100T) kullanılarak yapıldı.

SH-SY5Y hücre dizisinde oluşturulan deney gruplarında hazırlanan hücreler tripsinizasyon yöntemi ile bir araya toplandı.

Boyama

1. İki kez soğuk PBS ile 500 xg de 5 dakika santrifüj edilerek yıkanan hücreler, 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde hazırlandı.
2. PBS uzaklaştırılarak pellet 200 μ l % 70 etanolde buz üzerinde fikse edildi.
3. Fiksasyona 4°C de 30 dakika boyunca devam edildi.
4. İnkübasyon sonrasında iki kez PBS ile 800 xg de 5 dakika santrifüj edilen hücrelerden etanol uzaklaştırıldı.
5. Hücreler 50 μ l enzim solüsyonu ile 37°C de 30 dakika inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonrası hücrelere 200 μ l boyama solüsyonu eklendi ve 37°C de 15-30 dakika bekletildi.
7. Boyanan hücreler BD Accuri C6 (BD Biosciences) akım sitometri cihazında FL3 kanalı kullanılarak analiz edildi.

3.14. Pro ve Antiinflamatuvar Sitokinlerin Ölçümü

A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki hücrelerin proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokin salınımları ELİSA yöntemi kullanılarak çalışıldı. Çalışmamızda TNF- α , COX-2, NF κ B, IL-6, TGF β 1 sitokinlerinin salınımına bakıldı. Sitokin ölçümleri 48 saat boyunca ÇDYA (Ω 3/ Ω 6) uygulaması sonucu elde edilen hücre lizatları kullanılarak yapıldı. Çalışmalar üretici firmanın kullanım klavuzlarına uyularak yapıldı.

3.14.1. Nükleer faktör -kappa-B (NFκB) seviyelerinin ölçülmesi

NFκB miktarı ölçümü (Elabscience Biotechnology Inc. Texas, USA) sandviç ELİSA yöntemine dayanmaktadır. Kuyucuklar NFκB antikorlarıyla kaplıdır. Antikorlara örnekler içindeki NFκB bağlanır. İmmun kompleks oluşumu için streptavidin-HRP ilave edilerek antijen-antikor kompleksi kuyucuklara tutunur. Kromojen ilavesi ile oluşan renkli kompleksin absorbansı 450 nm’ de ölçülür.

Örneklerinin hazırlanması

Hücre kültür kaplarında yapışarak üreyen SH-SY5Y hücreleri PBS ile hafifçe yıkandı ve tripsinizasyon ile santrifüj tüpüne toplandı. 1000×g’de 5 dakika santrifüjlenerek PBS ile 3 kez yıkandı. Her 1x10⁶ hücre için 150-250 µL önceden soğutulmuş PBS (0.01M, pH=7,4) eklenerek hücrelerin yeniden süspansiyon haline gelmesini sağlandı. Süspansiyon 5 saniye ultrasonik hücre parçalayıcı ile sonikasyona tabi tutuldu. 2 – 8 °C’ de 1500×g’ de 10 dakika santrifüj yapıldı. Deneyi gerçekleştirmek için süpernatant alikotlanarak -20⁰ C de saklandı.

Standartların hazırlanması

Referans Standart, 1 dakika boyunca 10.000 x g’ de santrifüj edildikten sonra 1 ml referans standart solüsyon eklendi. Tamamen çözülmesi için 10 dakika bekletildi iyice pipetaj yapıldı. Böylelikle 10 ng/ml’ lik stok standart çalışma çözeltisi elde edildi. 10 ng/ml stok standart çözeltisi ve standart diluent solüsyonu kullanılarak seri seyreltme yöntemiyle 5, 2,5, 1,25, 0,63, 0,32, 0,16 ve 0 ng/ml konsantrasyonlarında gradyanlar hazırlandı. Son tüp boş olarak kabul edildi.

Deney protokolü

1. Kuyucuklara çift tekrar olarak 100 µl standartlar ve örnekler eklendi. Kuyucuklar plate örtücü ile kaplanıp 37 °C’de 90 dakika boyunca inkübe edildi.
2. Her bir kuyucuğun içeriği dikkatlice aspire edilerek tüm kuyucuklara 100 µL Biotinylated Detection Ab eklendi. Kapatılan plate yavaşça karıştırıldı. 37 °C’de 1 saat inkübe edildi.
3. Her bir kuyucuğun içeriği dikkatlice aspire edilerek, tüm kuyucuklar yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı.

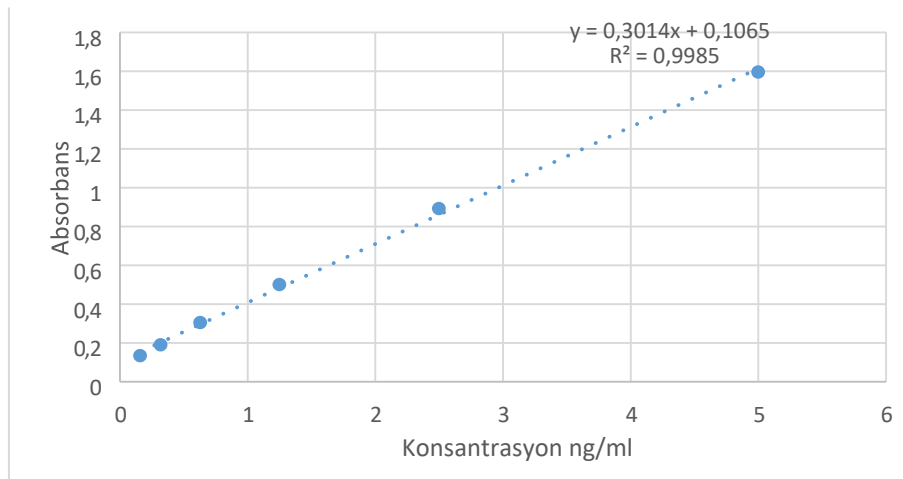
4. Her kuyucuğa 100 µL HRP konjugat çalışma solüsyonu eklendi. Plate örtücü ile kaplandı, 30 dakika boyunca 37 °C’de inkübe edildi, ardından yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
5. Her bir kuyucuğa 90 µL substrat reaktifi eklenerek yeni bir plate örtücü ile kapatıldı. 37 °C’de yaklaşık 15 dakika inkübe edildi.
6. Her kuyucuğa 50 µL Durdurma Solüsyonu eklendi ve optik dansitesi (OD değeri) plate okuyucuda 450 nm’ de ölçüldü.

Standart çözeltilerinin konsantrasyon ve absorbans değerleri Çizelge 3.8. de kalibrasyon grafiği Şekil 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.8. NFκB standart çözeltilerinin konsantrasyon ve absorbans değerleri

Konsantrasyon (ng/mL)	Absorbans
5	1,593
2,5	0,89
1,25	0,495
0,63	0,309
0,32	0,192

*Kör değeri çıkarılarak elde edilen sonuçlar



Şekil 3.2. NFκB kalibrasyon grafiği

3.14.2. Tümör nekrozis faktör alfa (TNF-α) seviyelerinin ölçülmesi

TNF-α ölçümü, sandviç ELİSA (ELK Biotechnology Inc. Wuhan, China) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Kuyucuklar TNF-α antikorlarıyla kaplıdır. Antikora örnekler içindeki

TNF- α bağlanır. İmmun kompleks oluşumu için streptavidin-HRP ilave edilerek antijen-antikor kompleksi kuyucuklara tutunur. Kromojen ilavesi ile oluşan renkli kompleksin absorbansı 450 nm' de ölçülür.

Örneklerinin hazırlanması

Hücre kültür kaplarına yapışarak üreyen SH-SY5Y hücreleri PBS ile hafifçe yıkandı ve tripsinizasyon ile santrifüj tüpüne toplandı. 1000×g' de 5 dakika santrifüjlenerek PBS ile 3 kez yıkandı. Her 1×10^6 hücre için 150-250 μ L önceden soğutulmuş PBS (0.01M, pH=7,4) eklenerek hücrelerin yeniden süspansiyon haline gelmesini sağlandı. Süspansiyon 5 saniye ultrasonik hücre parçalayıcı ile sonikasyona tabi tutuldu. 2 - 8°C'de 1500×g' de 10 dakika santrifüj yapıldı. Deneyi gerçekleştirmek için süpernatant alikotlanarak -20⁰ C de saklandı.

Standartların hazırlanması

Referans Standart, 1 dakika boyunca 10.000 x g' de santrifüj edildikten sonra 1 ml referans standart diluent solüsyonu eklendi. Tamamen çözülmesi için 10 dakika bekletildi iyice pipetaj yapıldı. Böylelikle 500 pg/ml' lik stok standart çalışma çözeltisi elde edildi. 500 pg/mlstok standart çözelti ve standart diluent solüsyonu kullanılarak seri seyreltme yöntemiyle 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63 ve 0 pg/ml konsantrasyonlarında gradyanlar hazırlandı. Son tüp boş olarak kabul edildi.

Deney protokolü

1. Kuyucuklara çift tekrar olarak 100 μ l standartlar ve örnekler eklendi. Kuyucuklar plaka örtücü ile kaplanıp 37 °C'de 80 dakika boyunca inkübe edildi.
2. Her bir kuyucuğun içeriği dikkatlice aspire edilerek tüm kuyucuklara 100 μ L Biotinylated Detection Ab eklendi. Kapatılan plaka yavaşça karıştırıldı. 37 °C'de 50 dakika inkübe edildi.
3. Her bir kuyucuğun içeriği dikkatlice aspire edilerek, tüm kuyucuklar yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı.
4. Her kuyucuğa 100 μ L HRP konjugat çalışma solüsyonu eklendi. Plaka örtücü ile kaplandı, 50 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edildi, ardından yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.

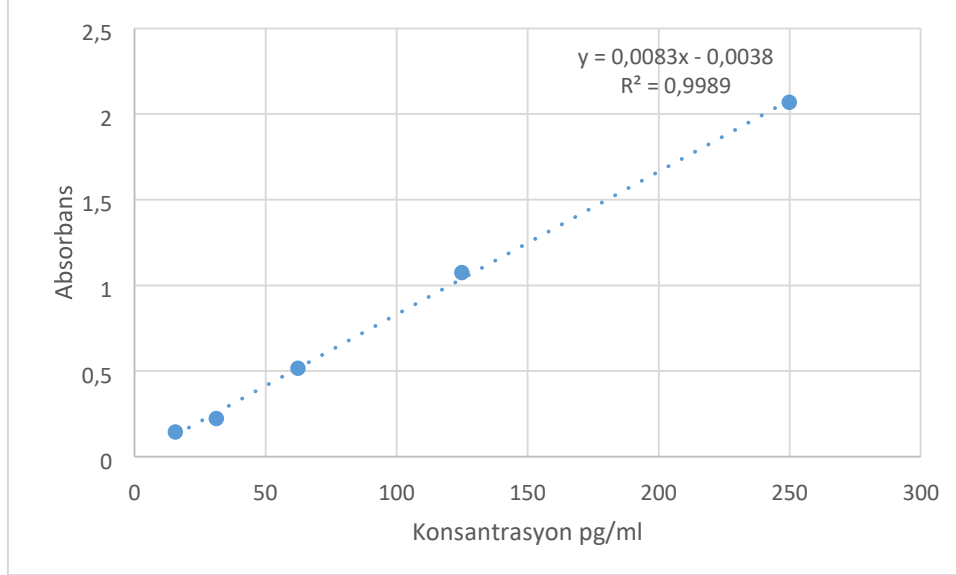
5. Her bir kuyucuğa 90 µL substrat reaktifi eklenerek yeni bir plaka örtücü ile kapatıldı. 37 °C'de yaklaşık 20 dakika inkübe edildi.
6. Her kuyucuğa 50 µL Durdurma Solüsyonu eklendi ve optik dansitesi (OD değeri) plate okuyucuda 450 nm'de ölçüldü.

Standart çözeltilerinin konsantrasyon ve absorbans değerleri Çizelge 3.9. da kalibrasyon grafiği şekil 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.9. TNF-α standart çözeltilerinin konsantrasyon ve absorbans değerleri

Konsantrasyon pg/ml	Absorbans
250	2,124
125	0,952
62,5	0,514
31,25	0,22
15,63	0,148

*Kör değeri çıkarılarak elde edilen sonuçlar



Şekil 3.3. TNF-α kalibrasyon grafiği

3.14.3. İnterlökin-6 (IL-6) seviyelerinin ölçülmesi

IL-6 ölçümü, sandviç ELİSA (ELK Biotechnology Inc. Wuhan, China) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Kuyucuklar IL-6 antikorlarıyla kaplıdır. Antikora örnekler içindeki IL-6 bağlanır. İmmun kompleks oluşumu için streptavidin-HRP ilave edilerek antijenantikor

kompleksi kuyucuklara tutunur. Kromojen ilavesi ile oluşan renkli kompleksin absorbansı 450 nm' de ölçülür.

Örneklerinin hazırlanması

Hücre kültür kaplarında yapışarak üreyen SH-SY5Y hücreleri PBS ile hafifçe yıkandı ve tripsinizasyon ile santrifüj tüpüne toplandı. 1000×g'de 5 dakika santrifüjlenerek PBS ile 3 kez yıkandı. Her 1x10⁶ hücre için 150-250 µL önceden soğutulmuş PBS (0.01M, pH=7,4) eklenerek hücrelerin yeniden süspansiyon haline gelmesini sağlandı. Süspansiyon 5 saniye ultrasonik hücre parçalayıcı ile sonikasyona tabi tutuldu. 2 - 8°C' de 1500×g'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Deneyi gerçekleştirmek için süpernatant alikotlanarak -20⁰ C de saklandı.

Standartların hazırlanması

Referans Standart, 1 dakika boyunca 10.000 x g' de santrifüj edildikten sonra 1 ml referans standart&örnek diluent solüsyonu eklendi. Tamamen çözülmesi için 10 dakika bekletildi iyice pipetaj yapıldı. Böylelikle 500 pg/ml' lik stok standart çalışma çözeltisi elde edildi.

500 pg/ml stok standart çözelti ve standart diluent solüsyonu kullanılarak seri seyreltme yöntemiyle 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,82 ve 0 pg/ml konsantrasyonlarında gradyanlar hazırlandı. Son tüp boş olarak kabul edildi.

Deney protokolü

1. Kuyucuklara çift tekrar olarak 100 µl standartlar ve örnekler eklendi. Kuyucuklar plaka örtücü ile kaplanıp 37 °C'de 80 dakika boyunca inkübe edildi.
2. Her bir kuyucuğun içeriği dikkatlice aspire edilerek tüm kuyucuklara 100 µL Biotinylated Detection Ab eklendi. Kapatılan plaka yavaşça karıştırıldı. 37 °C'de 50 dakika inkübe edildi.
3. Her bir kuyucuğun içeriği dikkatlice aspire edilerek, tüm kuyucuklar yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı.
4. Her kuyucuğa 100 µL HRP konjugat çalışma solüsyonu eklendi. Plaka örtücü ile kaplandı, 50 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edildi, ardından yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.

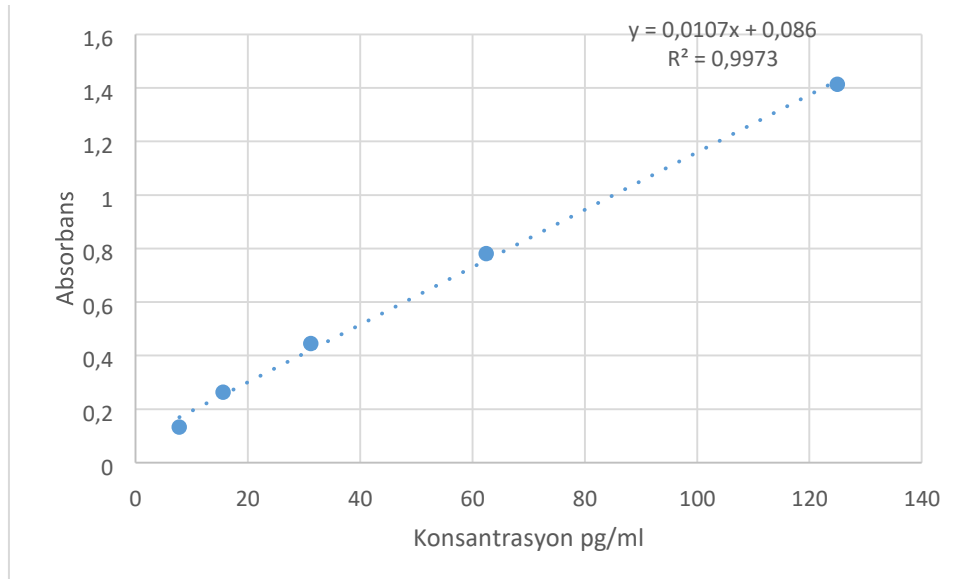
5. Her bir kuyucuğa 90 µL substrat reaktifi eklenerek yeni bir plaka örtücü ile kapatıldı. 37 °C'de yaklaşık 20 dakika inkübe edildi.
6. Her kuyucuğa 50 µL Durdurma Solüsyonu eklendi ve optik dansitesi (OD değeri) plaka okuyucuda 450 nm'de ölçüldü.

Standart çözeltilerinin konsantrasyon ve absorbans değerleri Çizelge 3.10. de kalibrasyon grafiği Şekil 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.10. IL-6 standart çözeltilerinin konsantrasyon ve absorbans değerleri

Konsantrasyon(ng/mL)	Absorbans
125	1,412
62,5	0,78
31,25	0,444
15,63	0,262
7,82	0,132

*Kör değeri çıkarılarak elde edilen sonuçlar



Şekil 3.4. IL-6 kalibrasyon grafiği

3.14.4. COX-2 seviyelerinin ölçülmesi

COX-2 miktar tayini PTGS2\COX-2 proteinin ölçümü ile yapılmıştır. PTGS2\COX-2 ölçümü, sandviç ELİSA (Elabscience Biotechnology Inc. Texas, USA) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Kuyucuklar COX-2 antikorlarıyla kaplıdır. Antikorlara örnekler

içindeki COX-2 bağlanır. İmmun kompleks oluşumu için streptavidin-HRP ilave edilerek antijen-antikör kompleksi kuyucuklara tutunur. Kromojen ilavesi ile oluşan renkli kompleksin absorbanansı 450 nm' de ölçülür.

Örneklerinin hazırlanması

Hücre kültür kaplarında yapışarak üreyen SH-SY5Y hücreleri PBS ile hafifçe yıkandı ve tripsinizasyon ile santrifüj tüpüne toplandı. 1000×g' de 5 dakika santrifüjlenerek PBS ile 3 kez yıkandı. Her 1×10^6 hücre için 150-250 µL önceden soğutulmuş PBS (0.01M, pH=7,4) eklenerek hücrelerin yeniden süspansiyon haline gelmesini sağlandı. Süspansiyon 5 saniye ultrasonik hücre parçalayıcı ile sonikasyona tabi tutuldu. 2 - 8°C' de 1500×g' de 10 dakika santrifüj yapıldı. Deneyi gerçekleştirmek için süpernatant alikotlanarak -20° C de saklandı.

Standartların hazırlanması

Referans Standart, 1 dakika boyunca 10.000 x g' de santrifüj edildikten sonra 1 ml referans standart diluent solüsyonu eklendi. Tamamen çözülmesi için 10 dakika bekletildi iyice pipetaj yapıldı. Böylelikle 20 ng/ml' lik stok standart çalışma çözeltisi elde edildi. 20 ng/ml standart çözeltisi ve standart diluent solüsyonu kullanılarak seri seyreltme yöntemiyle 5, 2,5, 1,25, 0,63, 0,31 ve 0 ng/ml konsantrasyonlarda gradyanlar hazırlandı.

Son tüp boş olarak kabul edildi.

Deney protokolü

1. Kuyucuklara çift tekrar olarak 100 µl standartlar ve örnekler eklendi. Kuyucuklar plaka örtücü ile kaplanıp 37 °C' de 90 dakika boyunca inkübe edildi.
2. Her bir kuyucuğun içeriği dikkatlice aspire edilerek tüm kuyucuklara 100 µL Biotinylated Detection Ab eklendi. Kapatılan plaka yavaşça karıştırıldı. 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.
3. Her bir kuyucuğun içeriği dikkatlice aspire edilerek, tüm kuyucuklar yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı.
4. Her kuyucuğa 100 µL HRP konjugat çalışma solüsyonu eklendi. Plaka örtücü ile kaplandı, 30 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edildi, ardından yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.

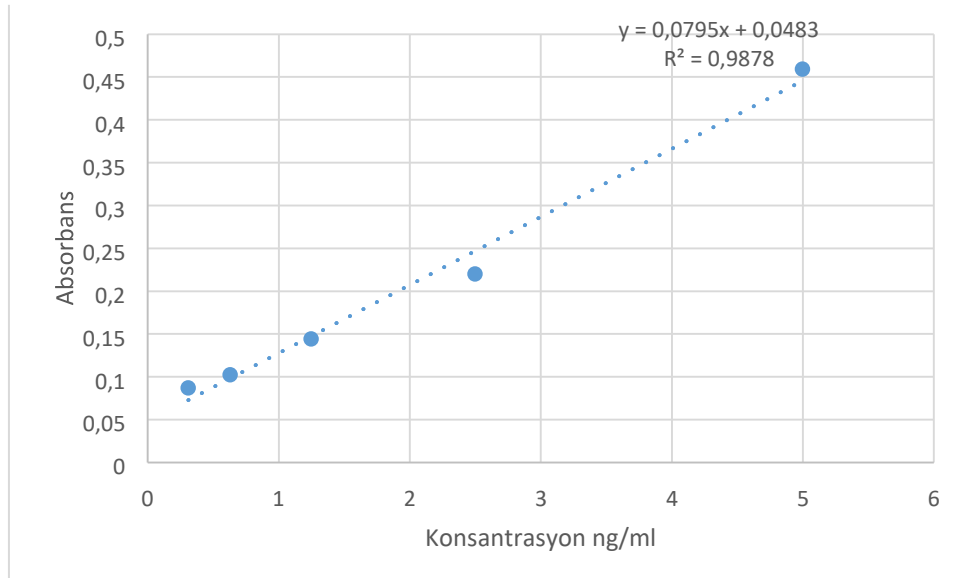
5. Her bir kuyucuğa 90 µL substrat reaktifi eklenerek yeni bir plaka örtücü ile kapatıldı. 37 °C'de yaklaşık 15 dakika inkübe edildi.
6. Her kuyucuğa 50 µL Durdurma Solüsyonu eklendi ve optik dansitesi (OD değeri) plate okuyucuda 450 nm'de ölçüldü.

Standart çözeltilerinin konsantrasyon ve absorbens değerleri Çizelge 3.11. de kalibrasyon grafiği Şekil 3.5’de verilmiştir.

Çizelge 3.11. PTGS2\COX-2 standart çözeltilerinin konsantrasyon ve absorbens değerleri

Konsantrasyon(ng/mL)	Absorbans
5	0,459
2,5	0,22
1,25	0,144
0,63	0,102
0,31	0,087

*Kör değeri çıkarılarak elde edilen sonuçlar



Şekil 3.5. PTGS2\COX-2 kalibrasyon grafiği

3.14.5. Transforming growth faktor beta 1 (TGF-β1) seviyelerinin ölçülmesi

TGF-β1 miktarı ölçümü (Elabscience Biotechnology Inc. Texas, USA) sandviç ELİSA yöntemine dayanmaktadır. Kuyucuklar TGF-β1 antikorlarıyla kaplıdır. Antikora örnekler içindeki TGF-β1 bağlanır. İmmun kompleks oluşumu için streptavidin-HRP ilave edilerek

antijen-antikor kompleksi kuyucuklara tutunur. Kromojen ilavesi ile oluşan renkli kompleksin absorbansı 450 nm' de ölçülür.

Örneklerinin hazırlanması

Hücre kültür kaplarında yapışarak üreyen SH-SY5Y hücreleri PBS ile hafifçe yıkandı ve tripsinizasyon ile santrifüj tüpüne toplandı. 1000×g'de 5 dakika santrifüjlenerek PBS ile 3 kez yıkandı. Her 1x10⁶ hücre için 150-250 µL önceden soğutulmuş PBS (0.01M, pH=7,4) eklenerek hücrelerin yeniden süspansiyon haline gelmesini sağlandı. Süspansiyon 5 saniye ultrasonik hücre parçalayıcı ile sonikasyona tabi tutuldu. 2 - 8°C' de 1500×g' de 10 dakika santrifüj yapıldı. Deneyi gerçekleştirmek için süpernatant alikotlanarak -20⁰ C de saklandı.

Standartların hazırlanması

Referans Standart, 1 dakika boyunca 10.000 x g' de santrifüj edildikten sonra 1 ml referans standart&örnek diluent solüsyonu eklendi. Tamamen çözülmesi için 10 dakika bekletildi iyice pipetaj yapıldı. Böylelikle 10 ng/ml' lik stok standart çalışma çözeltisi elde edildi. 10 ng/ml stok standart çözeltisi ve standart diluent solüsyonu kullanılarak seri seyreltme yöntemiyle 10, 5, 2,5, 1,25, 0,63, 0,32, 0,16 ve 0 ng/ml konsantrasyonlarında gradyanlar hazırlandı. Son tüp boş olarak kabul edildi.

Deney Protokolü

1. Kuyucuklara çift tekrar olarak 100 µl standartlar ve örnekler eklendi. Kuyucuklar plate örtücü ile kaplanıp 37 °C'de 90 dakika boyunca inkübe edildi.
2. Her bir kuyucuğun içeriği dikkatlice aspire edilerek tüm kuyucuklara 100 µL Biotinylated Detection Ab eklendi. Kapatılan plate yavaşça karıştırıldı. 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.
3. Her bir kuyucuğun içeriği dikkatlice aspire edilerek, tüm kuyucuklar yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı.
4. Her kuyucuğa 100 µL HRP konjugat çalışma solüsyonu eklendi. Plate örtücü ile kaplandı, 30 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edildi, ardından yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.

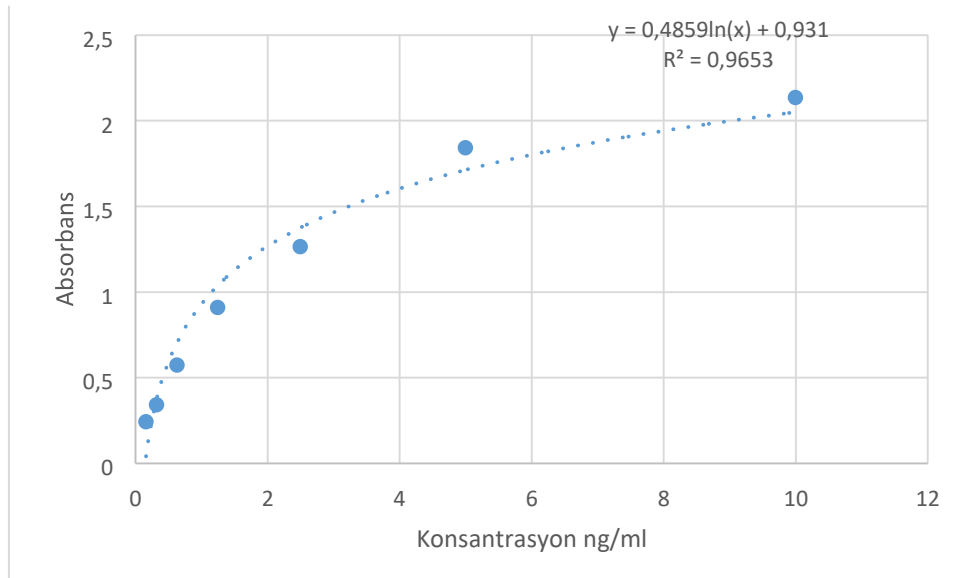
5. Her bir kuyucuğa 90 µL substrat reaktifi eklenerek yeni bir plate örtücü ile kapatıldı. 37 °C' de yaklaşık 15 dakika inkübe edildi.
6. Her kuyucuğa 50 µL Durdurma Solüsyonu eklendi ve optik dansitesi (OD değeri) plate okuyucuda 450 nm' de ölçüldü.

Standart çözeltilerinin konsantrasyon ve absorbans değerleri Çizelge 3.12. de kalibrasyon grafiği Şekil 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.12. TGF-β1 standart çözeltilerinin konsantrasyon ve absorbans değerleri

Konsantrasyon(ng/mL)	Absorbans
10	2,1335
5	1,84
2,5	1,2645
1,25	0,909
0,63	0,5725
0,32	0,3405
0,16	0,2425

*Kör değeri çıkarılarak elde edilen sonuçlar



Şekil 3.6. TGF-β1 kalibrasyon grafiği

3.15. İstatiksel Analiz

Tanımlayıcı istatistik olarak sürekli veriler için ortalama ve standart sapma ($\text{ort} \pm \text{ss}$) kullanılmıştır. Sürekli verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edilmiştir. Grup dağılımları Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiş çoklu karşılaştırma testi olarak Conover (1980) tarafından geliştirilen formül kullanılmıştır. Parametreler arasındaki ilişkiyi belirlemek için Spearman's rho korelasyon katsayıları hesaplandı. IBM SPSS 23 (IBM SPSS Inc, Chicago, IL) paket programı ile veriler analiz edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık seviyesi 0,05 olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığı Bulguları

4.1.1. Amiloid β_{1-42} 'nin SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı üzerinde 24-48-72 saatlik etkisinin MTT testi sonuçları

Çizelge 4.1. de 24, 48 ve 72. Saatlerdeki 8 grubun kontrol grubuna olan oranlarına ait ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığını gösteren sonuçlar gösterilmektedir. Farkın kaynağını bulmak için çoklu karşılaştırma testi Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır. 24 saatteki 8 gruba ait MTT ölçüm ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($F(7,40)=970,179$, $p < 0,001$). Kontrol grubu %100 olarak kabul edildiğinde 50 μM , 100 μM , 200 μM ve 400 μM gruplarındaki yüzdelik düşüşlerin istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık gösterdiği bulunmuştur ($p < 0,05$). Farkın kaynağını bulmak için yapılan çoklu karşılaştırma testi sonunda 50 μM , 100 μM , 200 μM ve 400 μM grup ortalamaları birbirleriyle kıyaslandığında anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p < 0,05$).

Çizelge 4.1. Amiloid β_{1-42} 'nin SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı üzerindeki 24-48-72 saatlik etkisinin MTT testi sonuçları

N=48	2,5 μM (1)	5 μM (2)	10 μM (3)	25 μM (4)	50 μM (5)	100 μM (6)	200 μM (7)	400 μM (8)	Test İstatistiği
24 Ort $\pm$ Ss (n=6)	101,80 (2,34)	99,18 (2,63)	99,63 (2,38)	99,96 (1,77)	78,64 (1,95)	66,01 (4,03)	39,96 (1,25)	26,17 (1,05)	$F(7,40)=970,179^*$ $p < 0,001^{**}$
48 Ort $\pm$ Ss (n=6)	100,08 (2,81)	95,97 (1,99)	98,12 (3,19)	96,80 (2,64)	70,54 (3,48)	55,55 (1,27)	28,10 (0,64)	13,99 (0,68)	$F(7,40)=1288,58^*$ $p < 0,001^{**}$
72 Ort $\pm$ Ss (n=6)	97,97 (7,54)	98,21 (7,49)	96,00 (9,15)	92,30 (7,48)	72,19 (3,21)	54,14 (5,65)	28,57 (1,64)	11,95 (0,84)	$F(7,40)=185,91^*$ $p < 0,001^{**}$

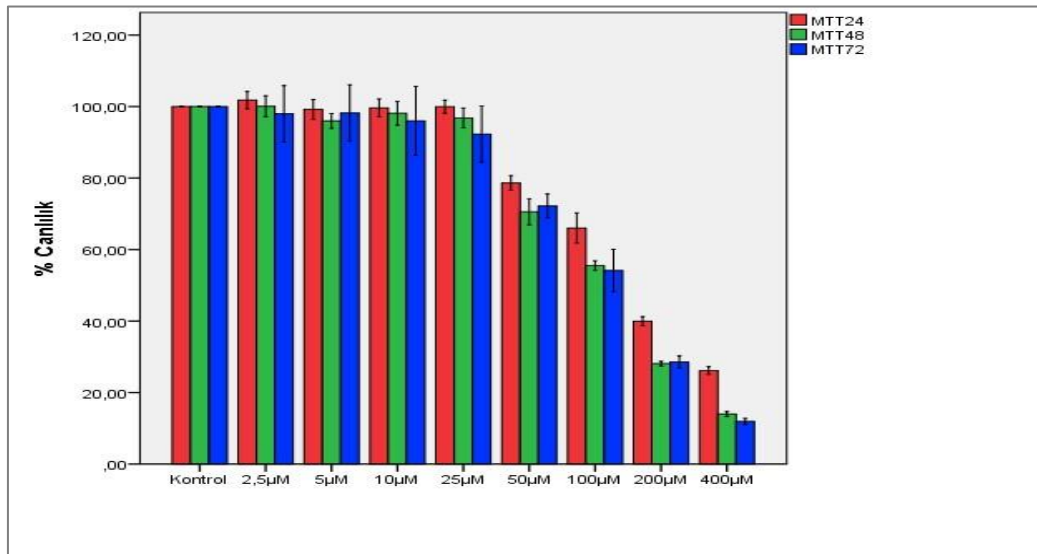
*: Tek yönlü ANOVA test istatistik değeri.

** : İstatistik anlamlılık düzeyi ($p < 0,05$).

48 saatteki kontrol grubu dışındaki 8 gruba ait MTT ölçüm ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($F(7,40)=1288,580$, $p < 0,001$). Kontrol grubu %100 olarak kabul edildiğinde 50 μM , 100 μM , 200 μM ve 400 μM gruplarındaki yüzdelik düşüşlerin istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık gösterdiği bulunmuştur ($p < 0,05$). Farkın kaynağını bulmak için yapılan çoklu karşılaştırma testi sonunda 50 μM , 100 μM , 200 μM ve 400 μM grup ortalamaları diğer grup ortalamalarından anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p < 0,05$). (Şekil 4.1)

72 saatteki kontrol grubu dışındaki 8 gruba ait MTT ölçüm ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($F(7,40)=185,910$, $p < 0,001$). Kontrol grubu %100 olarak kabul edildiğinde 50 μM , 100 μM , 200 μM ve 400 μM gruplarındaki yüzdelik düşüşlerin istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık gösterdiği bulunmuştur ($p < 0,05$). Farkın kaynağını bulmak için yapılan çoklu karşılaştırma testi sonunda 50 μM , 100 μM , 200 μM ve 400 μM grup ortalamaları diğer grup ortalamalarından anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p < 0,05$). (Şekil 4.1)

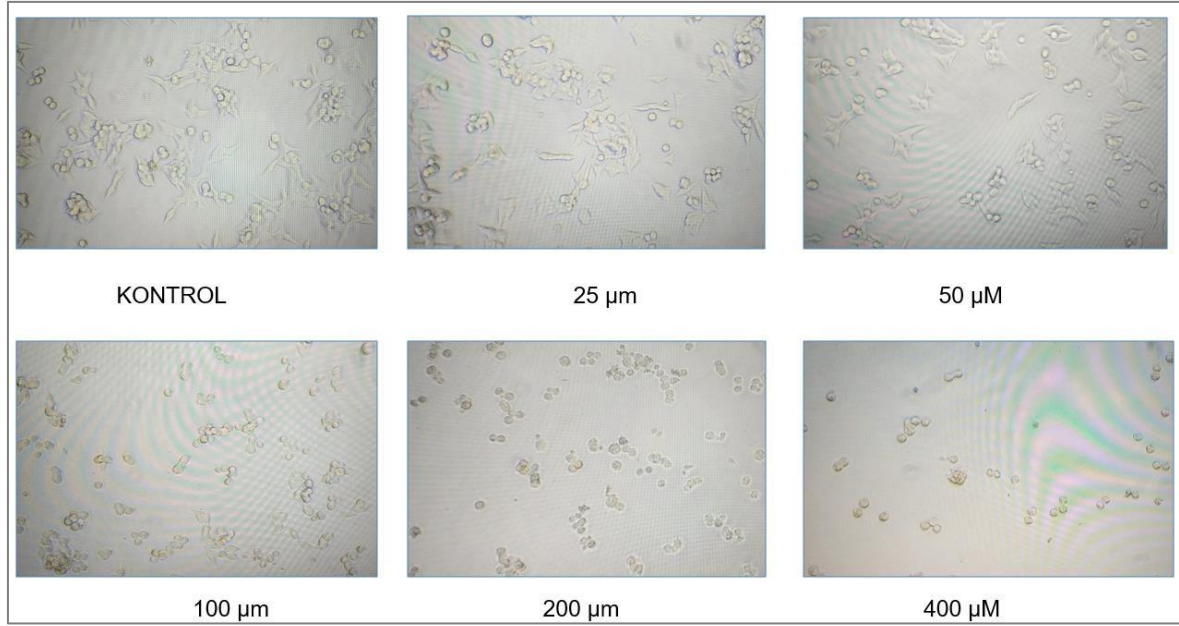
Çalışma verilerine göre Amiloid β_{1-42} 'nin 48 ve 72 saat uygulamaları benzer bulunmuştur. Deneyin toplam süresi 72 saat üzerinden kurgulandığı için $\text{A}\beta_{1-42}$ 'nin SH-SY5Y hücreleri üzerinde AH modeli oluşturabilecek ancak yüksek oranda sitotoksik etkisi olmayan etkin konsantrasyonu tespit edilmiştir. Bundan sonraki çalışmalara bu konsantrasyon (100 μM) ile devam edilmiştir.



Şekil 4.1. Amiloid β_{1-42} 'nin SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı üzerindeki 24-48-72 saatlik etkisinin MTT testi sonuçları

4.1.2. SH-SY5Y hücre hattı üzerine 48 saat Amiloid β_{1-42} uygulaması inverted mikroskop görüntüsü

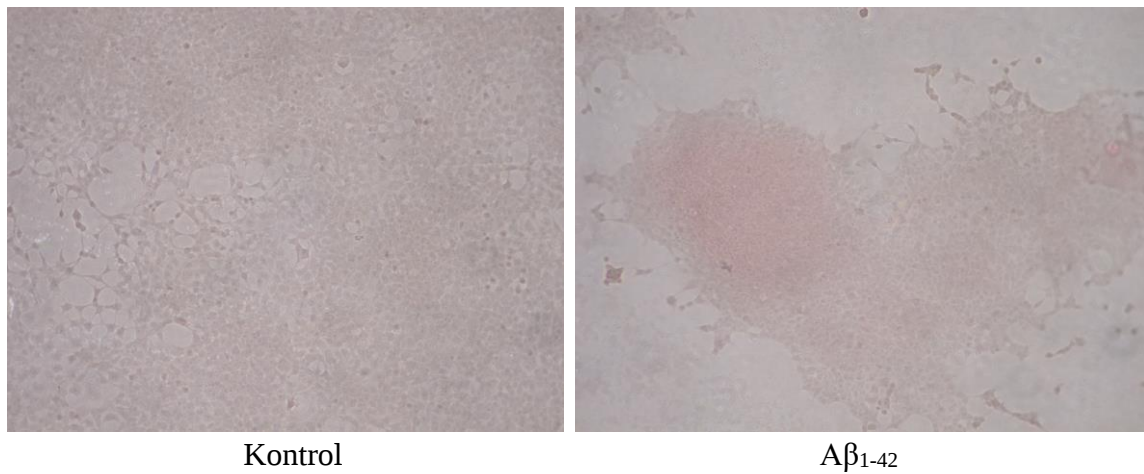
48 saatlik Amiloid β_{1-42} maruziyeti sonrası SH-SY5Y hücrelerinin inverted mikroskop (Nikon F12, Japonya) ile görüntüleri alındı. (Şekil 4.2). SH-SY5Y hücreleri üzerinde doz artışı ile uyumlu hücre azalışı gözlemlendi. Kantitatif olarak MTT testi ile elde edilen sonuçlar görsel olarak doğrulandı.



Şekil 4.2. 48. saat sonunda SH-SY5Y hücre hatları üzerine Amiloid β_{1-42} uygulanan ve uygulama yapılmayan gruplara ait inverted mikroskop görüntüsü

4.1.3. SH-SY5Y hücre hattı üzerine 48 saat amiloid β_{1-42} uygulaması Kongo red boyası inverted mikroskop görüntüsü

Kongo red boyası, $A\beta_{1-42}$ proteinin tayini için kullanılan yöntemlerden biridir. 100 μ M $A\beta_{142}$ uygulaması sonrası yapılan Kongo red boyamasında amiloidin kültürdeki dağılımı araştırıldı, $A\beta_{1-42}$ proteinin varlığı gösterildi.



Şekil 4.3. 48. saat sonunda SH-SY5Y hücre hatları üzerine amiloid β_{1-42} uygulanan ve uygulama yapılmayan gruplara ait Kongo red boyaması mikroskop görüntüsü

4.1.4. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) 48 saat uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki AChE protein miktarı bulguları

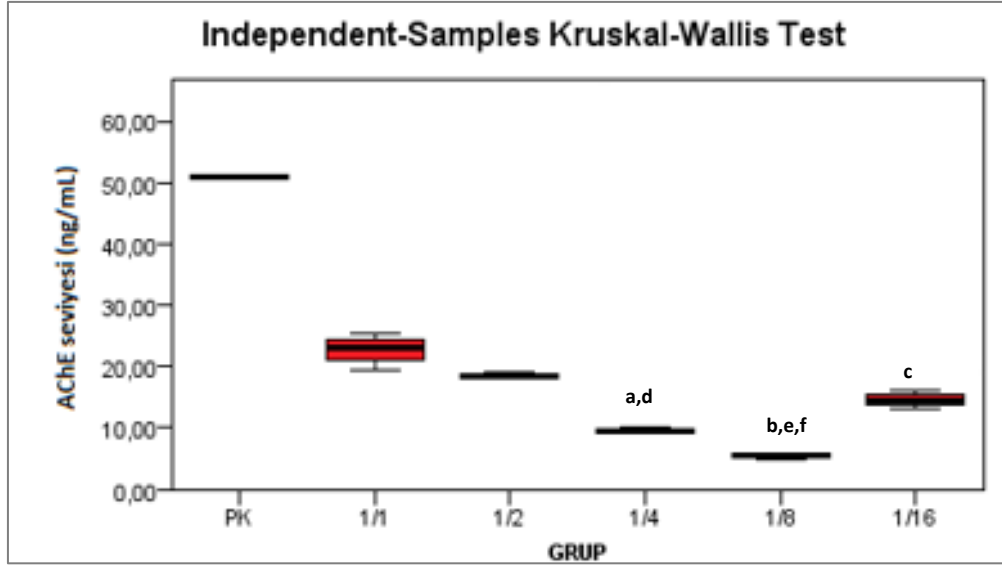
AChE enzim aktivitesini üzerine 100 μM $A\beta_{1-42}$ uygulaması sonucu enzim aktivitesinin uygulama yapılmayan kontrol grubuna göre %62 oranında arttığı ve AChE enzim aktivitesinin indüklendiği gözlenmiştir ($p < 0,05$). Diğer yandan, tüm ÇDYA uygulamalarının AChE enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkileri tespit edilmiştir. Çizelge 4.2' de kontrol grubuna göre $\Omega 3/\Omega 6$ oranlarına ait ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığının değerlendirildiği sonuçlar gösterilmektedir. Grup dağılımları Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($\chi^2=16,596$, $p < 0,005$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1/4, 1/8 ve 1/16 deney gruplarında (sırasıyla $p < 0,01$, $p < 0,001$ ve $p < 0,005$) istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlenmiştir. 1/4 deney grubunda 1/1 deney grubuna göre ($p < 0,05$) ve 1/8 deney grubunda 1/1 ve 1/2 deney gruplarına göre (sırasıyla $p < 0,01$ ve $p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı düşüş görülmektedir. (Şekil 4.4)

Çizelge 4.2. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki AChE protein seviyeleri

	Ortalama (Standart Sapma)							Test İstatistik
	NK	PK	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	
AChE PROTEİN (ng/ml)	32,50 (1,41)	50,83 (0,28)	22,66 (3,01)	18,58 (0,62)	9,62 (0,37)	5,38 (0,62)	14,58 (1,62)	$\chi^2=16,596^*$ $p < 0,009^{**}$

*: Kruskal-Wallis test istatistik değeri.

** : İstatistik anlamlılık düzeyi ($p < 0,05$).



^a $p < 0,01$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

^b $p < 0,001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

^c $p < 0,005$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

^d $p < 0,05$ 1/1 grubu ile karşılaştırıldığında

^e $p < 0,01$ 1/1 grubu ile karşılaştırıldığında

^f $p < 0,05$ 1/2 grubu ile karşılaştırıldığında

Şekil 4.4. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki AChE protein seviyeleri arasındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi

4.1.5. Çeşitli dozlardaki ÇDYA ($\Omega 3$ ve $\Omega 6$) 48 saat uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki hücre canlılığı üzerine etkisinin sonuçları

MTT sonuçları

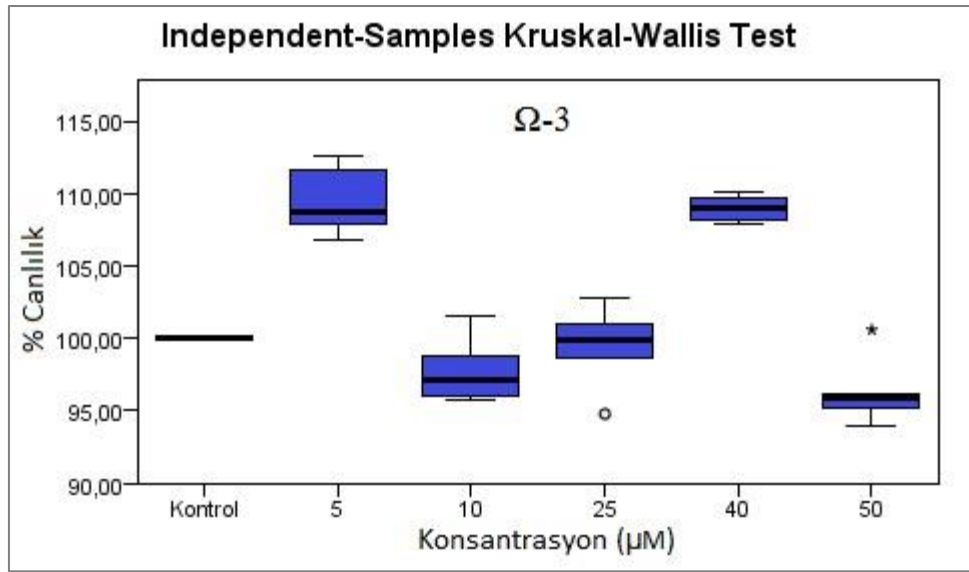
Çizelge 4.3' de 48. saatteki farklı $\Omega 3$ konsantrasyonlarının yer aldığı gruplar ile $\Omega 3$ içermeyen kontrol grubuna ait ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığının değerlendirildiği sonuçlar gösterilmektedir. Grup dağılımları Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($\chi^2=50,110$, $p < 0,001$). Farkın kaynağını bulmak için Conover formülü kullanılmıştır. Kontrol grubu %100 olarak kabul edildiğinde $\Omega 350 \mu M$ ve $\Omega 310 \mu M$ grupları haricinde diğer gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,001$). (Şekil 4.5) Çizelge 4.3. Çeşitli dozlardaki $\Omega 3$ -ÇDYA 48 saat uygulama sonucu

Çizelge 4.3. Çeşitli dozlardaki ÇDYA SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı üzerindeki 48 saatlik etkisinin MTT Testi

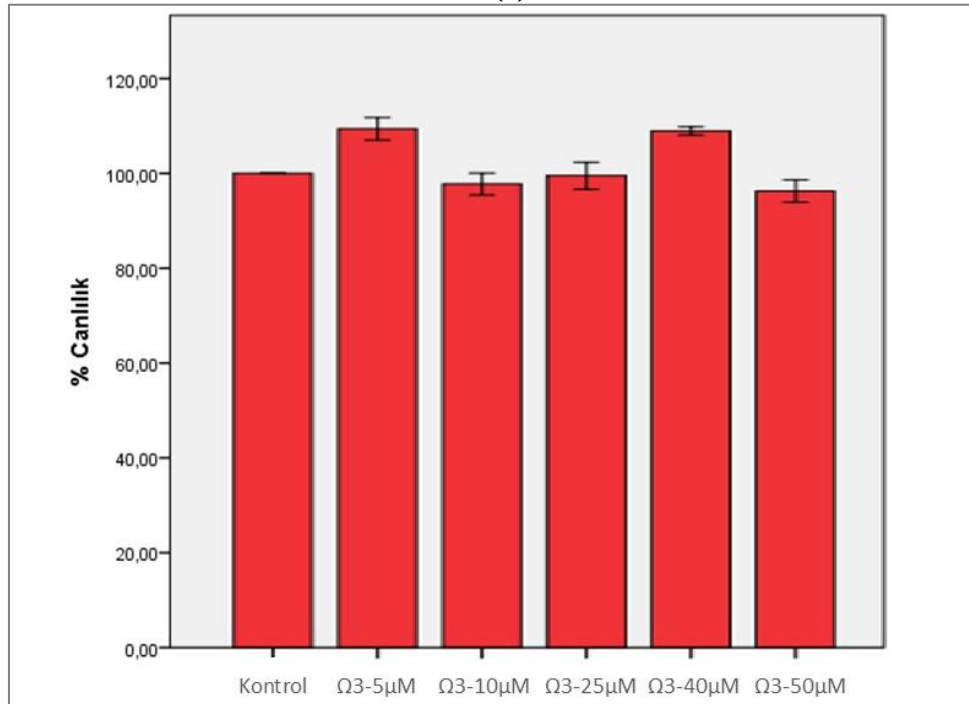
	Ω3-5μM (1)	Ω3-10μM (2)	Ω3-25μM (3)	Ω3-40μM (4)	Ω3-50μM (5)	Test İstatistik	Farkın Kaynağı
N=30	109,40 (2,26)	97,76 (2,18)	99,49 (2,71)	108,93 (0,83)	96,28 (2,26)	$\chi^2=26,428^*$ $p<0,001^{**}$	1-4, 2-3, 2-5 hariç diğerleri; $p<0,001$

*: Kruskal-Wallis test istatistik değeri.

** : İstatistik anlamlılık düzeyi ($p<0,05$).



(a)



(b)

Şekil 4.5. Çeşitli dozlardaki ÇDYA SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı üzerindeki 48 saatlik etkisinin MTT testi sonuçları

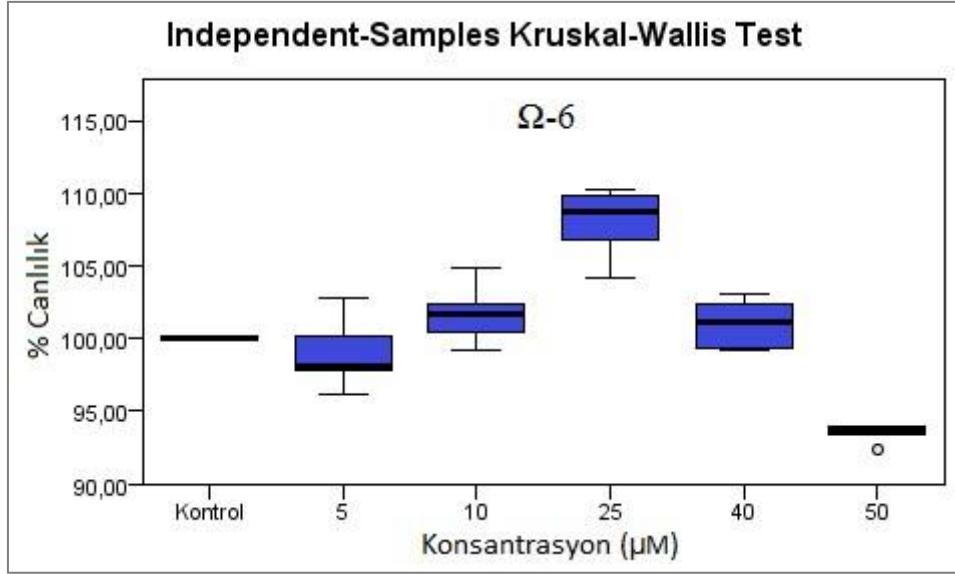
Çizelge 4.4' de 48. saatteki $\Omega 6$ konsantrasyonlarının yer aldığı gruplar ile $\Omega 3$ içermeyen kontrol grubuna ait ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığının değerlendirildiği sonuçlar gösterilmektedir. Grup dağılımları Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($\chi^2=50,110$, $p < 0,001$). Farkın kaynağını bulmak için Conover formülü kullanılmıştır. Kontrol grubu %100 olarak kabul edildiğinde $\Omega 3-50 \mu M$ ve $\Omega 3-10 \mu M$ grupları haricinde diğer gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,001$). (Şekil 4.6)

Çizelge 4.4. Çeşitli dozlardaki $\Omega 6$ -ÇDYA 48 saat uygulama sonucu

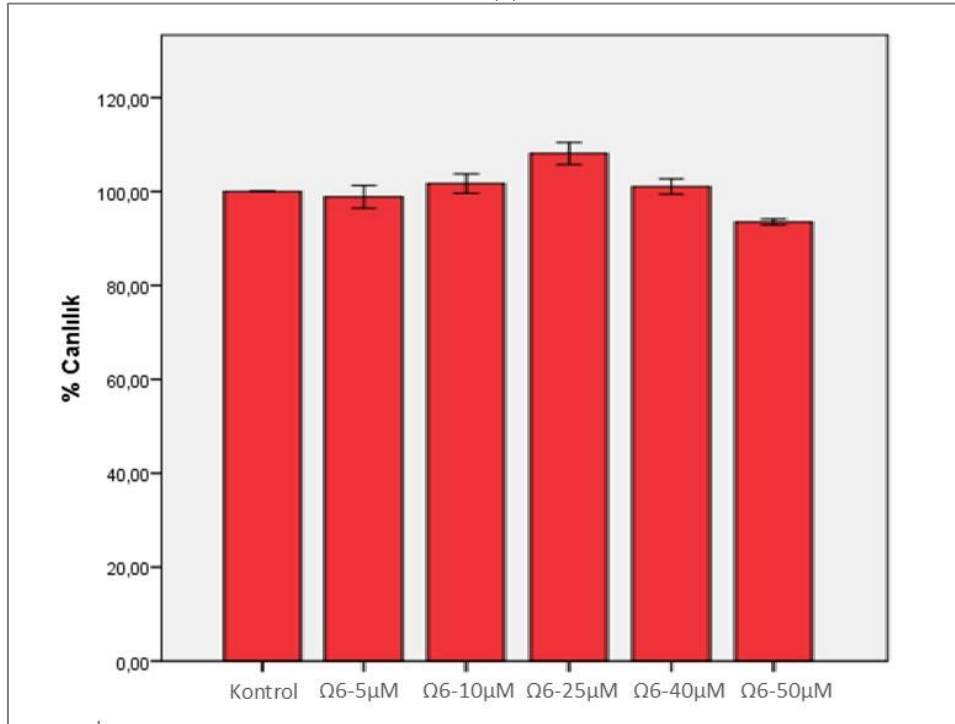
	$\Omega 6-5 \mu M$ (1)	$\Omega 6-10 \mu M$ (2)	$\Omega 6-25 \mu M$ (3)	$\Omega 6-40 \mu M$ (4)	$\Omega 6-50 \mu M$ (5)	Test İstatistik	Farkın Kaynağı
N=30	98,86 (2,32)	101,71 (1,96)	108,10 (2,25)	101,07 (1,56)	93,51 (0,60)	$\chi^2=27,159$ $p < 0,001^{**}$	2-4 hariç diğerleri; $p < 0,001$

*: Kruskal-Wallis test istatistik değeri.

** : İstatistik anlamlılık düzeyi ($p < 0,05$).



(a)



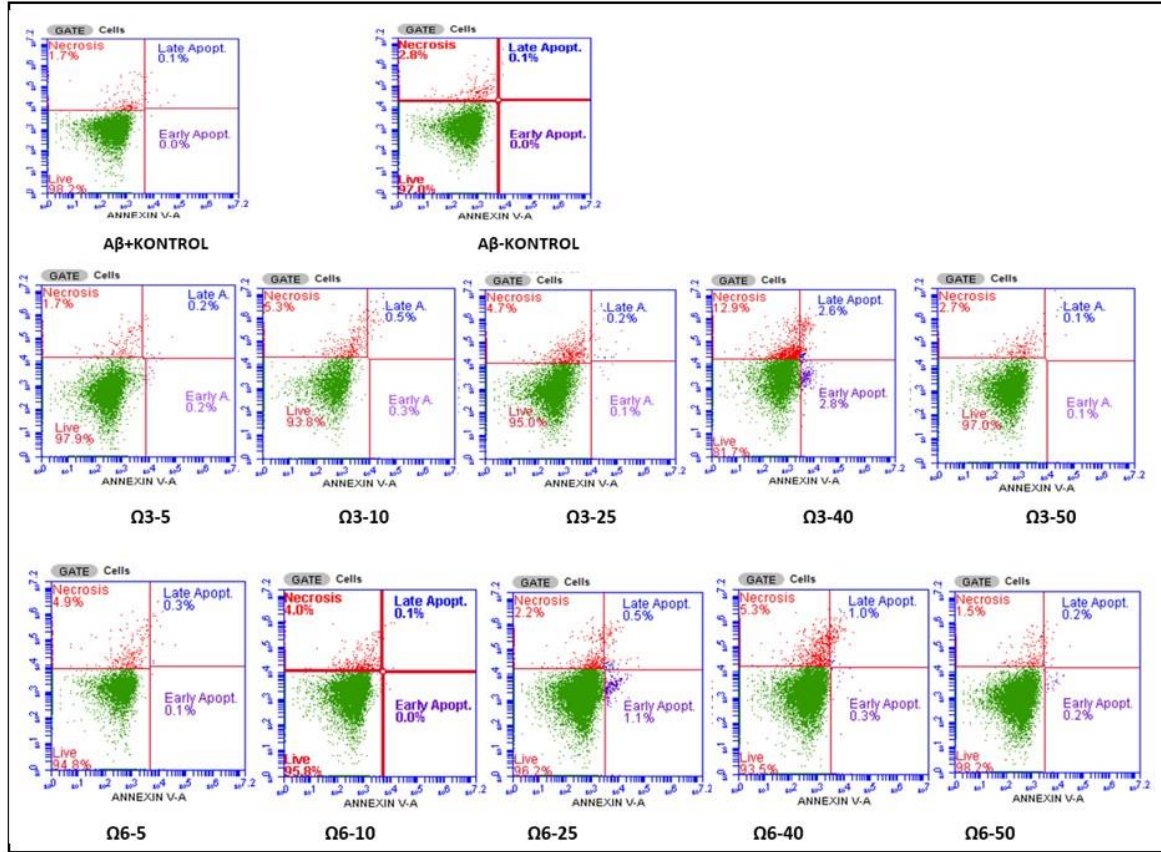
(b)

Şekil 4.6. Çeşitli dozlardaki ÇDYA SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı üzerindeki 48 saatlik etkisinin MTT testi sonuçları

Annexin V sonuçları

Annexin V testi için, 48 saat $A\beta_{1-42}$ uygulanmayan kontrol ($A\beta$ -kontrol) grubunda yaşam değeri % 98,2 iken, 48 saat $A\beta_{1-42}$ uygulanan kontrol ($A\beta$ + kontrol) grubunda yaşam değeri % 97 olarak belirlenmiştir. 24 saat $A\beta_{1-42}$ ve 48 saat çeşitli dozlarda Ω 3 uygulaması sonucunda 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 40 μ M ve 50 μ M' da sırası ile apoptoz değerleri ; %97,9,

%93,9, %95, %81,7 ve %97,1 olarak belirlenmiştir. Yine 24 saat $A\beta_{1-42}$ ve 48 saat çeşitli dozlarda $\Omega 6$ uygulaması sonucunda $5\mu M$, $10\mu M$, $25\mu M$, $40\mu M$ ve $50\mu M$ ’ da sırası ile apoptoz değerleri ; %94,8, %95,8, %96,2, %93,5 ve %98,2 olarak belirlenmiştir. (Şekil 4.7)



Şekil 4.7. Çeşitli dozlardaki $\Omega 3$ ve $\Omega 6$ 48 saat uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SHSY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki hücre canlılığı üzerine etkisinin Annexin V görüntüleri

$\Omega 3$ ve $\Omega 6$ 48 saat uygulamalarının hem MTT testi sonuçları hem de Annexin V analizleri sonuçlarına göre bundan sonraki deneylerde kullanılmak üzere $\Omega 3$ ve $\Omega 6$ dozları $50\mu M$ olarak seçilmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Çeşitli dozlardaki ÇDYA ($\Omega 3$ ve $\Omega 6$) 48 saat uygulamalarının $A\beta 1-42$ ile SHSY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki hücre canlılığı üzerine etkisinin yüzde (%)Apoptoz düzeyleri

Gruplar	% Erken Apoptoz	% Geç Apoptoz	% Ölü	% Canlı
A β - Kontrol	0	0,1	1,7	98,2
A β + Kontrol	0	0,1	2,8	97
$\Omega 3$ -5	0,2	0,2	1,7	97,9
$\Omega 3$ -10	0,3	0,5	5,3	93,8
$\Omega 3$ -25	0,1	0,2	4,7	95
$\Omega 3$ -40	2,8	2,6	12,9	81,7
$\Omega 3$ -50	0,1	0,1	2,7	97,1
$\Omega 6$ -5	0,1	0,3	4,9	94,8
$\Omega 6$ -10	0	0,1	4,0	95,8
$\Omega 6$ -25	1,1	0,5	2,2	96,2
$\Omega 6$ -40	0,3	1,0	5,3	93,5
$\Omega 6$ -50	0,2	0,2	1,5	98,2

4.1.6. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının $A\beta 1-42$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki etkisinin MTT testi sonuçları

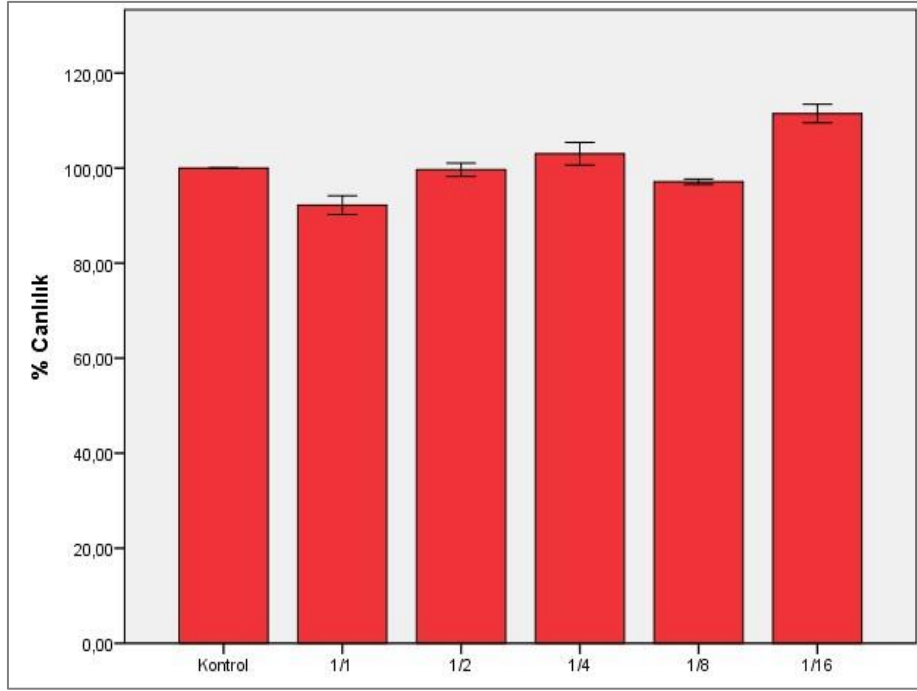
Çizelge 4.6 da 48. Saatte kontrol grubuna göre $\Omega 3/\Omega 6$ oranlarına ait ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığının değerlendirildiği sonuçlar gösterilmektedir. Grup dağılımları Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($\chi^2=27,450$, $p < 0,001$). Farkın kaynağını bulmak için Conover formülü kullanılmıştır. Kontrol grubu %100 olarak kabul edildiğinde 1\1, 1\2 ve 1\8 deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düşüş, 1\4 ve 1\16 gruplarında ise artış görülmektedir ($p < 0,001$). (Şekil 4.8)

Çizelge 4.6. ÇDYA ($\Omega 3$ ve $\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulama sonucu

	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	Test İstatistik
Ort $\pm$ SS	92,19(1,88)	99,66(1,32)	103,02(2,27)	97,11(0,54)	111,47(1,85)	$\chi^2=27,450^*$ $p < 0,001^{**}$

*: Kruskal-Wallis test istatistik değeri.

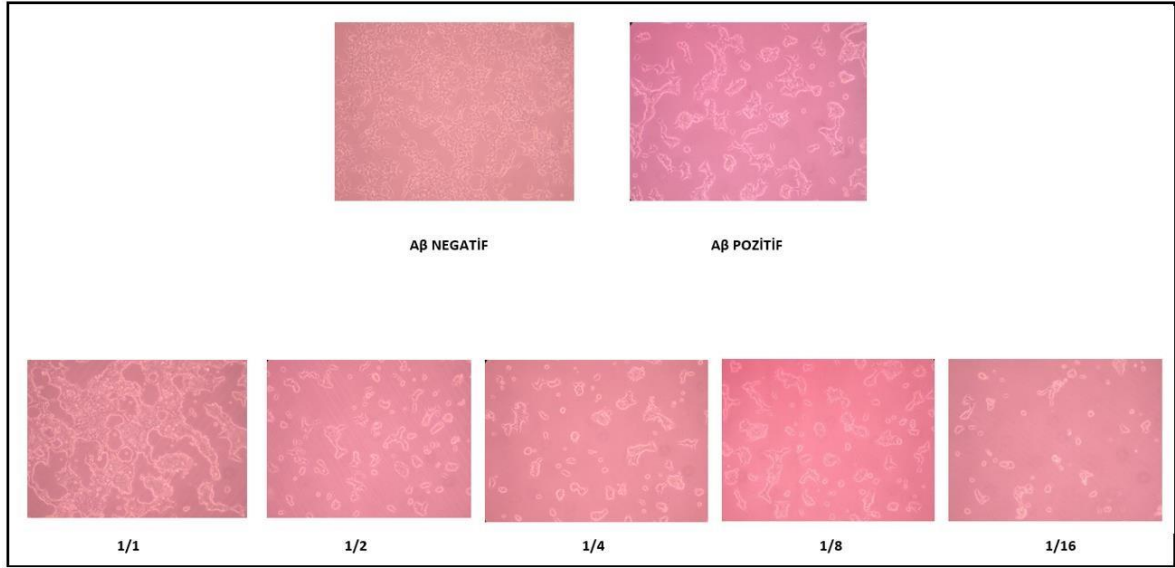
** : İstatistik anlamlılık düzeyi ($p < 0,05$).



Şekil 4.8. Çeşitli oranlardaki ÇDYA SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı üzerindeki 48 saatlik etkisinin MTT testi sonuçları

4.1.7. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı üzerindeki etkisinin inverted mikroskop görüntüsü

24 saat $A\beta_{1-42}$ ve 48 saat çeşitli $\Omega 3/\Omega 6$ oranları uygulaması sonucu hücrelerin inverted mikroskop ((Nikon F12, Japonya) ile görüntüleri alındı. (Şekil 4.9). Elde edilen görüntüler kontrol grupları ile karşılaştırılarak görsel olarak değerlendirildi. $A\beta+$ kontrol görüntüsüne göre 1\1 grubunda hücre sayısının en fazla, 1\16 grubunun ise en düşük olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.9. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı üzerindeki etkisinin inverted mikroskop görüntüsü

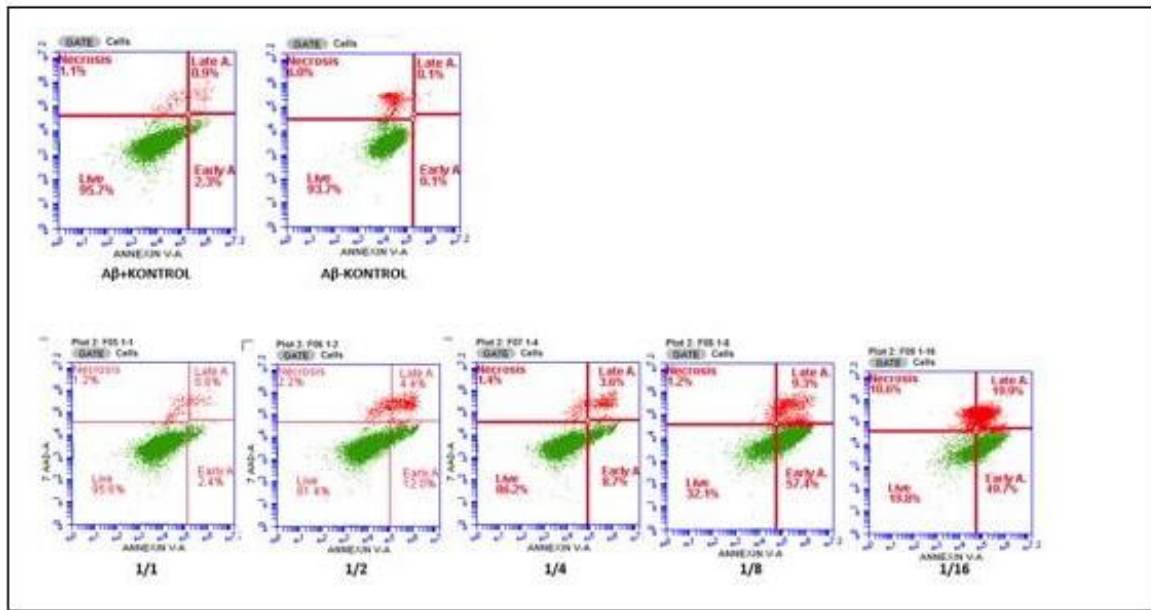
4.2. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) Oranlarının 48 Saat Uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y Hücrelerinde Oluşturulan *In Vitro* AH Modelindeki Akım Sitometri Bulguları

4.2.1. Apoptoz bulguları

Çizelge 4.7 ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki hücre canlılığı üzerine etkisinin yüzde (%) Apoptoz düzeyleri verilmiştir. Anneksin V testi için, 48 saat $A\beta_{1-42}$ uygulanmayan kontrol ($A\beta$ -kontrol) grubunda yaşam değeri %93,7 iken, 48 saat $A\beta_{1-42}$ uygulanan kontrol ($A\beta^+$ kontrol) grubunda yaşam değeri %95,7 olarak belirlenmiştir. 24 saat $A\beta_{1-42}$ ve 48 saat çeşitli $\Omega 3/\Omega 6$ oranlarının uygulaması sonucunda 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16 gruplarında sırası ile apoptoz değerleri; %95,6 %81,4, %86,2, %32,2 ve %19,8 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10).

Çizelge 4.7. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki hücre canlılığı üzerine etkisinin yüzde (%) apoptoz düzeyleri

$\Omega 3/\Omega 6$ Dozları	%Erken Apoptoz	%Geç Apoptoz	%Ölü	%Canlı
$A\beta$ - Kontrol	0,1	0,1	6,0	93,7
$A\beta$ + Kontrol	2,3	0,9	1,1	95,7
1/1	2,4	0,8	1,2	95,6
1/2	12,0	4,4	2,2	81,4
1/4	8,7	3,6	1,4	86,2
1/8	57,4	9,3	1,2	32,2
1/16	49,7	19,9	10,6	19,8



Şekil 4.10. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki hücre canlılığı üzerine etkisinin annexin v analiz görüntüleri

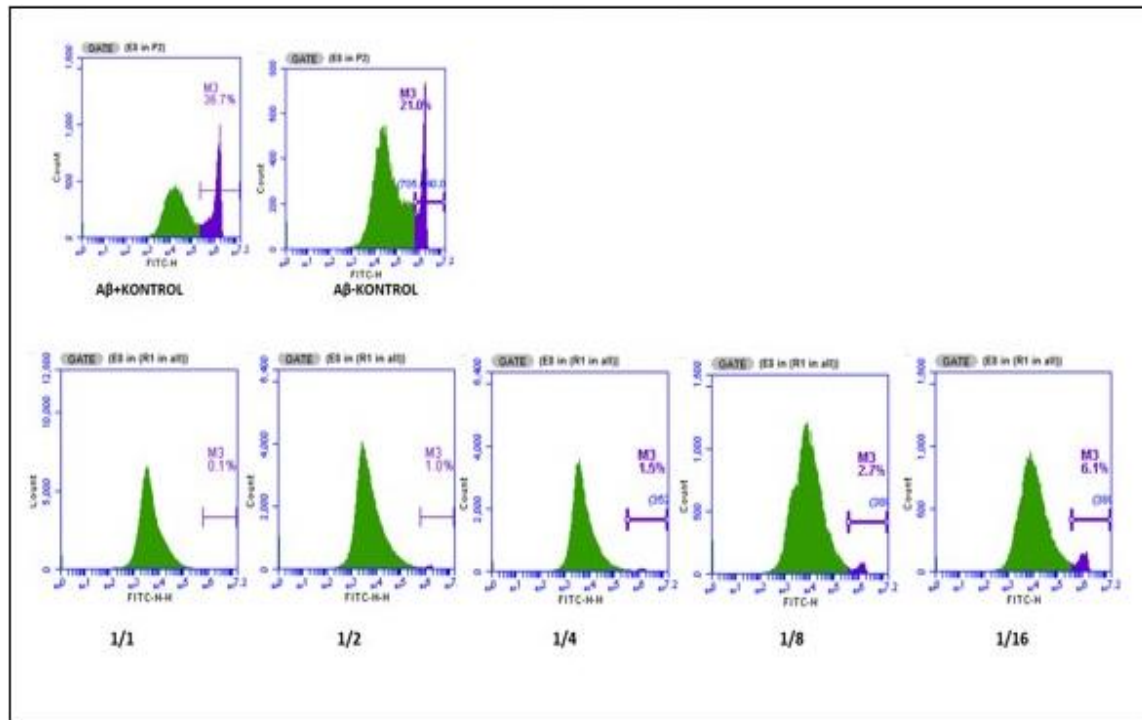
4.2.2. ROT bulguları

Çizelge 4.8 de ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki hücrelerin ROT seviyeleri verilmiştir.

ROT analiz sonuçlarına göre, 48 saat $A\beta_{1-42}$ uygulanmayan kontrol ($A\beta$.kontrol) grubunda ROT seviyesi 21 iken, 48 saat $A\beta_{1-42}$ uygulanan kontrol ($A\beta$ + kontrol) grubunda ROT seviyesi 1,74 kat artarak 36,7 olmuştur. 24 saat $A\beta_{1-42}$ ve 48 saat çeşitli $\Omega 3/\Omega 6$ oranlarının uygulaması sonucunda $A\beta$ + kontrol grubuna göre ROT seviyelerinin 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16 grupları için sırasıyla 367, 36,7, 24,4, 13,5 ve 6 kat azaldığı gösterilmiştir. (Şekil 4.10)

Çizelge 4.8. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* ah modelindeki hücrelerin ROT seviyeleri

Gruplar	% ROT Seviyeleri
$A\beta$ - Kontrol	21
$A\beta$ + Kontrol	36,7
1/1	0,1
1/2	1
1/4	1,5
1/8	2,7
1/16	6,1



Şekil 4.11. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* ah modelindeki hücrelerin ROT seviyeleri analiz görüntüleri

4.2.3. MMP etkisinin bulguları

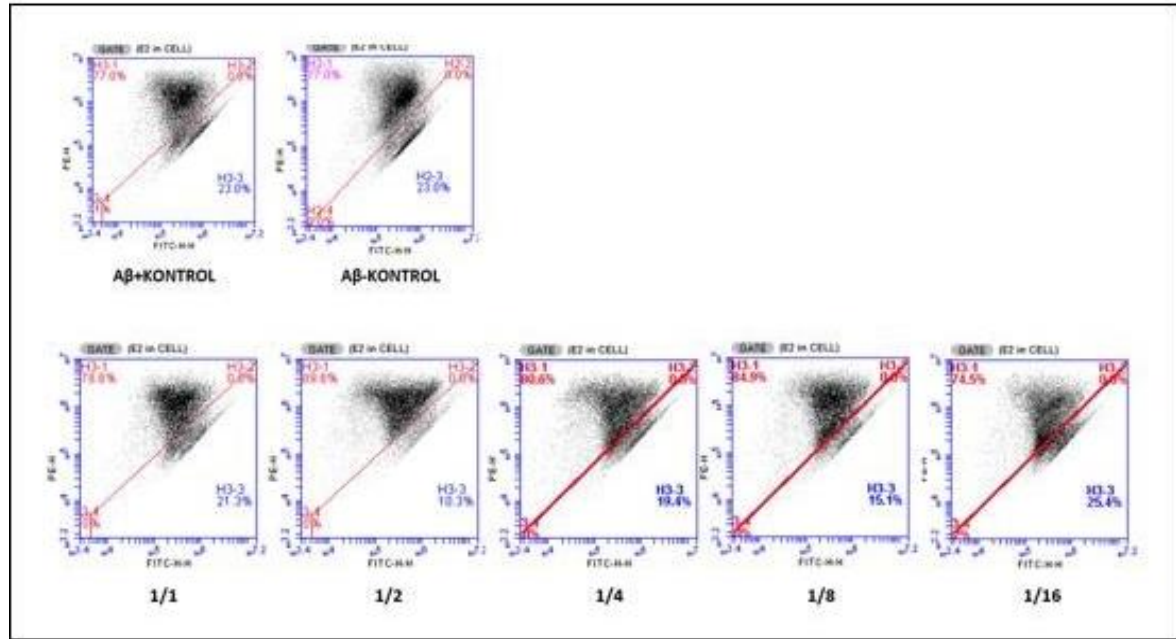
Çizelge 4.9’ da ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki hücrelerin MMP seviyeleri verilmiştir.

MMP analiz sonuçlarına göre, hem 48 saat $A\beta_{1-42}$ uygulanmayan kontrol ($A\beta$ -kontrol) grubunda hem de 48 saat $A\beta_{1-42}$ uygulanan kontrol ($A\beta$ + kontrol) grubunda MMP etkilenen hücrelerin yüzdesi %23 olarak bulunmuştur. 24 saat $A\beta_{1-42}$ ve 48 saat çeşitli $\Omega 3/\Omega 6$

oranlarının uygulaması sonucunda A β + kontrol grubuna göre MMP etkilenen hücrelerin yüzdesi 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16 grupları için sırasıyla %21,3, %10,3, %19,4 %15,1 ve %25,4 olarak hesaplanmıştır. (Şekil 4.12)

Çizelge 4.9. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki hücrelerin MMP seviyeleri

Gruplar	% MMP Seviyeleri
A β - Kontrol	23
A β + Kontrol	23
1/1	21,3
1/2	10,3
1/4	19,4
1/8	15,1
1/16	25,4



Şekil 4.12. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki hücrelerin MMP analiz görüntüleri

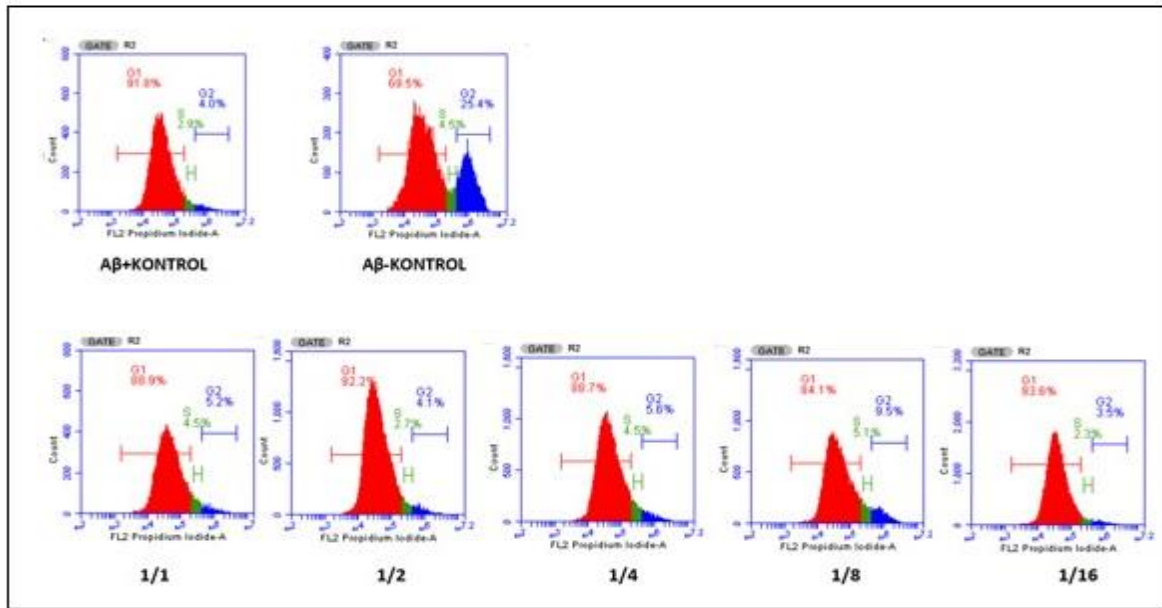
4.2.4. Hücre döngüsü üzerine olan etkisinin bulguları

Çizelge 4.10 da ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki hücrelerin hücre döngüsü analiz sonuçları verilmiştir. Hücre döngüsü analiz görüntülerine göre 1. pik G1, 2. pik G2 ve G1G2 arasındaki bölüm ise S fazını temsil etmektedir. Hücre döngüsünün durması, hücre bölünme döngüsüne devam etmeden önce DNA hasarının onarılmasına izin vermek için hücre

tarafından kullanılan kritik bir araçtır. Çalışmamızda $A\beta_{1-42}$ uygulanmayan kontrol grubunda G1 fazı oranı %69,5 olarak hesaplanırken, $A\beta_{1-42}$ uygulanan kontrol grubunda ise bu oran %92' lere kadar yükselmiştir. Bu sebepten S ve G2 fazlarındaki hücre oranları sırasıyla %4,5' ten %2,9' a ve %25,4' ten %4,0' a düşmüştür. Bu sonuçlar $A\beta_{1-42}$ uygulamasının, G1-S geçişinde hücre döngüsünü durmasının sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. $\Omega 3/\Omega 6$ oranlarının uygulamasının 1/8 deney grubunda S ve G2 fazlarında artışa neden olduğu gözlenmiştir. S fazı %2,9' dan %5,1' e, G2 fazı ise 2 kattan fazla artarak %9,5' e yükselmiştir. Diğer deney gruplarında anlamlı artış görülmemiştir. Bu sonuçlar $A\beta_{1-42}$ uygulamasının sebep olduğu hücre döngüsünün durmasını $\Omega 3/\Omega 6=1/8$ oranı kullanımı ile kısmi de olsa düzeltilebildiğini göstermektedir. (Şekil 4.13)

Çizelge 4.10. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki hücrelerin hücre döngüsü analiz sonuçları

Gruplar	%G1 fazı	%S fazı	% G2 fazı
A β - Kontrol	69,5	4,5	25,2
A β + Kontrol	91,8	2,8	4,0
1/1	88,9	4,5	5,2
1/2	92,2	2,7	2,4,1
1/4	88,7	4,5	5,6
1/8	84,1	5,1	9,5
1/16	93,6	2,3	3,5



Şekil 4.13. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının 48 saat uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki hücrelerin hücre döngüsü analiz görüntüleri

4.3. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) Uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y Hücrelerinde Oluşturulan *In Vitro* AH Modelindeki mRNA Ekspresyonları ve Protein Seviyeleri

RT-PCR yöntemi ile 48 saat ÇDYA maruz bırakılan SHSY-5Y hücrelerinde TNF- α , COX2, IL-6, NF κ B ve TGF β 1 ekspresyon ölçümleri değerlendirilmiştir. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi baz alınarak normalize edilmiştir. Hedef genlerin ekspresyonunu tespit etmek için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi uygulanmıştır.

4.3.1. NF κ B mRNA ekspresyonları ve protein seviyeleri

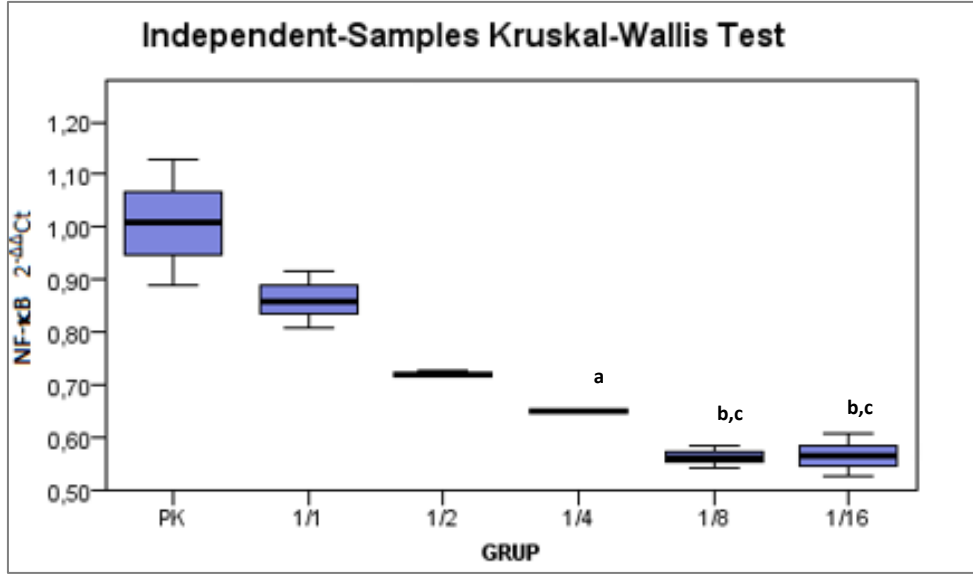
Çizelge 4.11’de kontrol grubuna göre $\Omega 3/\Omega 6$ oranlarına ait ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığının değerlendirildiği sonuçlar gösterilmektedir. Grup dağılımları Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($\chi^2=15,924$, $p < 0,01$). Kontrol grubu 1,00 olarak kabul edildiğinde 1\4, 1\8 ve 1\16 deney gruplarında kontrol grubuna göre (sırasıyla $p < 0,05$, $p < 0,01$ ve $p < 0,01$) istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlenmiştir. 1\8 deney grubunda, 1\1 grubuna göre ($p < 0,05$) ve 1\16 deney grubunda, 1\1 grubuna göre ($p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı düşüş görülmektedir (Şekil 4.14).

Çizelge 4.11. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki NF κ B mRNA ekspresyon seviyeleri

	2 $^{-\Delta\Delta Ct}$						
	PK	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	Test İstatistik
NFKB	1,00	,86	,72	,65	,56	,56	$\chi^2=15,924^*$ $p < 0,007^{**}$

*: Kruskal-Wallis test istatistik değeri.

** : İstatistik anlamlılık düzeyi ($p < 0,05$).



^a $p < 0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

^b $p < 0,01$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

^c $p < 0,05$ 1/1 grubu ile karşılaştırıldığında

Şekil 4.14. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki NF κ B mRNA ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi

NF κ B protein seviyeleri

Çizelge 4.12’de kontrol grubuna göre $\Omega 3/\Omega 6$ oranlarına ait ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığının değerlendirildiği sonuçlar gösterilmektedir. Grup dağılımları Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($\chi^2=14,553$, $p < 0,005$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1/2 deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlenmiştir ($p < 0,05$). 1/1 deney grubu 1/4 deney grubuna göre ($p < 0,05$), 1/2 deney grubu 1/4 deney grubuna göre ($p < 0,05$) ve 1/16 deney grubu 1/4 deney grubuna göre ($p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı düşüş görülmektedir. (Şekil 4.15)

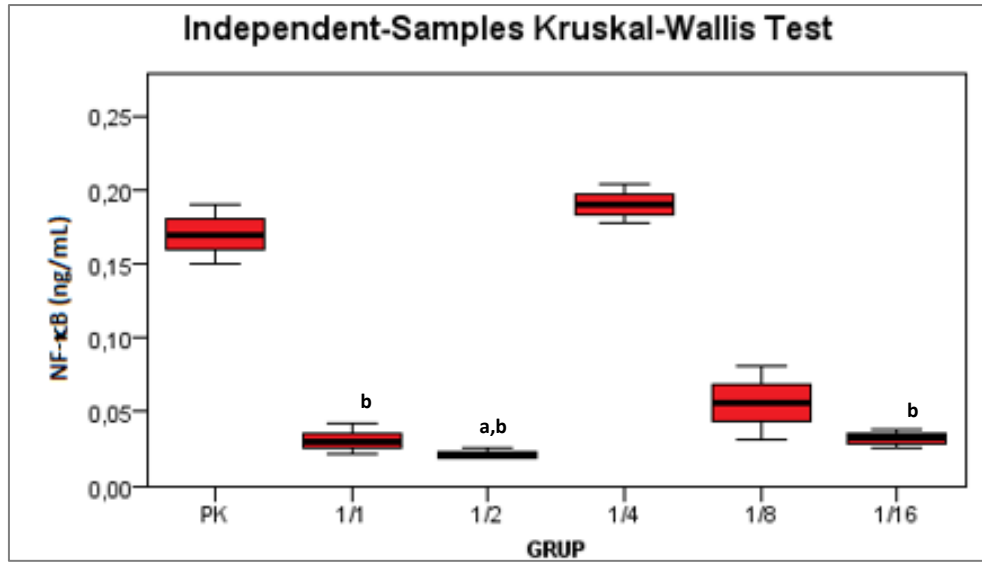
NF κ B’nin mRNA ve protein ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır ($R^2=0,114$, $P=0,654$).

Çizelge 4.12. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki NF κ B protein seviyeleri

	Ortalama (Standart Sapma)						Test İstatistik
	PK	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	
NF κ B PROTEİN (ng/ml)	0,17 (0,03)	0,03 (0,14)	0,02 (0,01)	0,19 (0,02)	0,06 (0,03)	0,03 (0,01)	$\chi^2=14,553^*$ $p<0,01^{**}$

*: Kruskal-Wallis test istatistik değeri.

** : İstatistik anlamlılık düzeyi ($p<0,05$).



^a $p<0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

^b $p<0,05$ 1/4 grubu ile karşılaştırıldığında

Şekil 4.15. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki NF κ B protein seviyeleri arasındaki farklılığı gösteren KruskalWallis testi

4.3.2. TNF- α mRNA ekspresyonları ve protein seviyeleri

TNF- α mRNA ekspresyonları

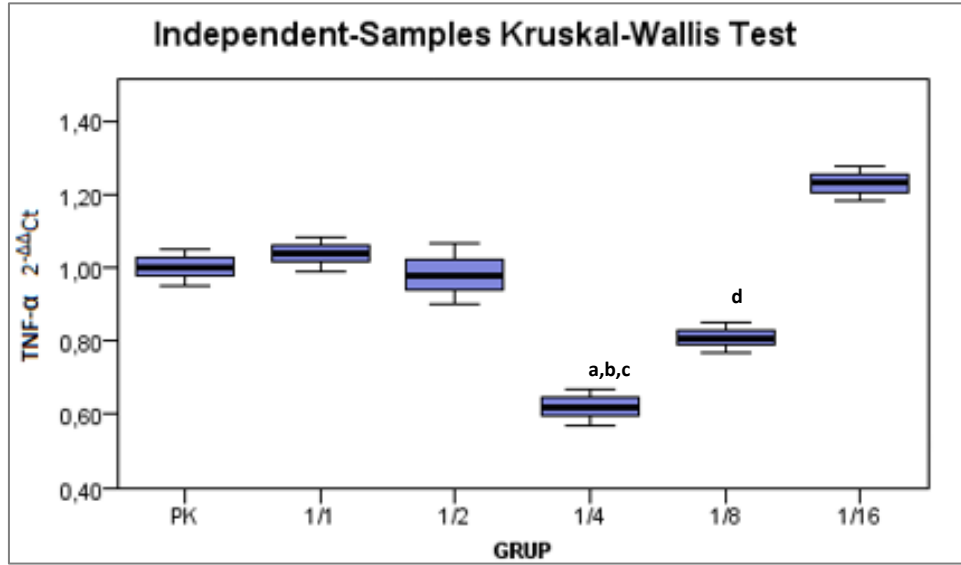
Çizelge 4.13’de kontrol grubuna göre $\Omega 3/\Omega 6$ oranlarına ait ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığının değerlendirildiği sonuçlar gösterilmektedir. Grup dağılımları Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($\chi^2=14,988$, $p < 0,01$). Kontrol grubu 1,00 olarak kabul edildiğinde 1\4 deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$). 1\4 deney grubunda, 1\1 ve 1\16 gruplarına göre (sırasıyla $p < 0,05$ ve $p<0,001$) ve 1\8 deney grubunda, 1\16 grubuna göre ($p<0,01$) istatistiksel olarak anlamlı düşüş görülmektedir. (Şekil 4.16)

Çizelge 4.13. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki TNF- α mRNA ekspresyon seviyeleri

	2 - $\Delta\Delta Ct$						
	PK	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	Test İstatistik
TNF α	1,00	1,04	,98	,62	,81	1,23	$\chi^2=14,988^*$ $p<0,01^{**}$

*: Kruskal-Wallis test istatistik değeri.

** : İstatistik anlamlılık düzeyi ($p<0,05$).



^a $p<0,05$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

^b $p<0,05$ 1/1 grubu ile karşılaştırıldığında

^c $p<0,001$ 1/16 grubu ile karşılaştırıldığında

^d $p<0,01$ 1/16 grubu ile karşılaştırıldığında

Şekil 4.16. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki TNF- α mRNA ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi

TNF- α protein seviyeleri

Çizelge 4.14'de kontrol grubuna göre $\Omega 3/\Omega 6$ oranlarına ait ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığının değerlendirildiği sonuçlar gösterilmektedir. Grup dağılımları Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($\chi^2=16,392$, $p<0,005$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1/2 ve 1/4 deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$, $p<0,01$). 1/4 deney grubunda 1/1 ve 1/16 gruplarına göre (sırasıyla $p<0,05$ ve $p<0,001$) ve 1/8 deney grubunda 1/16 grubuna göre ($p<0,05$) ve 1/2 deney grubunda 1/16 grubuna göre ($p<0,01$) istatistiksel olarak anlamlı düşüş görülmektedir. (Şekil 4.17)

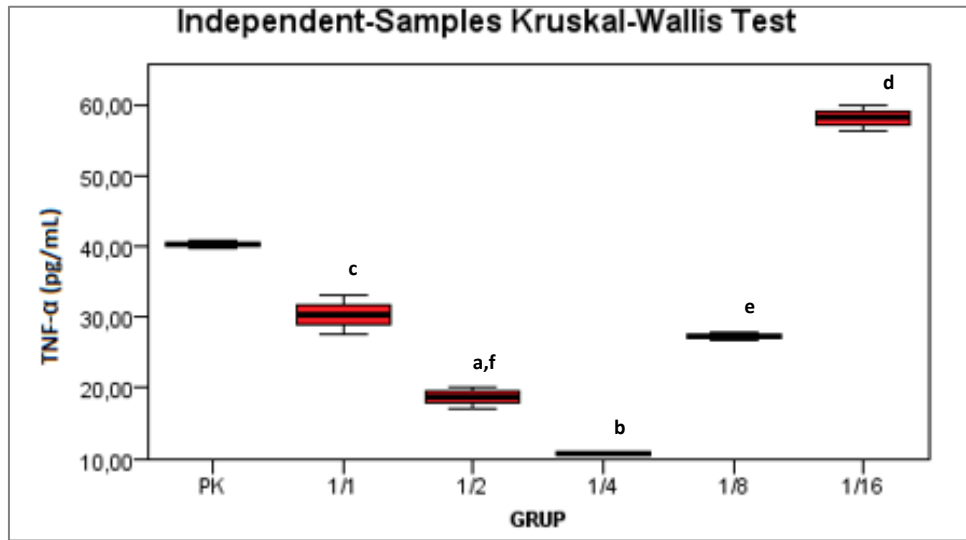
TNF- α mRNA ve protein ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmuştur ($R^2=0,794$, $P=0,001$).

Çizelge 4.14. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki TNF- α protein seviyeleri

	Ortalama (Standart Sapma)					
	PK	1/1	1/2 1/4	1/8	1/16	Test İstatistik
TNF α PROTEİN (pg/ml)	40,27 (0,94)	30,39 (3,83)	18,70 10,81 (2,13) (0,17)	27,31 (0,68)	58,16 (2,56)	$\chi^2=16,39^*$ $p<0,006^{**}$

*: Kruskal-Wallis test istatistik değeri.

** : İstatistik anlamlılık düzeyi ($p<0,05$).



^a $p<0,01$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

^b $p<0,05$ 1/4 grubu ile karşılaştırıldığında

^c $p<0,05$ 1/2 grubu ile karşılaştırıldığında

^d $p<0,001$ 1/4 grubu ile karşılaştırıldığında

^e $p<0,01$ 1/8 grubu ile karşılaştırıldığında

^f $p<0,01$ 1/16 grubu ile karşılaştırıldığında

Şekil 4.17. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki TNF- α protein seviyeleri arasındaki farklılığı gösteren Kruskal Wallis testi

4.3.3. IL-6 mRNA ekspresyonları ve protein seviyeleri

IL-6 mRNA ekspresyonları

Çizelge 4.15’de kontrol grubuna göre $\Omega 3/\Omega 6$ oranlarına ait ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığının değerlendirildiği sonuçlar gösterilmektedir. Grup dağılımları Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($\chi^2=15,456$, $p < 0,01$). Kontrol grubu 1,00 olarak kabul edildiğinde 1/4 deney

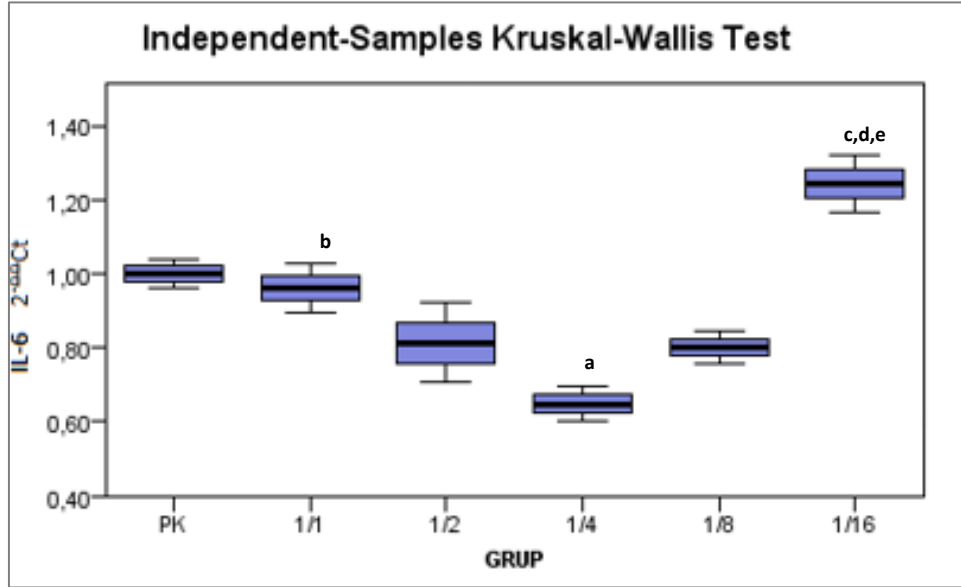
grubunda istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlenmiştir ($p<0,01$). 1\4 deney grubunda, 1\1 ve 1\16 gruplarına göre (sırasıyla $p<0,05$ ve $p<0,001$) ve 1\8 deney grubunda, 1\16 grubuna göre ($p<0,05$) ve 1\2 deney grubunda 1\16 grubuna göre ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı düşüş görülmektedir. (Şekil 4.18)

Çizelge 4.15. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki IL-6 mRNA ekspresyon seviyeleri

	2 ^{-ΔΔCt}						Test İstatistik
	PK	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	
IL6	1,00	,96	,81	,65	,80	1,24	$\chi^2=15,456^*$ $p<0,01^{**}$

*: Kruskal-Wallis test istatistik değeri.

** : İstatistik anlamlılık düzeyi ($p<0,05$).



^a $p<0,01$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

^b $p<0,05$ 1/4 grubu ile karşılaştırıldığında

^c $p<0,05$ 1/2 grubu ile karşılaştırıldığında

^d $p<0,001$ 1/4 grubu ile karşılaştırıldığında

^e $p<0,05$ 1/8 grubu ile karşılaştırıldığında

Şekil 4.18. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki IL-6 mRNA ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi

IL-6 protein seviyeleri

Çizelge 4.16'da kontrol grubuna göre $\Omega 3/\Omega 6$ oranlarına ait ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığının değerlendirildiği sonuçlar gösterilmektedir. Grup dağılımları Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($\chi^2=16,579$, $p<0,005$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1/2 ve 1/4 deney

gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$, $p<0,01$). 1/4 deney grubunda 1/1 ve 1/16 gruplarına göre (sırasıyla $p<0,05$ ve $p<0,001$) ve 1/8 deney grubunda 1/16 grubuna göre ($p<0,05$) ve 1/2 deney grubunda 1/16 grubuna göre ($p<0,01$) istatistiksel olarak anlamlı düşüş görülmektedir. (Şekil 4.19)

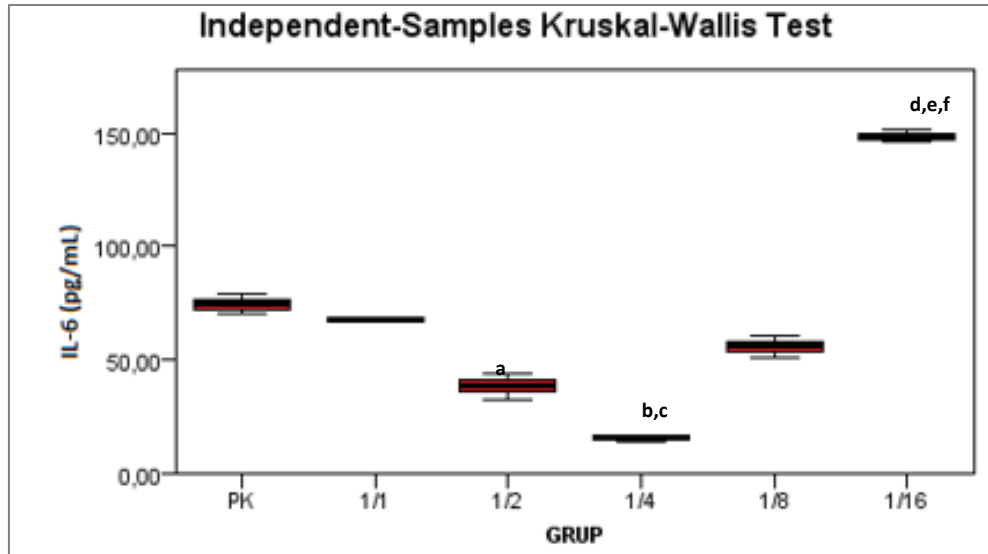
IL6 mRNA ve protein ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmuştur ($R^2=0,930^{**}$, $P=0,001$)

Çizelge 4.16. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki IL-6 protein seviyeleri

	Ortalama (Standart Sapma)						Test İstatistik
	PK	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	
IL-6 Protein (pg/ml)	74,55 (6,35)	67,37 (0,13)	38,20 (7,59)	15,24 (1,83)	55,98 (6,94)	148,76 (3,53)	$\chi^2=16,57^*$ $p<0,005^{**}$

*: Kruskal-Wallis test istatistik değeri.

** : İstatistik anlamlılık düzeyi ($p<0,05$).



^a $p<0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

^b $p<0,01$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

^c $p<0,05$ 1/1 grubu ile karşılaştırıldığında

^d $p<0,01$ 1/2 grubu ile karşılaştırıldığında

^e $p<0,001$ 1/4 grubu ile karşılaştırıldığında

^f $p<0,05$ 1/8 grubu ile karşılaştırıldığında

Şekil 4.19. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki IL-6 protein seviyeleri arasındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi

4.3.4. COX-2 mRNA ekspresyonları ve protein seviyeleri

COX-2 mRNA Ekspresyonları

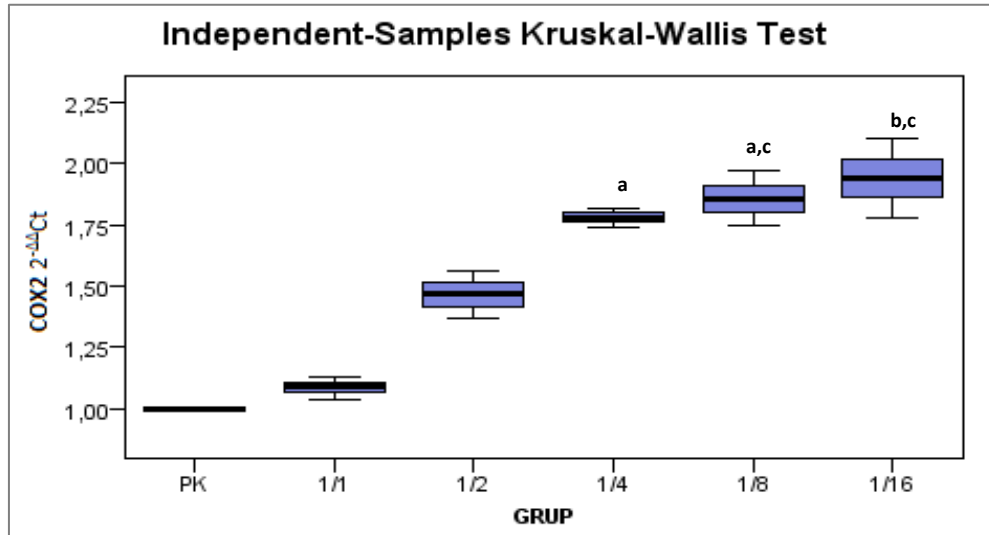
Çizelge 4.17 de kontrol grubuna göre $\Omega 3/\Omega 6$ oranlarına ait ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığının değerlendirildiği sonuçlar gösterilmektedir. Grup dağılımları Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($\chi^2=15,175$, $p < 0,01$). Kontrol grubu 1,00 olarak kabul edildiğinde 1/4, 1/8 ve 1/16 deney gruplarında kontrol grubuna göre (sırasıyla $p < 0,05$, $p < 0,05$ ve $p < 0,01$) istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir. 1/1 deney grubunda, 1/8 ve 1/16 gruplarına göre (sırasıyla $p < 0,05$ ve $p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı düşüş görülmektedir. (Şekil 4.20)

Çizelge 4.17. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki COX-2 mRNA ekspresyon seviyeleri

	2 ^{-ΔΔCt}	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	Test İstatistik
COX-2	1,00	1,08	1,4	1,8	1,8	1,9	$\chi^2=15,175^*$ $p < 0,01^{**}$

*: Kruskal-Wallis test istatistik değeri.

**: İstatistik anlamlılık düzeyi ($p < 0,05$).



^a $p < 0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

^b $p < 0,01$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

^c $p < 0,05$ 1/1 grubu ile karşılaştırıldığında

Şekil 4.20. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) uygulamalarının A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki COX-2 mRNA ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi

COX-2 protein seviyeleri

Çizelge 4.18’de kontrol grubuna göre $\Omega 3/\Omega 6$ oranlarına ait ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığının değerlendirildiği sonuçlar gösterilmektedir. Grup dağılımları Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($\chi^2=16,028$, $p < 0,005$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1/8 deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir ($p < 0,01$). 1/4 deney grubunda 1/8 grubuna göre ($p < 0,05$) ve 1\16 deney grubunda 1/1, 1/2 ve 1/8 deney gruplarına göre (sırasıyla $p < 0,01$, $p < 0,05$, $p < 0,001$) istatistiksel olarak anlamlı düşüş görülmektedir. (Şekil 4.21)

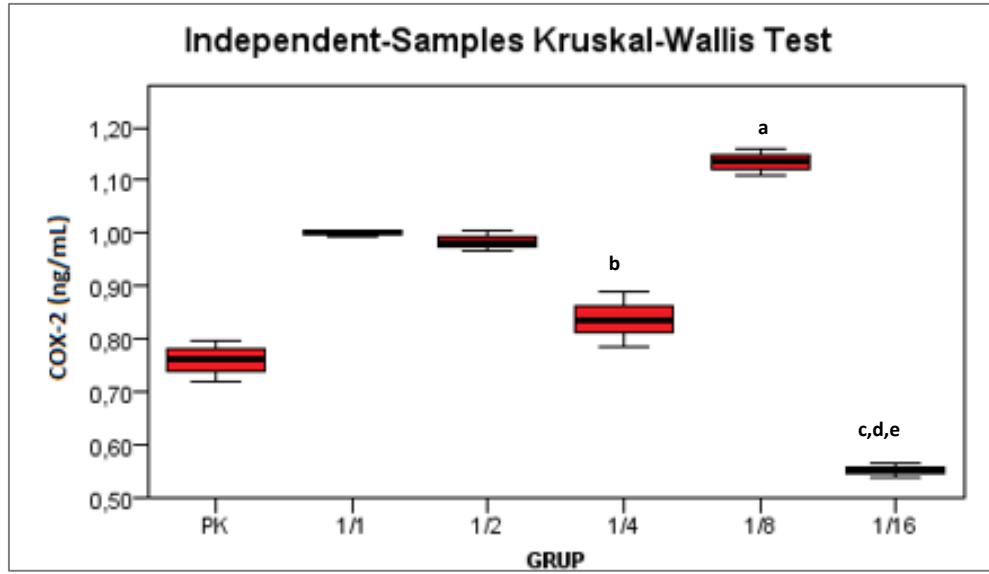
COX-2 mRNA ve protein ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır ($R^2=-0,029$, $P=0,909$).

Çizelge 4.18. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının A β 1-42 ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki COX-2 protein seviyeleri

	Ortalama (Standart Sapma)						Test İstatistik
	PK	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	
COX-2	0,76 (0,05)	1,00 (0,01)	0,99 (0,03)	0,84 (0,07)	1,13 (0,37)	0,55 (0,02)	$\chi^2=16,028^*$ $p < 0,007^{**}$

*: Kruskal-Wallis test istatistik değeri.

** : İstatistik anlamlılık düzeyi ($p < 0,05$).



^a $p < 0,01$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

^b $p < 0,05$ 1/8 grubu ile karşılaştırıldığında

^c $p < 0,01$ 1/1 grubu ile karşılaştırıldığında

^d $p < 0,05$ 1/2 grubu ile karşılaştırıldığında

^e $p < 0,001$ 1/8 grubu ile karşılaştırıldığında

Şekil 4.21. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki COX-2 protein seviyeleri arasındaki farklılığı gösteren KruskalWallis testi

4.3.5. TGF β 1 mRNA ekspresyonları ve protein seviyeleri

TGF β 1 mRNA Ekspresyonları

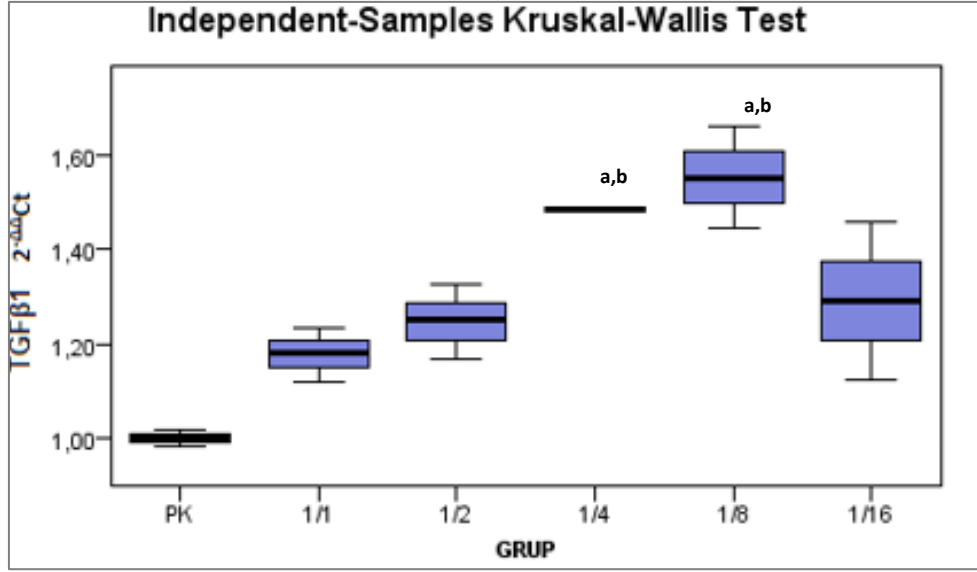
Çizelge 4.19’da kontrol grubuna göre $\Omega 3/\Omega 6$ oranlarına ait ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığının değerlendirildiği sonuçlar gösterilmektedir. Grup dağılımları Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($\chi^2=14,240$, $p < 0,01$). Kontrol grubu 1,00 olarak kabul edildiğinde 1/4 ve 1/8 deney gruplarında kontrol grubuna göre ($p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir. 1/1 deney grubunda, 1/4 ve 1/8 deney gruplarına göre ($p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı düşüş görülmektedir. (Şekil 4.22)

Çizelge 4.19. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki TGF β 1 mRNA ekspresyon seviyeleri

	2 - $\Delta\Delta C_t$						
	PK	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	Test İstatistik
TGF β 1	1,00	1,17	1,24	1,48	1,55	1,29	$\chi^2=14,240^*$ $p < 0,014^{**}$

*: Kruskal-Wallis test istatistik değeri.

** : İstatistik anlamlılık düzeyi ($p < 0,05$).



^a $p < 0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

^b $p < 0,05$ 1/1 grubu ile karşılaştırıldığında

Şekil 4.22. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) uygulamalarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki TGF $\beta 1$ mRNA ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi

TGF $\beta 1$ protein seviyeleri

Çizelge 4.20’de kontrol grubuna göre $\Omega 3/\Omega 6$ oranlarına ait ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığının değerlendirildiği sonuçlar gösterilmektedir. Grup dağılımları Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($\chi^2=15,700$, $p < 0,005$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1/4 ve 1/16 deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir ($p < 0,05$, $p < 0,01$). 1/1 deney grubunda 1/4 ve 1/16 gruplarına göre (sırasıyla $p < 0,05$ ve $p < 0,01$) ve 1/8 deney grubunda 1/16 grubuna göre ($p < 0,05$) anlamlı düşüş görülmektedir. (Şekil 4.23)

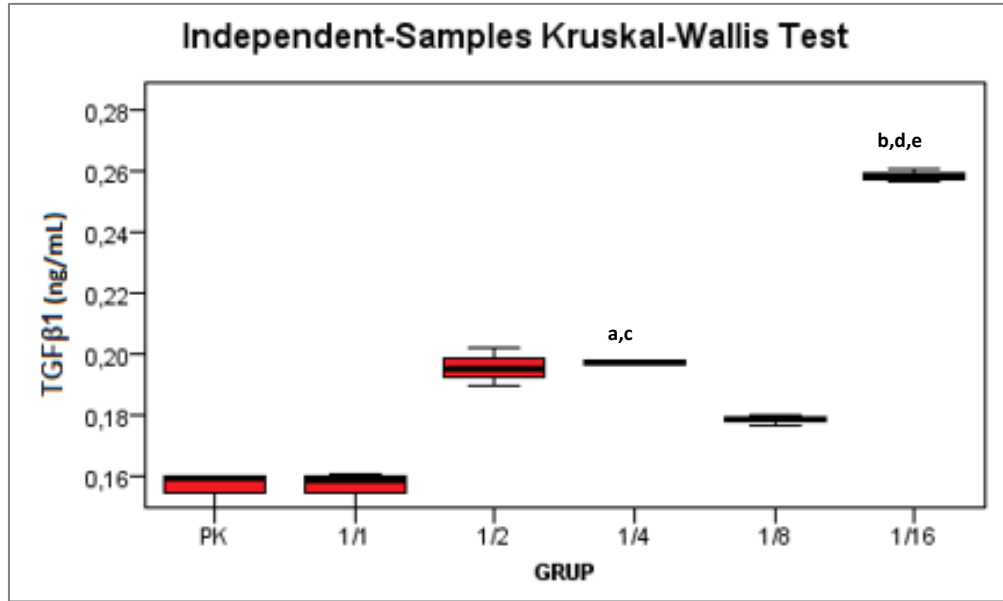
TGF $\beta 1$ mRNA ve protein ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır ($R^2=0,450$, $P=0,061$).

Çizelge 4.20. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki TGF $\beta 1$ protein seviyeleri

	Ortalama (Standart Sapma)						
	PK	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	Test İstatistik
TGF $\beta 1$ PROTEİN	0,16	0,16	0,20	0,20	0,18	0,26	$\chi^2=15,70^*$
ng/ml	(0,00)	(0,00)	(0,01)	(0,00)	(0,00)	(0,00)	$p < 0,008^{**}$

*: Kruskal-Wallis test istatistik değeri.

** : İstatistik anlamlılık düzeyi ($p < 0,05$).



^a $p < 0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

^b $p < 0,01$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

^c $p < 0,05$ 1/1 grubu ile karşılaştırıldığında

^d $p < 0,01$ 1/1 grubu ile karşılaştırıldığında

^e $p < 0,05$ 1/8 grubu ile karşılaştırıldığında

Şekil 4.23. ÇDYA ($\Omega 3/\Omega 6$) oranlarının $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan in vitro AH modelindeki TGF $\beta 1$ protein seviyeleri arasındaki farklılığı gösteren Kruskal Wallis testi

5. TARTIŞMA

Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Multipl Skleroz ve Amyotrofik Lateral Skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklar, hastalar, aileleri ve sağlık sistemleri için önemli zorluklar teşkil etmektedir [26]. Bu hastalıkların mekanizmalarında genetik faktörler önemli rol oynamasına rağmen, son araştırmalar diyet ve yaşam tarzı da dahil olmak üzere çevresel faktörlerin bu hastalıkların gelişimindeki rolüne ışık tutmuştur [129, 130]. ÇDYA' nın hücre zarında membran akışkanlığını, geçirgenliğini ve membran protein fonksiyonunu etkileyerek büyük bir rol oynadığı gösterilmiştir [131]. Nörodejeneratif hastalıklarda bu etkiler, inflamasyonda kritik oyuncular olan nöronları ve mikrogial hücreleri etkileyebileceğinden heyecan verici sonuçlara sahiptir. Ayrıca ÇDYA pro-inflamatuar sitokinlerin ve serbest radikallerin azaltılmasıyla da ilişkilendirilmektedir. Yapılan çalışmalar ÇDYA'nın bu özellikleriyle nöroinflamasyon ile karakterize nörodejeneratif hastalıklarda potansiyel bir terapötik rol oynayabileceğini göstermektedir [132].

Çalışmamızda insan SH-SY5Y hücrelerinin 72 saat $A\beta_{1-42}$ ile inkübasyonu sonunda oksidatif stres ve apoptoz kaynaklı *in vitro* AH modeli oluşturulması amaçlanmıştır. $A\beta_{1-42}$ ile oluşturulan sitotoksik AH için geçerli *in vitro* nörodejenerasyon modellerinden biridir [133]. $A\beta_{1-42}$ 'nin hücre içi ROT seviyelerini artırarak oksidatif stresi indüklediği, mitokondri membran potansiyelini etkilediğini ve apoptotik hücrelerin yüzdesini arttırdığı çeşitli çalışmalarda da gösterilmiştir [134-136]. $A\beta$ ' nın birikmesi mikrogia aktivasyonuna, astrositlerin toplanmasına ve proinflamatuar sitokinlerin sürekli üretimine neden olur. Bu sitokinler $A\beta$ üretimini ve amiloid oluşumunu hızlandırır, böylece bir inflamasyon ve amiloidogenez döngüsünü başlatır [137]. $A\beta_{1-42}$ ile insan SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki hücre kültürüne ÇDYA uygulaması sonrasında hücre canlılığı doza bağımlı olarak tepki vermektedir. Literatürde $A\beta_{1-42}$ ' nin 2 μ M ve 0-50 μ M dozlarının 48 saat SH-SY5Y hücrelerine uygulanması sonucu sitotoksik etki gösterdiğinin belirtildiği çalışmalar mevcuttur [138, 139]. $A\beta_{1-42}$ ' nin artan dozlarında SH-SY5Y hücrelerinin sitotoksik etkisinin arttığı, buna bağlı olarak da hücre canlılığının azaldığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda $A\beta_{1-42}$ ' nin insan SH-SY5Y hücreleri üzerinde AH modeli oluşturabilecek fakat yüksek oranlarda sitotoksik etkisi olmayan konsantrasyonu 100 μ M olarak bulunmuştur.

AH, MSS kolinerjik nöronlarının erken dejenerasyonu ile ilerleyen bir hastalıktır [173]. AChE enzimi, nörotransmitter asetilkolinin hidrolizinde kilit bir enzimdir. AH tedavisi için klinik olarak kullanılan mevcut ilaçların çoğu AChE enzimi hedeflidir ve AH'deki terapötik hedeflerden birisi de kolinerjik sistemdir [174, 175]. *İn vitro* AH modelinde ÇDYA'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi çalışılmıştır. AChE inhibitörleri, AChE enzim aktivitesini inhibe ederek asetilkolinin yıkımını önler. Bu sebeplerden dolayı hem *in vitro* AH modelinin oluşumunu göstermek hem de ÇDYA uygulamalarının enzim aktivitesi üzerindeki inhibitör etkilerinin belirlenmesi önem taşımaktadır. A β_{1-42} uygulaması, AChE protein miktarını kontrol grubuna göre arttırmıştır. Diğer yandan, tüm ÇDYA uygulamalarının inhibitör etkileri olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1/4, 1/8 ve 1/16 deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlenmiştir.

İn vitro AH modelindeki ÇDYA uygulamaları için EPA'nın 5, 10, 25, 40 ve 50 μ M dozları ile LA 5, 10, 25, 40 ve 50 μ M dozlarının 48 saat boyunca uygulanması sonunda yapılan MTT testi ve Apoptoz (AnnexinV) analizi sonuçları birlikte değerlendirilmiş ve çalışma için $\Omega 3$ ve $\Omega 6$ 'nın ideal dozları 50 μ M olarak belirlenmiştir. Literatürde farklı bir insan nöroblastoma hücre hattıyla yapılan bir çalışmada $\Omega 3$ EPA'nın antiproliferatif dozu 35 μ M olarak bulunmuştur [122]. İnsan SH-SY5Y hücre hattıyla yapılan çalışmalarda $\Omega 3$ olarak DHA'nın 12,5 μ M dozu kullanılırken başka bir çalışma da ise EPA ve ALA'nın 30 μ M dozu kullanılmıştır. Yine başka bir *in vitro* çalışmada SH-SY5Y hücre hattına EPA uygulamasında doz 50 μ M olarak seçilmiştir [140-142]. Sonuncudan farklı olarak çalışmamız, A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelidir ve bu modelde ÇDYA uygulamaları ile $\Omega 3$ ve $\Omega 6$ oranlarının kullanıldığı bir çalışma bulunamamıştır.

$\Omega 6$ yağ asitleri proinflamatuvar sitokin üretimini artırarak inflamasyona katkıda bulunurken, $\Omega 3$ yağ asitlerinin anti-inflamatuvar sitokin üretimini artırarak inflamasyonu azalttığı bilinmektedir. Bir çalışmada, 60 yaşın üzerindeki kişilerde haftalık düzenli alınan $\Omega 3$ içeren balık yağlarının CRP ve IL-6 salınımını azaltarak inflamasyonu engellediğini ve insülin duyarlılığını iyileştirdiğini ortaya konmuştur [117]. $\Omega 6/\Omega 3$ oranları ile yapılan bir çalışmada, metabolik sendromu olan erkeklerin, oral yağ tolerans testine verdikleri tepkiler incelenmiş, hastalar yüksek $\Omega 6/\Omega 3$ (18/1) ve düşük $\Omega 6/\Omega 3$ oranına (3/1) sahip iki gruba alınmıştır. $\Omega 6/\Omega 3$ oranının azaltılmasının, proinflamatuvar sitokin IL-6'nın 6. ve 8. saatlerde daha düşük salınmasına neden olduğu bulunmuştur [118]. Başka bir çalışma ise yalnızca 4

gün boyunca LA'nın izokalorik olarak ALA ile değiştirilmesinin, çözünür IL-6 reseptöründe azalmaya neden olduğunu göstermektedir [119]. Tüm bu çalışmalar, $\Omega 6$ 'nın $\Omega 3$ ile değiştirilmesinin inflamasyonu azalttığını ortaya koymaktadır. Yapılan bir hayvan çalışmasında farelerin hipokampusundeki $\Omega 6/\Omega 3$ değişim oranları incelenmiştir. Yağ asitlerinin beyinin belirli bir bölgesi üzerine etkisi araştırılmış olup, $\Omega 3$ yağ asitlerinin olumlu etkisi ortaya konmuştur [120].

$\Omega 3$ yağ asitlerinden EPA ile yapılan çalışmalar anti-proliferatif ve anti-inflamatuar etkilerini ortaya koymaktadır [25, 143-145]. $\Omega 3$ EPA'nın, nöronal dokuda, nöronal fonksiyonda yaşa bağlı bozulmayla ilişkili olan IL-1'in etkilerini bloke ederek antiinflamatuar bir ajan görevi gördüğü belirtilmiştir [146]. $\Omega 3$ yağ asitleri, nöroinflamasyonun potansiyel modülatörlerinden biridir ve nöroinflamasyonu azaltarak amiloid yükünü ve tau hiperfosforilasyonunu azaltırlar [147, 148]. BV-2 mikrogial hücreleriyle yapılan *in vitro* bir çalışma, $\Omega 3$ uygulamasının, indüklenabilir NO sentaz (iNOS), COX-2 gibi proinflamatuvar faktörlerin ekspresyonunu azalttığını göstermiştir. $\Omega 3$ uygulaması ayrıca, IL-1 β , IL-6, TNF- α ve NF κ B'yi etkileyerek inflamatuvar yanıtın başlatılmasında rol oynayan CD14 proteini ve Toll benzeri reseptör 4 reseptörlerinin hücre yüzeyi ekspresyonunu da azaltmaktadır [68]. Yapılan deneysel bir hayvan çalışmasında farelerin diyetlerine $\Omega 3$ yağ asitleri ve doymuş yağ asidi olan palm yağı ilave edilmiş, farelerin hipokampusundeki $\Omega 6/\Omega 3$ değişim oranları incelenerek $\Omega 3$ yağ asitlerinin olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir.[17]. Glial hücreler ve c6 glioma hücreleri ile yapılan çalışmalarda, EPA uygulamasının, IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini azalttığı ve antiinflamatuar sitokin IL-4'ün salınımını arttırdığı gösterilmiştir [149, 150].

AH ile yağ asitleri etkilerinin incelendiği çeşitli hayvan çalışmalarında da $\Omega 3$ yağ asitleri DHA ve EPA ile yapılan diyet takviyesinin, hayvanların bilişsel fonksiyonlarını iyileştirdiği ortaya konmuştur [21, 22]. Yapılan insan çalışmalarında da $\Omega 3$ alan AH bireylerin bilişsel fonksiyonlarında umut verici gelişmeler olduğu belirtilmiştir [23, 24]. Yapılan bir çalışmada CVD hastalarında DHA ve EPA kompleksi kullanıldığında tek başına EPA uygulamasına göre tutarsız sonuçlar elde edilmiş ve yalnız EPA kullanımının daha başarılı olduğu rapor edilmiştir [25].

$\Omega 3$ yağ asitlerinin faydalarından farklı olarak $\Omega 6$ yağ asitlerinden LA ile yapılan bazı çalışmalar olumsuz etkilerinden bahsetmektedir [151-154]. Yüksek LA içerikli yağlarının

tüketiminin, düşük dereceli inflamasyona, oksidatif strese, endotel disfonksiyonuna ve ateroskleroza katkıda bulunduğu bildirilmiştir [113]. $\Omega 6$ LA ve AA ile $\Omega 9$ yağ asidi oleik asidin (OA) AH patolojisi üzerindeki etkisini belirlemek için yapılan in vitro bir çalışmada yağ asitlerinin üçünün de hem tau hem de $A\beta$ ' nın polimerizasyonunu indüklediği gösterilmiştir [20].Yapılan bir hayvan çalışmasında LA ile beslenen sıçanlarda plazmada TNF- α seviyelerinde anlamlı bir artış ve hayvanların aortlarında yüksek seviyelerde NF κ B tespit edilmiştir [155]. Birçok $\Omega 6$ türevi prostaglandin ve lökotrienin hücresel proliferasyonu arttırarak, anjiyogenezi teşvik ettiği, apoptozu inhibe ederek, immün yanıtları baskılayan inflamasyonu uyardığı bildirilmiştir [156, 157]. Burada $\Omega 3/ \Omega 6$ oranının önemi ortaya çıkmaktadır. Beyindeki $\Omega 3/ \Omega 6$ oranının 1/1 – 1/2 olarak hedeflendiği; diyetle alınan $\Omega 3/ \Omega 6$ oranı 1/2-1/3 arasında olduğunda inflamasyonu önlediği ve 1/5 oranının aşılması gerektiği; 1/10 ve üzerinde oranların ise insan sağlığına olumsuz etkiler yaptığı bildirilmiştir [12, 158]. 48 saat $\Omega 3/\Omega 6$ oranları uygulaması sonucu MTT testi sonuçlarına göre hücre canlılığında farklı sonuçlar bulunmuştur. Kontrol grubu %100 olarak kabul edildiğinde 1\1, 1\2 ve 1\8 deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düşüş, 1\4 ve 1\16 gruplarında ise artış görülmektedir. Apoptoz sonuçlarında ise 1\1, 1\2, 1\4, 1\8 ve 1\16 dozlarının 48 saat uygulama sonuçlarına göre %95,7 olan hücre canlılığının sırasıyla, %95,6, %81,4, %86,2, %32,2 ve %19,8 'e düştüğü $\Omega 6$ dozu arttıkça yüzde canlılığın azaldığı bulunmuştur. En yüksek yüzde canlılık 1/1 oranında bulunmuştur.

Yapılan çalışmalar $A\beta$ ' nın nöronal hücrelerde serbest radikal üretimini arttırarak, antioksidan enzim aktivitelerini azalttığı, oksidatif strese ve hücre ölümüne yol açtığı bildirmektedir[159, 160]. Oksidasyon-redüksiyon sistemindeki dengesizlik, artan oksidatif stres seviyelerine neden olur. Yüksek seviyelerde oksidatif strese, ROT ve nitrojen içermeyen radikaller gibi çok sayıda aktif maddenin üretimi eşlik eder. Yüksek ROT seviyeleri apoptoza neden olur [161, 162]. Hücre içi yağ asitlerindeki değişikliklerin kanser hücrelerini ROT hasarından koruyabildiği bildirilmiştir. Membran lipitleri, $\dot{C}DYA$ peroksidasyonuna daha yatkındır, dolayısıyla hücrede apoptozu teşvik etmek için hücre zarının geçirgenliğini artırır. Kanser hücreleri membranlarındaki $\dot{C}DYA$ içeriğini azaltarak apoptozu önleyebilir [163]. Yapılan bir çalışma, $\Omega 3$ ve $\Omega 6$ kombinasyonu ile tedavi edilen Ppt1-KO nöronlarının, tedavi edilmeyen gruba kıyasla önemli ölçüde azalmış bir ROS seviyesine sahip olduğunu göstermiştir [25]. Bununla birlikte, başka bir çalışmada 24 saatlik LA ve EPA uygulamasının embriyonik kök hücrelerde ROT seviyelerini artırdığı gösterilmiştir [164]. Yapılan birçok çalışmada $\Omega 6$ yağasitlerinin, ROT üretimini ve

mitokondriyal hasarı indükleyerek hücre ölümüne sebep olduğu belirtilmektedir [153]. Çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak $A\beta_{1-42}$ uygulanan kontrol grubunda ROT seviyesi en yüksek olarak bulunmuştur. 48 saat ÇDYA'nın farklı $\Omega 3/\Omega 6$ oranları uygulaması sonucunda ise kontrol grubuna göre tüm gruplardaki ROT seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Literatürle uyumlu olarak bizim çalışmamızda da $A\beta_{1-42}$ ile indüklenen hücre ölümüne ve oksidatif strese karşı en yüksek nörokoruyucu etkiyi 1/1 oranı uygulaması göstermiştir [108]. ÇDYA hücre içi antioksidan enzim sistemlerini aktive ederek ve lipid peroksidasyonunu inhibe ederek ROT seviyelerini düşürmüştür.

ÇDYA kardiyolipinin yağ asidi yan zincirlerini değiştirir ve sonuç olarak mitokondriyal fosfolipidlerin yeniden modellenmesine neden olurlar [165]. EPA ve DHA ile yapılan bir çalışma yüksek konsantrasyonda fosfolipitlere sahip kril yağı ile beslenmenin, mitokondriyal membran potansiyeli üzerinde olumlu etkilerini bildirmektedir [166]. Yapılan çalışmalar oransal olarak $\Omega 6$ alımı arttıkça mitokondriyal fonksiyonların bozulduğunu, bazal ve maksimum solunumun azaldığını, proton sızıntısı ve ATP üretimi dahil olmak üzere mitokondriyal aktivitenin azaldığını göstermektedir [166, 167]. Bir makalede $\Omega 6/\Omega 3$ oranının düşüklüğünün; sistemik inflamasyonu baskıladığı, kardiyovasküler hastalıklarda endotel aktivasyonu önlediği bunun yanında akut ve kronik hastalıklarda, kronik böbrek yetmezliğinde ve akut pankreatitteki biyokimyasal parametreleri düzelttiği belirtilmiştir.[16]. $\Omega 3$ yağ asitleri antioksidan olarak önemli bir rol oynar ve antioksidan sinyal yollarını düzenler. Mitokondri membranları yüksek DHA içeriğine sahiptir. Kolon kanseriyle ilgili çok sayıda çalışma, ÇDYA' nın, mitokondriyal hasarı azaltarak tümör oluşumunu etkili bir şekilde engellediğini göstermiştir [168, 169]. Yapılan bir hayvan çalışmasında, EPA' nın mitokondriyal fosfolipid doymamışlığını arttırarak, ROT ve apoptozu düzenlediğini bildirilmektedir [170]. Yine *in vivo* bir çalışmada hayvanların diyetlerine eklenen $\Omega 3$ ÇDYA' nın kardiyolipin miktarını ve hücre apoptozunu azalttığı gösterilmiştir [156]. Araştırmalar, DHA 'nın oksidatif fosforilasyon yoluyla adenosin trifosfat sentezi için çok önemli olduğunu göstermektedir. $\Omega 3$ yağ asitlerinin mitokondriyal oksidatif stresi ve sitokrom c oksidaz aktivitesini azaltırken, manganez bağımlı süperoksit dismutaz aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir[171]. Bizim çalışmamızda da literatür ile uyumlu sonuçlar bulunmuştur. $A\beta_{1-42}$ ile insan SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki hücre kültürüne ÇDYA uygulaması sonucu sonrasında Flow Sitometri cihazı ile ölçülen MMP doza bağımlı olarak tepki vermektedir. ROT sonuçları, Apoptoz sonuçlarıyla benzer olarak kontrol grubunda MMP seviyesi en yüksek

bulunmuştur. Hücre ölümüne ve mitokondri membran hasarına karşı en yüksek nörokoruyucu etki $\Omega 3/\Omega 6=1/2$ deney grubunda bulunmuştur. Özellikle $\Omega 3$ ÇDYA'nın, membran geçirgenliğini değiştirdiği, membran potansiyelini etkileyerek mitokondriyal membran fonksiyonunu düzenleyebildiği gözlenmiştir.

Hücre döngüsü iki ana bölüme ayrılır: hücre bölünmesi (mitoz) ve interfaz. İnterfaz sırasında hücre kütlesi yaklaşık iki katına çıkar ve hücre mitoz için gerekli molekülleri sentezler. İnterfaz, G1 (G1 fazı), S (sentez) ve G2 (G2 fazı) olmak üzere üç alt faza ayrılır. G1 fazında, metabolik olarak aktif hücreler sürekli büyür, ancak DNA'larını kopyalayamazlar. G1 fazını takip eden S fazında DNA sentezi gerçekleşir. DNA sentezinin tamamlanmasıyla hücreler, hücre büyümesinin devam ettiği ve mitoz için gerekli proteinlerin sentezinin başladığı G2 fazına girer. Daha sonra hücre bölünmesinin (sitokinez) gerçekleştiği mitoz (M) evresine girerler. Hücre döngüsünü oluşturan fazların dışında, hücrelerin metabolik olarak aktif olduğu ancak hücre dışı sinyaller tarafından uyarılmadıkça çoğalmadığı durağan bir faz olan G0 (boşluk 0) vardır. 24 saatlik hücre döngüsüne sahip hücrelerde G1 fazının yaklaşık 11 saat, S fazının 8 saat, G2 fazının 4 saat ve M fazının bir saat sürdüğü bilinmektedir [172]. Çalışmamızda $A\beta_{1-42}$ uygulamasının, G1-S geçişinde hücre döngüsünü durdurduğu gözlemlenmiştir. $\Omega 3/\Omega 6$ oranlarının uygulamasının 1/8 deney grubunda S ve G2 fazlarında artışa neden olduğu bulunmuştur. S fazı %2,9' dan %5,1' e, G2 fazı ise 2 kattan fazla artarak %9,5' e yükselmiştir. Diğer deney gruplarında anlamlı artış görülmemiştir. Bu sonuçlar $A\beta_{1-42}$ uygulamasının sebep olduğu hücre döngüsünün durmasını $\Omega 3/\Omega 6=1/8$ oranı kullanımı ile kısmi de olsa düzeltilebildiğini göstermektedir.

Farklı $\Omega 3/\Omega 6$ oranlarının inflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokin salınımına etkisi tez çalışmamızın araştırdığı konulardan biridir. Yüksek LA içerikli yağlarının tüketiminin, düşük dereceli inflamasyona, oksidatif strese, endotel disfonksiyonuna ve ateroskleroza katkıda bulunduğu bildirilmiştir [113]. $\Omega 3$ ÇDYA' ların İnflamatuvar süreçlerin süresini ve yoğunluğunu modüle ettiği ve diyetteki artışlarının IL-1 β , TNF- α ve IL-6 gibi proenflamatuvar sitokinleri azalttığı bildirilmiştir [176]. Ayrıca, $\Omega 6$ ÇDYA' ların eikozanoid biyosentezini inhibe ederek dolaylı proinflamatuvar etkiler gösterdiği belirtilmektedir. LA' nın NF κ B' yi aktive ederek proinflamatuvar sitokinleri, endotelyal adezyon moleküllerini ve kemokinleri arttırdığı bilinmektedir [114]. Yapılan bir hayvan çalışmasında LA ile beslenen sıçanlarda plazmada TNF- α seviyelerinde anlamlı bir artış ve hayvanların aortlarında yüksek seviyelerde NF κ B tespit edilmiştir [155]. Çalışmamızda inflamatuvar olduğu bildirilen

NFκB'nin mRNA ekspresyon seviyeleri kontrol grubuyla kıyaslandığında, tüm deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düşüş görülmüştür. NFκB'nin protein seviyelerinde ise en yüksek ölçümün olduğu 1/4 deney grubu dışında, tüm diğer gruplarda kontrole göre azalma görülmüştür. Yapılan randomize kontrollü çalışmada diyetteki Ω3 yağ asitlerinin birçok kronik ve akut hastalıkta inflamasyon ve endotelial aktivasyon seviyelerini düşürdüğü bildirilmiştir [177]. Ω3'ün TNF-α ve IL-1β gibi inflamatuvar sitokinleri ve tromboksan-2 ve prostaglandin E2 gibi proinflamatuvar/proagregan eikozanoidleri inhibe ettiği bilinmektedir [178]. Düşük dereceli inflamasyonu baskılamak için Ω3'ün kullanılmasının romatoid artrit, ateroskleroz, dislipidemi, diyabet, obezite ve kalp yetmezliği gibi çok sayıda kronik hastalığa fayda sağlayabileceği bildirilmiştir [178]. Doğumdan yaşlılık dönemine kadar olan süreyi inceleyen bir derlemede, nöronal gelişimin sağlanması, nöroinflamasyonun azalması ve normal nörodejenerasyon süreci için Ω3/Ω6 oranı tüketiminin 1/2 ila 1 arasında olması gerektiği bildirilmektedir [179]. Liang ve arkadaşlarının androjene duyarlı prostat kanseri hücreleri aşıl原因an farelerle yaptığı çalışmada, Ω3 yağ asitleri bakımından zengin yüksek yağlı bir diyetle beslenen gruptaki farelerin, Ω6 yağ asitleri içeren yüksek yağlı bir diyetle beslenen hayvanlara kıyasla daha düşük seviyelerde proinflamatuvar sitokin (IL-6, TNF-α ve IL-10) ve kemoatraktan protein (CCL-2) eksprese ettiği gösterilmiştir [180]. Lampron ve arkadaşlarının yaptığı *in vitro* bir çalışmaya göre Ω3 uygulamasının TNF-α ve IL-6 üretimini baskıladığı bildirilmiştir [181]. Çalışmamızda inflamatuvar olduğu bildirilen TNF-α'nın mRNA ekspresyon seviyesi kontrol grubuyla kıyaslandığında, en düşük TNF-α üretimi 1/4 oranındaki çalışma grubunda bulunmuştur. En yüksek TNF-α üretimi 1/16 grubunda bulunmuştur. TNF-α'nın protein seviyeleri ise literatürle uyumlu olarak en düşük 1/2 ve 1/4 deney gruplarında görülmüştür. En yüksek protein seviyesi ise en yüksek Ω6 oranının bulunduğu 1/16 deney grubunda ölçülmüştür. Yapılan bir *in vivo* çalışmada, Ω3'ten fakir beslenen hayvanların yağ tüketiminin daha fazla olduğu ve nöron hasarı dolayısıyla astrosit sayısının arttığı ve Ω-3 uygulamasının antiinflamatuvar etki göstererek inflamatuvar sitokin salınımını azalttığı bildirilmiştir [182].

Literatürde, nörolojik hastalık prognozundaki nöroinflamasyonda proinflamatuvar sitokinlerden IL-1β ve IL-6'un yüksek üretimlerinin önemli rol oynadığı bildirilmektedir [183]. AH üzerinde yapılan birçok çalışma, TNF-α ve IL-6 dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerde artış olduğunu ortaya çıkarmıştır [71, 72]. IL-6, beyin dokusunun normal homeostazisi için önemlidir. IL-6 sinyalleşmesinin inhibisyonu mikroglyal

aktivasyonun azalmasını teşvik ederken, IL-6' nin aşırı ekspresyonu kronik nöroinflamasyona yol açar. Desale ve arkadaşları yaptıkları çalışmaya göre inflamatuvar sitokin salınımının doymuş yağ müdahalesi sonucunda oluştuğunu göstermişlerdir [184]. $\Omega 6/ \Omega 3$ oranları ile yapılan bir çalışmada, $\Omega 6/ \Omega 3$ oranının azaltılmasının IL-6 'nın daha düşük salınımına neden olduğu bildirilmiştir[118]. Başka bir çalışmada ise LA' nin izokalorik olarak ALA ile değiştirilmesinin IL-6 reseptöründe azalmaya neden olduğunu göstermektedir [119]. Bizim çalışmamızda, ÇDYA uygulamaları içerisinde kontrol grubuna kıyasla, en düşük IL-6 mRNA ekspresyon seviyesi 1/4 deney grubunda, en yüksek sekresyon ise 1/16 deney grubunda bulunmuştur. IL-6' nin protein seviyeleri ise TNF- α sonuçları ile uyumlu olarak 1/2 ve 1/4 deney gruplarında bulunurken yine en yüksek sitokin salınımı $\Omega 6'$ nin en yüksek oranda bulunduğu 1/16 olarak bulunmuştur.

COX, prostaglandin sentezi sürecinde araşidonik asidin dönüştürülmesinden sorumlu olan bir enzimdir. 2 tip COX vardır; COX-1 ve COX-2, AH patolojisinin çeşitli aşamalarında farklı şekilde eksprese edilir. COX-1 AH' nin geç evresinde A β agregatlarında yer alan mikrogliyalarda eksprese edilirken, COX-2 AH'nin erken evresinde nöronlarda yüksek oranlarda eksprese edilir [89]. COX-2' den türetilen prostaglandinler, inflamatuvar yanıtın erken evrelerinde ve inflamasyonun çözülmesinde önemlidir fakat COX-2' nin yüksek miktarda salınımı nöron hasarına sebep olur. AH hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, nöronlarda COX-2' nin aşırı ekspresyonunun, A β plaklarının oluşumuna ve serbest radikallerin üretimi yoluyla nöronal hücre ölümüne neden olarak, ağırlaştırılmış bilişsel eksikliklere neden olduğunu göstermektedir [185, 186]. LA aorttaki COX-2 ekspresyonunu önemli ölçüde arttırır, AA' yı proinflamatuvar eikozanoidlere dönüştürür [155]. Kanseri hücre hatlarına $\Omega 3$ yağ asitleri uygulamasının yapıldığı *in vitro* çalışmalarda da COX-2 inhibisyonun hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir [187-189]. COX-2'nin mRNA ekspresyon seviyesi; kontrol grubuyla kıyaslandığında, 1/4, 1/8 ve 1/16 deney gruplarında $\Omega 6$ oranı arttıkça COX-2 seviyelerinin anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. En düşük COX-2 seviyesi diğer gruplarla karşılaştırıldığında 1/1 deney grubunda gösterilmiştir. Çalışmamızda, protein seviyelerinde en yüksek COX-2 ölçümü kontrol grubuna kıyaslandığında anlamlı olarak 1/8 deney grubunda bulunmuştur. En düşük protein seviyesi ise en yüksek $\Omega 6$ oranının bulunduğu 1/16 deney grubunda ölçülmüştür.

Diğer hücrelerin yanı sıra astrositler ve nöronlar tarafından salgılanan TGF β 1, mikrogliya aktivasyonunu düzenleyerek inflamatuvar sitokinlerin ve ROT' un salınımını azaltır [190].

TGF β 1 pleiotropik bir sitokindir ve nöroinflamasyon ve sitotoksitenin güçlü bir düzenleyicisidir. İnflamatuvar koşullara yanıt olarak artan TGF β 1 üretimi, nöroinflamasyonun ve nörotoksitenin düzenleyici mekanizmalardan biridir [191]. AH ve yapılan hayvan çalışmalarında TGF β 1 tarafından uygulanan modülasyonun, aşağı regüle edilen Smad3'ün aktivasyonuna aracılık ederek nöroprotektif etkisinin olduğu da gösterilmiştir [192, 193]. Beyinde TGF β 1, eksitotoksiste, hipoksi ve iskemi aynı zamanda A β gibi bileşiklerin neden olduğu hücre ölümünde nörokoruyucu olarak işlev görür [83].

İnflamasyon bölgesinde salgılanan TGF β 1, mikroglia alımını teşvik ederek zararlı uyarının etkili bir şekilde ortadan kaldırılmasına olanak tanır. Hipokampal hücrelerle yapılan *in vitro* çalışmalarda, hücrelerin LPS ve IFN γ ile uyarılmasının, TGF β 1' in salgılanmasını ve aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir [194]. Hipokampal nöronlarla yapılan başka bir çalışmada *in vitro* olarak salgılanan TGF β 1 inflamatuvar sitokinlerin salınımını azaltarak nöron canlılığını arttırdığı bildirilmiştir [195]. Bundan farklı olarak Yan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada TGF β 1 inflamatuvar aktiviteyi arttırdığı gösterilmiştir. Hipotalamusa TGF β 1 enjeksiyonunun inflamatuvar NF κ B artışıyla sonuçlandığı bildirilmiştir [196]. TGF β 1' in mRNA ekspresyon seviyesi; kontrol grubuyla kıyaslandığında, 1/4 ve 1/8 deney gruplarında istatistiksel anlamlı bir artış bulunmuştur. Çalışmamızda, protein seviyelerinde en yüksek TGF β 1 ölçümleri, kontrol grubuna kıyaslandığında istatistiksel anlamlı olarak 1/4 ve 1/16 deney gruplarında bulunmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Alzheimer hastalığı (AH), klinik olarak, hafıza ve mantıklı düşünme süreci dahil olmak üzere bilişsel fonksiyonlarda bozulma ile karakterize ilerleyici, kronik bir hastalıktır. AH ve hastalık semptomlarını tamamen iyileştiren bir tedavi henüz yoktur. Diyet kompozisyonunun ve dolaşımdaki yağ asidi seviyelerinin tüketim miktarları ve aralarındaki dengenin nörolojik hastalıklardan koruyucu olabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında, $\Omega 3/\Omega 6$ çoklu doymamış yağ asitlerinin (ÇDYA) oranlarının, A β 1-42 ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelindeki hücre canlılığı, hücre içi ROT miktarı, Apoptoz oranları, azalan mitokondriyal membran potansiyeli üzerine koruyucu etkileri, asetilkolin esterase (AChE) enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkileri ile pro ve antiinflamatuvar sitokinler üzerine etkileri araştırılmıştır.

Çalışma sonuçlarımıza göre, 48 saat $\Omega 3/\Omega 6$ oranları uygulaması sonucu hücre canlılığı MTT testi ile değerlendirilmiş, 1/1, 1/2 ve 1/8 dozlarında istatistiksel olarak anlamlı düşüş, 1/4 ve 1/16 gruplarında ise artış gözlenmiştir. Hücre canlılığı için Annexin V analizi de yapılmış, 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16 dozlarının 48 saat uygulamasından sonra kontrol grubunda %95,7 olan hücre canlılığının sırasıyla, %95,6, %81,4, %86,2, %32,2 ve %19,8'e düştüğü, $\Omega 6$ dozu arttıkça yüzde canlılığın azaldığı bulunmuştur.

ROT ve MMP düzeylerinin, kontrol grubuna göre tüm gruplarda azaldığı tespit edilmiştir.

Oksidatif strese karşı en yüksek nörokoruyucu etki 1/1 dozunda gözlenmiştir.

A β 1-42 uygulaması, AChE protein miktarı kontrol grubuna göre arttırmıştır. Diğer yandan, tüm ÇDYA uygulamalarının AChE protein seviyesi üzerine inhibitör etkileri tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1/4, 1/8 ve 1/16 deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlenmiştir. AChE protein miktarı, 1/4, 1/8 ve 1/16 dozlarında istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlenmiştir.

TNF- α ve IL-6 mRNA ekspresyon seviyesi; en düşük 1/4 dozunda, en yüksek ise 1/16 dozunda bulunmuştur. COX-2 mRNA ekspresyon seviyesinin en yüksek 1/4, 1/8 ve 1/16 dozlarında $\Omega 6$ oranı arttıkça anlamlı olarak arttığı bulunmuş, en düşük ekspresyon ise 1/1

dozunda gözlenmiştir. TGF β 1 mRNA ekspresyon seviyesi; 1\4 ve 1\8 dozlarında istatistiksel anlamlı bir artış göstermiştir.

IL-6 ve TNF- α protein seviyeleri çalışılmış, sonuçların birbiriyle uyumlu olduğu gözlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı en düşük protein seviyeleri 1/2 ve 1/4 deney gruplarında bulunurken en yüksek sitokin salınımı Ω 6' nın en yüksek oranda bulunduğu 1/16 dozunda bulunmuştur. Protein seviyelerinde en yüksek COX-2 ölçümü kontrol grubuna kıyaslandığında anlamlı olarak 1/8 deney grubunda bulunmuştur. En düşük protein seviyesi ise en yüksek Ω 6 oranının bulunduğu 1/16 deney grubunda ölçülmüştür. Çalışmamızda en yüksek TGF β 1 protein seviyeleri, istatistiksel anlamlı olarak 1/4 ve 1/16 dozlarında bulunmuştur.

Şu anda, herhangi bir nörodejeneratif hastalık türü için iyileştirici tedavi mevcut değildir ve bu alanda umut verici pek çok yeniliğe rağmen tedavi stratejileri, nöron kaybını önlemede başarısız olmaktadır. Hastalığı değiştiren tedaviler semptomları hafifletmeye ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatmaya odaklıdır. Nörodejeneratif bozukluklarda ÇDYA takviyesinin olası etkinliği hakkında birikmiş bilimsel kanıtlar vardır.

Ω 3/ Ω 6=1/4 oranının kardiyovasküler ölümleri %60 oranında azalttığı ve inflamasyonu baskılayan oranın 1/1-1/3 aralığında olduğunu belirten farklı çalışmaların sonuçları ile de uyumlu olarak 1/1 ve 1/4 dozlarının kullanılmasının AH gibi nörodejeneratif hastalıklardan korunmada veya ortaya çıkmasını geciktirmede faydalı olabileceğini, hasta bireylerde ise, bazı semptomları hafifletebileceğini ve en önemlisi de yaşam kalitesi üzerinde en büyük etkiye sahip olan bilişsel ve fiziksel gerilemeyi yavaşlatabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Erkekoğlu, P. ve Baydar, T. (2021). Güncel in vitro sitotoksikite testleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 41(1), 45-63.
2. Tahami Monfared, A. A., Byrnes, M. J., White, L. A. and Zhang, Q. (2022). Alzheimer's disease: epidemiology and clinical progression. *Neurology and therapy*, 11(2), 553-569.
3. Yiannopoulou, K. G. and Papageorgiou, S. G. (2020). Current and future treatments in Alzheimer disease: an update. *Journal of central nervous system disease*, 12, 1179573520907397.
4. Taliyan, R., Kakoty, V., Sarathlal, K. C., Kharavtekar, S. S., Karennanavar, C. R., Choudhary, Y. K. and Kesharwani, P. (2022). Nanocarrier mediated drug delivery as an impeccable therapeutic approach against Alzheimer's disease. *Journal of Controlled Release*, 343, 528-550.
5. Xia, W., Zhang, J., Perez, R., Koo, E. H. and Selkoe, D. J. (1997). Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: implications for the pathogenesis of Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(15), 8208-8213.
6. Kuszczyk, M. (2009). Cell type specific uptake and clearance of wita-amyloid peptides. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 3(69).
7. Hampel, H., Shen, Y., Walsh, D. M., Aisen, P., Shaw, L. M., Zetterberg, H. and Blennow, K. (2010). Biological markers of amyloid β -related mechanisms in Alzheimer's disease. *Experimental neurology*, 223(2), 334-346.
8. Ayub, M., Jin, H. K. and Bae, J. S. (2021). Novelty of sphingolipids in the central nervous system physiology and disease: Focusing on the sphingolipid hypothesis of neuroinflammation and neurodegeneration. *International journal of molecular sciences*, 22(14), 7353.
9. Svennerholm, L. (1968). Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. *Journal of lipid research*, 9(5), 570-579.
10. Sambra, V., Echeverria, F., Valenzuela, A., Chouinard-Watkins, R. and Valenzuela, R. (2021). Docosahexaenoic and arachidonic acids as neuroprotective nutrients throughout the life cycle. *Nutrients*, 13(3), 986.
11. de Luján Alvarez, M. and Lorenzetti, F. (2021). Role of eicosanoids in liver repair, regeneration and cancer. *Biochemical pharmacology*, 192, 114732.
12. Simopoulos, A. P. (2011). Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Molecular neurobiology*, 44(2), 203-215.
13. Shetty, S. S. and Shetty, P. K. (2020). ω -6/ ω -3 fatty acid ratio as an essential predictive biomarker in the management of type 2 diabetes mellitus. *Nutrition*, 79, 110968.

14. Lira, L. G., Justa, R. M. D. E., Carioca, A. A. F., Verde, S. M. M. L., Sampaio, G. R., da Silva Torres, E. A. F. and Damasceno, N. R. T. (2019). Plasma and erythrocyte ω -3 and ω -6 fatty acids are associated with multiple inflammatory and oxidative stress biomarkers in breast cancer. *Nutrition*, 58, 194-200.
15. Simopoulos, A. P. (2010). Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk. *Experimental biology and medicine*, 235(7), 785-795.
16. Fabiani, H., Mudjihartini, N. and Lestari, W. (2021). Low dietary omega-6 to omega-3 fatty acid intake ratio enhances adiponectin level in obesity. *World Nutrition Journal*, 5(1), 30-39.
17. Delpech, J. C., Madore, C., Joffre, C., Aubert, A., Kang, J. X., Nadjar, A. and Layé, S. (2015). Transgenic increase in n-3/n-6 fatty acid ratio protects against cognitive deficits induced by an immune challenge through decrease of neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology*, 40(3), 525-536.
18. Lei, E., Vacy, K. and Boon, W. C. (2016). Fatty acids and their therapeutic potential in neurological disorders. *Neurochemistry international*, 95, 75-84.
19. Xu, J., Begley, P., Church, S. J., Patassini, S., Hollywood, K. A., Jüllig, M. and Cooper, G. J. (2016). Graded perturbations of metabolism in multiple regions of human brain in Alzheimer's disease: Snapshot of a pervasive metabolic disorder. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1862(6), 1084-1092.
20. Amtul, Z., Uhrig, M., Wang, L., Rozmahel, R. F. and Beyreuther, K. (2012). Detrimental effects of arachidonic acid and its metabolites in cellular and mouse models of Alzheimer's disease: structural insight. *Neurobiology of aging*, 33(4), 831-e21.
21. Hashimoto, M., Hossain, S., Shimada, T., Sugioka, K., Yamasaki, H., Fujii, Y. and Shido, O. (2002). Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. *Journal of neurochemistry*, 81(5), 1084-1091.
22. Cole, G. M. and Frautschy, S. A. (2006). Docosahexaenoic acid protects from amyloid and dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Nutrition and health*, 18(3), 249-259.
23. Freund-Levi, Y., Eriksdotter-Jönghagen, M., Cederholm, T., Basun, H., Faxen-Irving, G., Garlind, A. and Palmblad, J. (2006). ω -3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: OmegAD study: a randomized double-blind trial. *Archives of neurology*, 63(10), 1402-1408.
24. Quinn, J. F., Raman, R., Thomas, R. G., Yurko-Mauro, K., Nelson, E. B., Van Dyck, C. and Aisen, P. S. (2010). Docosahexaenoic acid supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: a randomized trial. *Jama*, 304(17), 1903-1911.
25. Kim, S. J., Zhang, Z., Saha, A., Sarkar, C., Zhao, Z., Xu, Y. and Mukherjee, A. B. (2010). Omega-3 and omega-6 fatty acids suppress ER-and oxidative stress in cultured neurons and neuronal progenitor cells from mice lacking PPT1. *Neuroscience letters*, 479(3), 292-296.

26. Avallone, R., Vitale, G. and Bertolotti, M. (2019). Omega-3 fatty acids and neurodegenerative diseases: new evidence in clinical trials. *International journal of molecular sciences*, 20(17), 4256.
27. Calviello, G., Su, H. M., Weylandt, K. H., Fasano, E., Serini, S. and Cittadini, A. (2013). Experimental evidence of ω -3 polyunsaturated fatty acid modulation of inflammatory cytokines and bioactive lipid mediators: their potential role in inflammatory, neurodegenerative, and neoplastic diseases. *BioMed research international*, 2013(1), 743171.
28. Reitz, C., C. Brayne and Mayeux, R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 7(3), 137-152.
29. Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G. C., Wu, Y. T. and Prina, M. (2015). *World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends* (Doctoral dissertation, Alzheimer's Disease International).
30. Palop, J. J. and Mucke, L. (2010). Amyloid- β -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nature neuroscience*, 13(7), 812-818.
31. Greer, P. L. and Greenberg, M. E. (2008). From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron*, 59(6), 846-860.
32. De Rosa, R., Garcia, A. A., Braschi, C., Capsoni, S., Maffei, L., Berardi, N. and Cattaneo, A. (2005). Intranasal administration of nerve growth factor (NGF) rescues recognition memory deficits in AD11 anti-NGF transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(10), 3811-3816.
33. Nagahara, A. H., Merrill, D. A., Coppola, G., Tsukada, S., Schroeder, B. E., Shaked, G. M. and Tuszynski, M. H. (2009). Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nature medicine*, 15(3), 331-337.
34. Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H. G. and Zhu, X. (2014). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(8), 1240-1247.
35. Özkay, Ü.D., Y. Öztürk, Can, Ö. (2011). Yaşlanan dünyanın hastalığı: alzheimer hastalığı. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 18(1), 35-42.
36. Söylemez, B. (2013). *Kademeli olarak azalmış stres eşiği modeline göre yapılan girişimlerin demanslı birey ve ailesinin bakım sonuçlarına etkisinin incelenmesi*, Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 50-51.
37. Kumar, A. and Singh, A. (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological reports*, 67(2), 195-203.
38. 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.

39. Dai, C. L., Hu, W., Tung, Y. C., Liu, F., Gong, C. X. and Iqbal, K. (2018). Tau passive immunization blocks seeding and spread of Alzheimer hyperphosphorylated Tau-induced pathology in 3× Tg-AD mice. *Alzheimer's research & therapy*, 10, 1-14.
40. Cheng, Y. and Bai, F. (2018). The association of tau with mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Frontiers in neuroscience*, 12, 163.
41. Kumar, A., Pate, K. M., Moss, M. A., Dean, D. N. and Rangachari, V. (2014). Self-propagative replication of A β oligomers suggests potential transmissibility in Alzheimer disease. *PLoS One*, 9(11), e111492.
42. Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., and Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta pharmacologica sinica*, 38(9), 1205-1235.
43. Cole, S. L., and Vassar, R. (2007). The Alzheimer's disease β -secretase enzyme, BACE1. *Molecular neurodegeneration*, 2, 1-25.
44. Shin, W. S., Di, J., Cao, Q., Li, B., Seidler, P. M., Murray, K. A. and Jiang, L. (2019). Amyloid β -protein oligomers promote the uptake of tau fibril seeds potentiating intracellular tau aggregation. *Alzheimer's research & therapy*, 11, 1-13.
45. Mulugeta, E., Karlsson, E., Islam, A., Kalaria, R., Mangat, H., Winblad, B. and Adem, A. (2003). Loss of muscarinic M4 receptors in hippocampus of Alzheimer patients. *Brain research*, 960(1-2), 259-262.
46. Walters, A., Phillips, E., Zheng, R., Biju, M. and Kuruvilla, T. (2016). Evidence for neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Progress in Neurology and Psychiatry*, 20(5), 25-31.
47. Tramutola, A., Lanzillotta, C., Perluigi, M. and Butterfield, D. A. (2017). Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain research bulletin*, 133, 88-96.
48. Mohsenzadegan, M. (2012). The immunopathogenic role of reactive oxygen species in Alzheimer disease. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 203-216.
49. Wang, L., Yin, Y. L., Liu, X. Z., Shen, P., Zheng, Y. G., Lan, X. R. and Wang, J. Z. (2020). Current understanding of metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Translational neurodegeneration*, 9, 1-13.
50. Pendlebury, S. T. and Rothwell, P. M. (2009). Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology*, 8(11), 1006-1018.
51. Kalaria, R. N. (2010). Vascular basis for brain degeneration: faltering controls and risk factors for dementia. *Nutrition reviews*, 68(suppl_2), S74-S87.
52. Deane, R., Wu, Z. and Zlokovic, B. V. (2004). RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates Alzheimer amyloid β -peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke*, 35(11_suppl_1), 2628-2631.

53. Leibson, C. L., Rocca, W. A., Hanson, V. A., Cha, R., Kokmen, E., O'Brien, P. C. and Palumbo, P. J. (1997). Risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study. *American journal of epidemiology*, 145(4), 301-308.
54. Craft, S. (2007). Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment. *Current Alzheimer Research*, 4(2), 147-152.
55. Reger, M. A., Watson, G. S., Frey Ii, W. H., Baker, L. D., Cholerton, B., Keeling, M. L. and Craft, S. (2006). Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: modulation by APOE genotype. *Neurobiology of aging*, 27(3), 451-458.
56. Akter, K., Lanza, E. A., Martin, S. A., Myronyuk, N., Rua, M. and Raffa, R. B. (2011). Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: shared pathology and treatment?. *British journal of clinical pharmacology*, 71(3), 365-376.
57. Guo, J., Yu, C., Li, H., Liu, F., Feng, R., Wang, H. and Wang, J. (2010). Impaired neural stem/progenitor cell proliferation in streptozotocin-induced and spontaneous diabetic mice. *Neuroscience research*, 68(4), 329-336.
58. Ramos-Rodriguez, J. J., Molina-Gil, S., Ortiz-Barajas, O., Jimenez-Palomares, M., Perdomo, G., Cozar-Castellano, I. and Garcia-Alloza, M. (2014). Central proliferation and neurogenesis is impaired in type 2 diabetes and prediabetes animal models. *PLoS One*, 9(2), e89229.
59. Profenno, L. A., Porsteinsson, A. P. and Faraone, S. V. (2010). Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biological psychiatry*, 67(6), 505-512.
60. Traber, M. G., van der Vliet, A., Reznick, A. Z. and Cross, C. E. (2000). Tobacco-related diseases: is there a role for antioxidant micronutrient supplementation?. *Clinics in chest medicine*, 21(1), 173-187.
61. Wonnacott, S., Russell, M. A. H. and Stolerman, I. P. (1990). Nicotine psychopharmacology: Molecular, cellular, and behavioural aspects. (No Title).
62. Baune, B. T. (2015). Inflammation and neurodegenerative disorders: is there still hope for therapeutic intervention?. *Current opinion in psychiatry*, 28(2), 148-154.
63. Pugazhenth, S., Qin, L. and Reddy, P. H. (2017). Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-molecular basis of disease*, 1863(5), 1037-1045.
64. Martin-Jiménez, C. A., Gaitán-Vaca, D. M., Echeverria, V., González, J. and Barreto, G. E. (2017). Relationship between obesity, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease: an astrocentric view. *Molecular neurobiology*, 54, 7096-7115.
65. Block, M. L., Zecca, L. and Hong, J. S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(1), 57-69.
66. Prinz, M. and Priller, J. (2014). Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(5), 300-312.

67. Koyama, A., O'Brien, J., Weuve, J., Blacker, D., Metti, A. L. and Yaffe, K. (2013). The role of peripheral inflammatory markers in dementia and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 68(4), 433-440.
68. Lu, D. Y., Tsao, Y. Y., Leung, Y. M. and Su, K. P. (2010). Docosahexaenoic acid suppresses neuroinflammatory responses and induces heme oxygenase-1 expression in BV-2 microglia: implications of antidepressant effects for omega-3 fatty acids. *Neuropsychopharmacology*, 35(11), 2238-2248.
69. Mattson, M. P. and Meffert, M. K. (2006). Roles for NF- κ B in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death & Differentiation*, 13(5), 852-860.
70. Mattson, M. P. and Meffert, M. K. (2006). Roles for NF- κ B in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death & Differentiation*, 13(5), 852-860.
71. Blum-Degen, D., Müller, T., Kuhn, W., Gerlach, M., Przuntek, H. and Riederer, P. (1995). Interleukin-1 β and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neuroscience letters*, 202(1-2), 17-20.
72. Jiang, H., Hampel, H., Prvulovic, D., Wallin, A., Blennow, K., Li, R. and Shen, Y. (2011). Elevated CSF levels of TACE activity and soluble TNF receptors in subjects with mild cognitive impairment and patients with Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 6(1), 1-8.
73. Meda, L., Baron, P., Prat, E., Scarpini, E., Scarlato, G., Cassatella, M. A. and Rossi, F. (1999). Proinflammatory profile of cytokine production by human monocytes and murine microglia stimulated with β -amyloid [25–35]. *Journal of neuroimmunology*, 93(1-2), 45-52.
74. Patel, N. S., Paris, D., Mathura, V., Quadros, A. N., Crawford, F. C. and Mullan, M. J. (2005). Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation*, 2, 1-10.
75. Blasko, I., Veerhuis, R., Stampfer-Kountchev, M., Saurwein-Teissl, M., Eikelenboom, P. and Grubeck-Loebenstien, B. (2000). Costimulatory effects of interferon- γ and interleukin-1 β or tumor necrosis factor α on the synthesis of A β 1-40 and A β 1-42 by human astrocytes. *Neurobiology of disease*, 7(6), 682-689.
76. He, P., Zhong, Z., Lindholm, K., Berning, L., Lee, W., Lemere, C. and Shen, Y. (2007). Deletion of tumor necrosis factor death receptor inhibits amyloid β generation and prevents learning and memory deficits in Alzheimer's mice. *The Journal of cell biology*, 178(5), 829-841.
77. Liao, Y. F., Wang, B. J., Cheng, H. T., Kuo, L. H. and Wolfe, M. S. (2004). Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interferon- γ stimulate γ -secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein through a JNK-dependent MAPK pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 49523-49532.

78. Sheng, J. G., Zhu, S. G., Jones, R. A., Griffin, W. S. T. and Mrak, R. E. (2000). Interleukin-1 promotes expression and phosphorylation of neurofilament and tau proteins in vivo. *Experimental neurology*, 163(2), 388-391.
79. Li, Y., Liu, L., Barger, S. W. and Griffin, W. S. T. (2003). Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. *Journal of Neuroscience*, 23(5), 1605-1611.
80. Rothaug, M., Becker-Pauly, C. and Rose-John, S. (2016). The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(6), 1218-1227.
81. Quintanilla, R. A., Orellana, D. I., González-Billault, C. and Maccioni, R. B. (2004). Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Experimental cell research*, 295(1), 245-257.
82. Caraci, F., Spampinato, S., Sortino, M. A., Bosco, P., Battaglia, G., Bruno, V. and Copani, A. (2012). Dysfunction of TGF- β 1 signaling in Alzheimer's disease: perspectives for neuroprotection. *Cell and tissue research*, 347, 291-301.
83. Caraci, F., Battaglia, G., Bruno, V., Bosco, P., Carbonaro, V., Giuffrida, M. L. and Copani, A. (2011). TGF- β 1 pathway as a new target for neuroprotection in Alzheimer's disease. *CNS neuroscience & therapeutics*, 17(4), 237-249.
84. Masliah, E., Ho, G. and Wyss-Coray, T. (2001). Functional role of TGF β in Alzheimer's disease microvascular injury: lessons from transgenic mice. *Neurochemistry international*, 39(5-6), 393-400.
85. Tarkowski, E., Andreasen, N., Tarkowski, A. and Blennow, K. (2003). Intrathecal inflammation precedes development of Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 74(9), 1200-1205.
86. Cacquevel, M., Lebeurrier, N., Cheenne, S. and Vivien, D. (2004). Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Current drug targets*, 5(6), 529-534.
87. Wyss-Coray, T., Masliah, E., Mallory, M., McConlogue, L., Johnson-Wood, K., Lin, C. and Mucke, L. (1997). Amyloidogenic role of cytokine TGF- β 1 in transgenic mice and in Alzheimer's disease. *Nature*, 389(6651), 603-606.
88. Teseur, I., Zou, K., Esposito, L., Bard, F., Berber, E., Van Can, J. and Wyss-Coray, T. (2006). Deficiency in neuronal TGF- β signaling promotes neurodegeneration and Alzheimer's pathology. *The Journal of clinical investigation*, 116(11), 3060-3069.
89. Warner, T. D. and Mitchell, J. A. (2004). Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *The FASEB journal*, 18(7), 790-804.
90. Pasinetti, G. M. (1998). Cyclooxygenase and inflammation in Alzheimer's disease: experimental approaches and clinical interventions. *Journal of neuroscience research*, 54(1), 1-6.

91. Jones, D. P. (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*, 8(9-10), 1865-1879.
92. Tönnies, E. and Trushina, E. (2017). Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(4), 1105-1121.
93. Giacco, F. and Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research*, 107(9), 1058-1070.
94. Ahmad, W. (2013). Overlapped metabolic and therapeutic links between Alzheimer and diabetes. *Molecular neurobiology*, 47(1), 399-424.
95. Salim, S. (2017). Oxidative stress and the central nervous system. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 360(1), 201-205.
96. Liu, Z., Zhou, T., Ziegler, A. C., Dimitrion, P. and Zuo, L. (2017). Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to clinical applications. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017(1), 2525967.
97. Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2005). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan, 781.
98. Aksoy, M. (2011). *Beslenme Biyokimyası* (5. baskı). Hatipoğlu Yayınevi, 128.
99. Samur, F. (2006). *Kalp damar hastalıklarında beslenme*. T.C. Sağlık Bakanlığı yayınları, 120.
100. Baysal, A. (2004). *Beslenme*. Hatiboğlu Yayınevi, 310.
101. Hussey, B., Lindley, M. R. and Mastana, S. S. (2017). Omega 3 fatty acids, inflammation and DNA methylation: an overview. *Clinical Lipidology*, 12(1), 24-32.
102. Kohli, P. and Levy, B. D. (2009). Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. *British journal of pharmacology*, 158(4), 960-971.
103. Boland, L. M. and Drzewiecki, M. M. (2008). Polyunsaturated fatty acid modulation of voltage-gated ion channels. *Cell biochemistry and biophysics*, 52, 59-84.
104. Elinder, F. and Liin, S. I. (2017). Actions and mechanisms of polyunsaturated fatty acids on voltage-gated ion channels. *Frontiers in physiology*, 8, 43.
105. Nooyens, A. C., Van Gelder, B. M., Bueno-de-Mesquita, H. B., Van Boxtel, M. P. and Verschuren, W. M. (2018). Fish consumption, intake of fats and cognitive decline at middle and older age: the Doetinchem Cohort Study. *European journal of nutrition*, 57, 1667-1675.
106. Wu ShunQuan, W. S., Ding YingYing, D. Y., Wu FuQuan, W. F., Li RuiSheng, L. R., Hou Jun, H. J. and Mao Panyong, M. P. (2015). Omega-3 fatty acids intake and risks of dementia and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 48, 1-9.

107. AlAmmar, W. A., Albeesh, F. H., Ibrahim, L. M., Algindan, Y. Y., Yamani, L. Z. and Khattab, R. Y. (2021). Effect of omega-3 fatty acids and fish oil supplementation on multiple sclerosis: a systematic review. *Nutritional neuroscience*, 24(7), 569-579.
108. Pantzaris, M. C., Loukaides, G. N., Ntzani, E. E. and Patrikios, I. S. (2013). A novel oral nutraceutical formula of omega-3 and omega-6 fatty acids with vitamins (PLP10) in relapsing remitting multiple sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled proof-of-concept clinical trial. *BMJ open*, 3(4), e002170.
109. Tyler, A. I., Greenfield, J. L., Seddon, J. M., Brooks, N. J. and Purushothaman, S. (2019). Coupling phase behavior of fatty acid containing membranes to membrane bio-mechanics. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 187.
110. Simopoulos, A. P. (2016). An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients*, 8(3), 128.
111. Račková, L., Ergin, V., Burcu Bali, E., Kuniakova, M. ve Karasu, Ç. (2014). Pomegranate seed oil modulates functions and survival of BV-2 microglial cells in vitro. *Int. J. Vitam. Nutr. Res*, 84(5-6), 295.
112. Mancera, P., Wappenhans, B., Cordobilla, B., Virgili, N., Pugliese, M., Rueda, F. and Domingo, J. C. (2017). Natural docosahexaenoic acid in the triglyceride form attenuates in vitro microglial activation and ameliorates autoimmune encephalomyelitis in mice. *Nutrients*, 9(7), 681.
113. Hennig, B., Toborek, M. and McClain, C. J. (2001). High-energy diets, fatty acids and endothelial cell function: implications for atherosclerosis. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(2), 97-105.
114. Choque, B., Catheline, D., Rioux, V. and Legrand, P. (2014). Linoleic acid: between doubts and certainties. *Biochimie*, 96, 14-21.
115. Toborek, M., Lee, Y. W., Garrido, R., Kaiser, S. and Hennig, B. (2002). Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cells. *The American journal of clinical nutrition*, 75(1), 119-125.
116. Ramsden, C. E., Ringel, A., Feldstein, A. E., Taha, A. Y., MacIntosh, B. A., Hibbeln, J. R. and Mann, J. D. (2012). Lowering dietary linoleic acid reduces bioactive oxidized linoleic acid metabolites in humans. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 87(4-5), 135-141.
117. Tsitouras, P. D., Gucciardo, F., Salbe, A. D., Heward, C. and Harman, S. M. (2008). High omega-3 fat intake improves insulin sensitivity and reduces CRP and IL6, but does not affect other endocrine axes in healthy older adults. *Hormone and metabolic research*, 40(03), 199-205.
118. Tulk, H. M. and Robinson, L. E. (2009). Modifying the n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio of a high-saturated fat challenge does not acutely attenuate postprandial changes in inflammatory markers in men with metabolic syndrome. *Metabolism*, 58(12), 1709-1716.

119. Nelson, T. L. and Hickey, M. S. (2004). Acute changes in dietary omega-3 fatty acid intake lowers soluble interleukin-6 receptor in healthy adult normal weight and overweight males. *Cytokine*, 26(5), 195-201.
120. Charrière, K., Ghzaïel, I., Lizard, G. and Vejux, A. (2021). Involvement of microglia in neurodegenerative diseases: beneficial effects of docosahexaenoic acid (DHA) supplied by food or combined with nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10639.
121. Kim, S., Jing, K., Shin, S., Jeong, S., Han, S. H., Oh, H. and Lim, K. (2018). ω 3-polyunsaturated fatty acids induce cell death through apoptosis and autophagy in glioblastoma cells: In vitro and in vivo. *Oncology reports*, 39(1), 239-246.
122. So, W. W., Liu, W. N. and Leung, K. N. (2015). Omega-3 polyunsaturated fatty acids trigger cell cycle arrest and induce apoptosis in human neuroblastoma LA-N-1 cells. *Nutrients*, 7(8), 6956-6973.
123. Xicoy, H., Wieringa, B. and Martens, G. J. (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular neurodegeneration*, 12, 1-11.
124. Grela, E., Kozłowska, J. and Grabowiecka, A. (2018). Current methodology of MTT assay in bacteria—A review. *Acta histochemica*, 120(4), 303-311.
125. Yaka, E., Çavdar, Z., Genç, K. ve Yener, G. G. (2006). Biochemical Markers in Cerebrospinal Fluid (CSF) and Evaluation of The Effect of CSF on PC12 Cell Line Viability in Alzheimer's Disease. *Turkish Journal of Geriatrics*, 9(1), 1-7.
126. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.
127. Grela, E., Kozłowska, J. and Grabowiecka, A. (2018). Current methodology of MTT assay in bacteria—A review. *Acta histochemica*, 120(4), 303-311.
128. Utsuro, M. (2005). Neutron spin interference visibility in tunneling transmission through magnetic resonators. *Physica B: Condensed Matter*, 358(1-4), 232-246.
129. Altmann, D. M. (2018). Neuroimmunology and neuroinflammation in autoimmune, neurodegenerative and psychiatric disease. *Immunology*, 154(2), 167-168.
130. Joffre, C., Dinel, A. L., Chataigner, M., Pallet, V. and Layé, S. (2020). N-3 polyunsaturated fatty acids and their derivatives reduce neuroinflammation during aging. *Nutrients*, 12(3), 647.
131. Mukerjee, S., Saeedan, A. S., Ansari, M. N. and Singh, M. (2021). Polyunsaturated fatty acids mediated regulation of membrane biochemistry and tumor cell membrane integrity. *Membranes*, 11(7), 479.
132. Kavyani, Z., Musazadeh, V., Fathi, S., Faghfour, A. H., Dehghan, P. and Sarmadi, B. (2022). Efficacy of the omega-3 fatty acids supplementation on inflammatory biomarkers: An umbrella meta-analysis. *International Immunopharmacology*, 111, 109104.

133. Gürsoy Çalan, Ö., Akan, P., Alper Bağrıyanık, H. ve Fadiloğlu, M. (2014). Amiloid Beta Peptit ve Nöroaktif Steroid Uygulamasına Karşı İnsan ve Sıçan Nöronal Hücrelerinin Vital Yanıtlarının Değerlendirilmesi. *Journal of Neurological Sciences*, 31(1).
134. Chen, K., Lu, Y., Liu, C., Zhang, L., Fang, Z. and Yu, G. (2018). Morroniside prevents H₂O₂ or A β 1–42-induced apoptosis via attenuating JNK and p38 MAPK phosphorylation. *European Journal of Pharmacology*, 834, 295-304.
135. Mao, X., Liao, Z., Guo, L., Xu, X., Wu, B., Xu, M. and Jia, Y. (2015). Schisandrin C ameliorates learning and memory deficits by A β 1–42-induced oxidative stress and neurotoxicity in mice. *Phytotherapy Research*, 29(9), 1373-1380.
136. Yurinskaya, M. M., Mitkevich, V. A., Kozin, S. A., Evgen'Ev, M. B., Makarov, A. A. and Vinokurov, M. G. (2015). HSP70 protects human neuroblastoma cells from apoptosis and oxidative stress induced by amyloid peptide isoAsp7-A β (1–42). *Cell death & disease*, 6(11), e1977-e1977.
137. Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M. and Wyss-Coray, T. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 21(3), 383-421.
138. Wang, P., Liao, W., Fang, J., Liu, Q., Yao, J., Hu, M. and Ding, K. (2014). A glucan isolated from flowers of *Lonicera japonica* Thunb. inhibits aggregation and neurotoxicity of A β 42. *Carbohydrate polymers*, 110, 142-147.
139. Wei, W., Wang, X. and Kusiak, J. W. (2002). Signaling events in amyloid β -peptide-induced neuronal death and insulin-like growth factor I protection. *Journal of Biological Chemistry*, 277(20), 17649-17656.
140. Melo, H. A. B. D., Nascimento, G. P. D., Corrêa, R., Almeida, R. D. N., Santos, I. D. O., Prado, P. S. and Magalhães, K. G. (2019). Potential neuroprotective and antiinflammatory effects provided by omega-3 (DHA) against Zika virus infection in human SH-SY5Y cells.
141. Alessandri, J. M., Extier, A., Langelier, B., Perruchot, M. H., Heberden, C., Guesnet, P. and Lavialle, M. (2008). Estradiol favors the formation of eicosapentaenoic acid (20: 5n-3) and n-3 docosapentaenoic acid (22: 5n-3) from alpha-linolenic acid (18: 3n-3) in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Lipids*, 43, 19-28.
142. Luchtman, D. W., Meng, Q., Wang, X., Shao, D. and Song, C. (2013). Omega-3 fatty acid eicosapentaenoic acid attenuates MPP⁺-induced neurodegeneration in fully differentiated human SH-SY 5Y and primary mesencephalic cells. *Journal of neurochemistry*, 124(6), 855-868.
143. Bilodeau, J. F., Gevariya, N., Larose, J., Robitaille, K., Roy, J., Oger, C. and Fradet, V. (2021). Long chain omega-3 fatty acids and their oxidized metabolites are associated with reduced prostate tumor growth. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 164, 102215.

144. Lim, K., Han, C., Dai, Y., Shen, M. and Wu, T. (2009). Omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit hepatocellular carcinoma cell growth through blocking β -catenin and cyclooxygenase-2. *Molecular cancer therapeutics*, 8(11), 3046-3055.
145. Yamamoto, D., Kiyozuka, Y., Adachi, Y., Takada, H., Hioki, K. and Tsubura, A. (1999). Synergistic action of apoptosis induced by eicosapentaenoic acid and TNP-470 on human breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment*, 55, 147-158.
146. Layé, S. (2010). Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 82(4-6), 295-303.
147. Vom Berg, J., Prokop, S., Miller, K. R., Obst, J., Kälin, R. E., Lopategui-Cabezas, I. and Heppner, F. L. (2012). Inhibition of IL-12/IL-23 signaling reduces Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. *Nature medicine*, 18(12), 1812-1819.
148. Breitner, J. C., Baker, L. D., Montine, T. J., Meinert, C. L., Lyketsos, C. G., Ashe, K. H. and ADAPT Research Group. (2011). Extended results of the Alzheimer's disease anti-inflammatory prevention trial. *Alzheimer's & Dementia*, 7(4), 402-411.
149. Kawashima, A., Harada, T., Imada, K., Yano, T. and Mizuguchi, K. (2008). Eicosapentaenoic acid inhibits interleukin-6 production in interleukin-1 β -stimulated C6 glioma cells through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 79(1-2), 59-65.
150. Minogue, A. M., Lynch, A. M., Loane, D. J., Herron, C. E. and Lynch, M. A. (2007). Modulation of amyloid- β -induced and age-associated changes in rat hippocampus by eicosapentaenoic acid. *Journal of neurochemistry*, 103(3), 914-926.
151. Muzio, G., Maggiora, M., Oraldi, M., Trombetta, A. and Canuto, R. A. (2007). PPAR α and PP2A are involved in the proapoptotic effect of conjugated linoleic acid on human hepatoma cell line SK-HEP-1. *International journal of cancer*, 121(11), 2395-2401.
152. Mielczarek-Putna, M., Otto-Ślusarczyk, D., Chrzanowska, A., Filipek, A. and Graboń, W. (2020). Telmisartan influences the antiproliferative activity of linoleic acid in human colon cancer cells. *Nutrition and cancer*, 72(1), 98-109.
153. Amtul, Z., Uhrig, M., Wang, L., Rozmahel, R. F. and Beyreuther, K. (2012). Detrimental effects of arachidonic acid and its metabolites in cellular and mouse models of Alzheimer's disease: structural insight. *Neurobiology of aging*, 33(4), 831-e21.
154. Amtul, Z., Uhrig, M. and Beyreuther, K. (2012). Detrimental effects of arachidonic acid and its metabolites in cellular and mouse models of Alzheimer's disease.
155. Marchix, J., Choque, B., Kouba, M., Fautrel, A., Catheline, D. and Legrand, P. (2015). Excessive dietary linoleic acid induces proinflammatory markers in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(12), 1434-1441.
156. Fan, Y. Y., Vaz, F. M. and Chapkin, R. S. (2017). Dietary fat and fiber interactively modulate apoptosis and mitochondrial bioenergetic profiles in mouse colon in a site-specific manner. *European Journal of Cancer Prevention*, 26(4), 301-308.

157. Lu, X., Yu, H., Ma, Q., Shen, S. and Das, U. N. (2010). Linoleic acid suppresses colorectal cancer cell growth by inducing oxidant stress and mitochondrial dysfunction. *Lipids in Health and Disease*, 9, 1-11.
158. Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 56(8), 365-379.
159. 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, 2096-2103.
160. Yang, J., Sun, Y., Xu, F., Liu, W., Hayashi, T., Hattori, S. and Ikejima, T. (2019). Silibinin protects rat pancreatic β -cell through up-regulation of estrogen receptors' signaling against amylin-or A β 1–42-induced reactive oxygen species/reactive nitrogen species generation. *Phytotherapy Research*, 33(4), 998-1009.
161. Tsai, S. W., Lo, C. Y., Yu, S. Y., Chen, F. H., Huang, H. C., Wang, L. K. and Liaw, J. W. (2022). Gold nanoparticles enhancing generation of ROS for Cs-137 radiotherapy. *Nanoscale Research Letters*, 17(1), 123.
162. Takeuchi, M., Nishisho, T., Toki, S., Kawaguchi, S., Tamaki, S., Oya, T. and Sairyo, K. (2023). Blue light induces apoptosis and autophagy by promoting ROS-mediated mitochondrial dysfunction in synovial sarcoma. *Cancer Medicine*, 12(8), 9668-9683.
163. Chen, X., Li, J., Kang, R., Klionsky, D. J. and Tang, D. (2021). Ferroptosis: machinery and regulation. *Autophagy*, 17(9), 2054-2081.
164. Taha, A., Sharifpanah, F., Wartenberg, M. and Sauer, H. (2020). Omega-3 and Omega-6 polyunsaturated fatty acids stimulate vascular differentiation of mouse embryonic stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 235(10), 7094-7106.
165. Stanley, W. C., Khairallah, R. J. and Dabkowski, E. R. (2012). Update on lipids and mitochondrial function: impact of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 15(2), 122-126.
166. Jayathilake, A. G., Kadife, E., Luwor, R. B., Nurgali, K. and Su, X. Q. (2019). Krill oil extract suppresses the proliferation of colorectal cancer cells through activation of caspase 3/9. *Nutrition & metabolism*, 16, 1-15.
167. Ghazali, R., Mehta, K. J., Bligh, S. A., Tewfik, I., Clemens, D. and Patel, V. B. (2020). High omega arachidonic acid/docosahexaenoic acid ratio induces mitochondrial dysfunction and altered lipid metabolism in human hepatoma cells. *World journal of hepatology*, 12(3), 84.
168. Chapkin, R. S., Young Hong, M., Fan, Y. Y., Davidson, L. A., Sanders, L. M., Henderson, C. E. and Lupton, J. R. (2002). Dietary n- 3 PUFA alter colonocyte mitochondrial membrane composition and function. *Lipids*, 37, 193-199.
169. Kim, E., Davidson, L. A., Zoh, R. S., Hensel, M. E., Salinas, M. L., Patil, B. S. and Chapkin, R. S. (2016). Rapidly cycling Lgr5+ stem cells are exquisitely sensitive to extrinsic dietary factors that modulate colon cancer risk. *Cell death & disease*, 7(11), e2460-e2460.

170. Hong, M. Y., Chapkin, R. S., Barhoumi, R., Burghardt, R. C., Turner, N. D., Henderson, C. E. and Lupton, J. R. (2002). Fish oil increases mitochondrial phospholipid unsaturation, upregulating reactive oxygen species and apoptosis in rat colonocytes. *Carcinogenesis*, 23(11), 1919-1926.
171. Oppedisano, F., Macrì, R., Gliozzi, M., Musolino, V., Carresi, C., Maiuolo, J. and Mollace, V. (2020). The anti-inflammatory and antioxidant properties of n-3 PUFAs: Their role in cardiovascular protection. *Biomedicines*, 8(9), 306.
172. Murray, A. W. and Hunt, T. (1993). *The cell cycle: an introduction* (Vol. 3). New York: Oxford University Press, 111-112.
173. Karami, A., Eriksdotter, M., Kadir, A., Almkvist, O., Nordberg, A. and Darreh-Shori, T. (2019). CSF cholinergic index, a new biomeasure of treatment effect in patients with Alzheimer's disease. *Frontiers in molecular neuroscience*, 12, 239.
174. Saxena, M. and Dubey, R. (2019). Target enzyme in Alzheimer's disease: Acetylcholinesterase inhibitors. *Current topics in medicinal chemistry*, 19(4), 264-275.
175. Hampel, H., Mesulam, M. M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T. and Khachaturian, Z. S. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*, 141(7), 1917-1933.
176. Freitas, R. D. and Campos, M. M. (2019). Protective effects of omega-3 fatty acids in cancer-related complications. *Nutrients*, 11(5), 945.
177. Rangel-Huerta, O. D., Aguilera, C. M., Mesa, M. D. and Gil, A. (2012). Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids supplementation on inflammatory biomarkers: a systematic review of randomised clinical trials. *British Journal of Nutrition*, 107(S2), S159-S170.
178. Barceló-Coblijn, G. and Murphy, E. J. (2009). Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Progress in lipid research*, 48(6), 355-374.
179. Janssen, C. I. and Kiliaan, A. J. (2014). Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. *Progress in lipid research*, 53, 1-17.
180. Liang, P., Henning, S. M., Schokrpur, S., Wu, L., Doan, N., Said, J. and Aronson, W. J. (2016). Effect of dietary omega-3 fatty acids on tumor-associated macrophages and prostate cancer progression. *The Prostate*, 76(14), 1293-1302.
181. Lampron, A., ElAli, A. and Rivest, S. (2013). Innate immunity in the CNS: redefining the relationship between the CNS and Its environment. *Neuron*, 78(2), 214-232.
182. Labrousse, V. F., Nadjar, A., Joffre, C., Costes, L., Aubert, A., Gregoire, S. and Laye, S. (2012). Short-term long chain omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and memory impairment in aged mice. *PLoS one*, 7(5), e36861.

183. Kaur, D., Sharma, V. and Deshmukh, R. (2019). Activation of microglia and astrocytes: a roadway to neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology*, 27, 663-677.
184. Desale, S.E. and Chinnathambi, S.(2020). Role of dietary fatty acids in microglial polarization in Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation*, 17(1), 93.
185. Xiang, Z., Ho, L., Yemul, S., Zhao, Z., Pompl, P., Kelley, K. and Pasinetti, G. M. (2002). Cyclooxygenase-2 promotes amyloid plaque deposition in a mouse model of Alzheimer's disease neuropathology. *Gene expression*, 10(5-6), 271.
186. Mirjany, M., Ho, L. and Pasinetti, G. M. (2002). Role of cyclooxygenase-2 in neuronal cell cycle activity and glutamate-mediated excitotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(2), 494-500.
187. Gleissman, H., Johnsen, J. I. and Kogner, P. (2010). Omega-3 fatty acids in cancer, the protectors of good and the killers of evil?. *Experimental cell research*, 316(8), 1365-1373.
188. Narayanan, N. K., Narayanan, B. A. and Reddy, B. S. (2005). A combination of docosahexaenoic acid and celecoxib prevents prostate cancer cell growth in vitro and is associated with modulation of nuclear factor- κ B, and steroid hormone receptors. *International journal of oncology*, 26(3), 785-792.
189. Chiu, L. C. M., Tong, K. F. and Ooi, V. E. C. (2005). Cytostatic and cytotoxic effects of cyclooxygenase inhibitors and their synergy with docosahexaenoic acid on the growth of human skin melanoma A-375 cells. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 59, S293-S297.
190. Herrera-Molina, R., Flores, B., Orellana, J. A. and von Bernhardt, R. (2012). Modulation of interferon- γ -induced glial cell activation by transforming growth factor β 1: a role for STAT1 and MAPK pathways. *Journal of neurochemistry*, 123(1), 113-123.
191. Herrera-Molina, R. and von Bernhardt, R. (2005). Transforming growth factor- β 1 produced by hippocampal cells modulates microglial reactivity in culture. *Neurobiology of disease*, 19(1-2), 229-236.
192. Colangelo, V., Schurr, J., Ball, M. J., Pelaez, R. P., Bazan, N. G. and Lukiw, W. J. (2002). Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: transcription and neurotrophic factor down-regulation and up-regulation of apoptotic and pro-inflammatory signaling. *Journal of neuroscience research*, 70(3), 462-473.
193. Tichauer, J. E., Flores, B., Soler, B., Eugenín-von Bernhardt, L., Ramírez, G. and Von Bernhardt, R. (2014). Age-dependent changes on TGF β 1 Smad3 pathway modify the pattern of microglial cell activation. *Brain, behavior, and immunity*, 37, 187-196.
194. Uribe-San Martin, R., Herrera-Molina, R., Olavarria, L., Ramirez, G. and Von Bernhardt, R. (2009). Reduction of β -amyloid-induced neurotoxicity on hippocampal cell cultures by moderate acidosis is mediated by transforming growth factor β . *Neuroscience*, 158(4), 1338-1347.

195. Tichauer, J., Saud, K. and Von Bernhardi, R. (2007). Modulation by astrocytes of microglial cell-mediated neuroinflammation: effect on the activation of microglial signaling pathways. *Neuroimmunomodulation*, 14(3-4), 168-174.
196. Yan, J., Zhang, H., Yin, Y., Li, J., Tang, Y., Purkayastha, S. and Cai, D. (2014). Obesity-and aging-induced excess of central transforming growth factor- β potentiates diabetic development via an RNA stress response. *Nature medicine*, 20(9), 1001-1008.
197. Liput, K. P., Lepczyński, A., Ogłuszka, M., Nawrocka, A., Poławska, E., Grzesiak, A. and Pierzchała, M. (2021). Effects of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in inflammation and cancerogenesis. *International journal of molecular sciences*, 22(13), 6965.
198. Kocatepe, D. ve Turan, H. (2018). Balık yağları, DHA, EPA ve sağlık. *Türkiye Klinikleri J Public Health-Special Topics*, 4(1), 62-67.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ELÇİ, Mualla Pınar
Uyruğu : T.C.

Eğitim Derecesi	Okul Programı	Mezuniyet Yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi / Biyokimya Ana Bilim Dalı	Devam Ediyor
Yüksek Lisans	Sağlık Bilimleri Üniversitesi / Biyokimya Ana Bilim Dalı	2020
Yüksek Lisans	Ege Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	2001
Lisans	Ege Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	1997

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2016-devam ediyor	Sağlık Bilimleri Üniversitesi	Uzman Biyolog
2001-2006	Gülhane Askeri Tıp Akademisi	Uzman Biyolog

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

- Kartal, B., Alimogullari, E., Elçi, P., Fatsa, T. ve Ören, S. (2024). The effects of quercetin on wound healing in the human umbilical vein endothelial cells. *Cell and tissue banking*, 1-10.
- Kartal, B., Alimoğulları, E., Elçi, P. ve Demir, H. (2023). Adipose delivered stem cells protect liver after ischemia-reperfusion injury by controlling autophagy. *Injury*, 54(8), 110839.
- Kilicay E, Erdal E, Elci P, Hazer B, Denkbaz EB. Tumour-specific hybrid nanoparticles in therapy of breast cancer. *J Microencapsul*. 2024 Jan;41(1):45-65. doi: 10.1080/02652048.2023.2292226. Epub 2024 Jan 10. PMID: 38095892
- Yilmaz-Oral D, Sezen SF, Turkcan D, Asker H, Kaya-Sezginer E, Kirlangic OF, Kopru CZ, Elci MP, Ozen FZ, Korkusuz P, Oren S, Oztekin CV, Ates I, Gur S. Dual Strategy with Adipose-Derived Stem Cells and l-arginine Recovered Cavernosal Functions in a Rat Model of Radical Prostatectomy. *Stem Cells Dev*. 2024 Jan;33(1-2):43-53. doi: 10.1089/scd.2023.0178. Epub 2023 Dec 22. PMID: 37847152

- Yelken, H. D., Elci, M. P., Turker, P. F., and Demirkaya, S. (2023). Exploring the role of polyunsaturated fatty acid ratios in modulating neuroinflammation in LPS-induced microglia: A comprehensive in vitro analysis. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 168, 106739.
- Fatsa, T., Hoşbul, T., Elçi, P. M., Ören, S., Unat, İ., and Yılmaz, C. (2023). Antiproliferative, anti-inflammatory, antitumoral and proapoptotic effects of calcitriol on MCF-7 and MCF10A cell lines.
- Kalyoncuoğlu, Ü. T., Alimoğulları, E., ve Elçi, M. P. (2023). Titanyum Abutment Üzerinde Çeşitli Prosedürlerle Fikse Edilmiş HGF-1 Hücrelerinin Değerlendirilmesi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 49(1), 23-29.
- Dere Yelken H, Elci MP, Turker PF, Demirkaya S. Omega fatty acid ratios and neurodegeneration in a healthy environment. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2024 Feb;170:106799. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2023.106799. Epub 2023 Nov 15. PMID: 379773
- Elçi, M. P., Fatsa, T., Kaya, S., Ersoy, N., Alpay, M., and Özgürtaş, T. (2022). Overview of the angiogenic effect of probiotics (*Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*) at human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Health Sciences and Medicine*, 5(3), 765-770.
- Güran, Ş., Çoban, Z. D., Elçi, M. P., Sarper, M., and Avcu, F. (2018). Zinc increases nestin but not vimentin gene expression in mouse mesenchymal stem cells. *Gülhane Tıp Dergisi*, 60(2), 56.
- Altaylı, E., Koru, Ö., ÖNGÜRÜ, Ö., Ide, T., Acikel, C., Sarper, M., and Avcu, F. (2015). An in vitro and in vivo investigation of the cytotoxic effects of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid) phenethyl ester and bortezomib in multiple myeloma cells. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 45(1), 38-46.
- Bali, E. B., Açık, L., Elçi, P., Sarper, M., Avcu, F., and Vural, M. (2015). In vitro anti-oxidant, cytotoxic and pro-apoptotic effects of *Achillea teretifolia* Willd extracts on human prostate cancer cell lines. *Pharmacognosy magazine*, 11(Suppl 2), S308.
- Mutlu, P., Elçi, M. P., Yıldırım, M., Nevruz, O., Çetin, A. T., and Avcu, F. (2015). Identification of XRCC1 Arg399Gln and XRCC3 Thr241Met polymorphisms in a Turkish population and their association with the risk of chronic lymphocytic leukemia. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, 31, 332-338.
- Bali, E. B., Açık, L., Akca, G., Sarper, M., Elçi, M. P., Avcu, F., and Vural, M. (2014). Antimicrobial activity against periodontopathogenic bacteria, antioxidant and cytotoxic effects of various extracts from endemic *Thermopsis turcica*. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4(7), 505-514.
- Mutlu, P., Yalcin, S., Elci, P., Yildirim, M., Cetin, A. T., and Avcu, F. (2014). Association of-174G/C interleukin/6 gene polymorphism with the risk of chronic lymphocytic, chronic myelogenous and acute myelogenous leukemias in Turkish patients. *Journal of BU ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 19(3), 787-791.

Avcu, F., Guner, M., Misirci, M., Elci, P., Safali, M., Goker, H., and Haznedaroglu, I. C. (2014). Evaluation of anti-neoplastic effects of a new hemostatic agent Ankaferd blood stopper on myeloma cell line and plasmacytoma development in Balb/c mice: results of the first in vitro and in vivo study. *Blood*, 124(21), 5728.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..